CAMILA LORENZ

**Emprego de técnicas morfométricas, espectrometria
MALDI-TOF e sequenciamento genético para
classificação e filogenia de Culicidae (Diptera)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Lincoln Suesdek

Versão Corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP

(BDTD)

São Paulo
2017

RESUMO

LORENZ, C. **Emprego de técnicas morfométricas, espectrometria MALDI-TOF e sequenciamento genético para classificação e filogenia de Culicidae (Diptera).** [Tese (Doutorado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Os mosquitos (Culicidae; Diptera) compreendem um grupo monofilético, mas algumas relações dentro da família ainda não estão totalmente resolvidas. Existem lacunas significativas no conhecimento do grupo, principalmente para gêneros Neotropicais. O objetivo deste trabalho foi elaborar uma hipótese filogenética para os gêneros de Culicidae baseada nos já tradicionais caracteres de variabilidade genética e nos recém-agregados caracteres de perfil proteico evidenciados por espectrometria de massa (MALDI-TOF). Além disso, foi analisado como a forma da asa evoluiu ao longo do tempo nesses grupos. Foram analisadas 1.429 asas de 76 espécies diferentes abrangendo 20 gêneros. Para análises genéticas, foram utilizadas sequências de oito genes nucleares e genomas mitocondriais de 21 espécies. A Análise de Variáveis Canônicas agrupou todas as espécies do gênero *Anopheles* em um único conjunto; o mesmo foi observado para os representantes da tribo Sabethini. O formato alar mostrou-se um bom marcador taxonômico, já que as análises em cada tribo ou gênero foram capazes de revelar agrupamentos naturais. O *landmark* #1 (situado entre as veias R1 e RS da asa) foi o mais variável entre todos os gêneros de Culicidae. A magnitude da divergência morfológica parece seguir um padrão hierárquico, onde: subfamília > tribo > gênero > subgênero > espécie > população. Análises de MP, ML e AB usando genes nucleares convergiram para a mesma árvore, em que Anophelinae aparece como grupo irmão de todos os outros Culicinae. Em relação aos genomas mitocondriais, a topologia construída com esses dados revelou grupos bem suportados, sendo que alguns foram discordantes da filogenia atual da família. Os genomas mitocondriais em geral seguiram a mesma ordem gênica, exceto nos representantes da tribo Sabethini, onde houve uma translocação de dois RNAs transportadores; esse fato é inédito em Culicidae até o momento. Os genes CO1, NAD2 e NAD6 apresentaram alta diversidade nucleotídica, podendo ser empregados como marcadores para outros estudos. A razão entre mutações não-sinônimas e sinônimas revelou que o genoma mitocondrial dos Culicidae está sob forte seleção purificadora. Através da espectrometria MALDI-TOF foram identificados 24 biomarcadores nas espécies analisadas; a topologia fenética construída utilizando esses perfis proteicos não apresentou congruência com outros marcadores, mas podem ter potencial na identificação taxonômica das espécies. A tribo Sabethini apresentou agrupamento único tanto nas análises genéticas quanto morfológicas. De um modo geral a morfologia, a genética e os perfis proteicos não foram concordantes, e isso pode estar ocorrendo devido a (a) taxas evolutivas distintas entre eles, (b) algum marcador utilizado estar sob seleção positiva ou (c) canalização genética. Foi encontrado grande suporte para alguns grupos dentro de Culicidae, como Anophelinae e tribo Sabethini, sendo que o genoma mitocondrial mostrou ser uma ferramenta útil na reconstrução da história evolutiva dos mosquitos.

Palavras-chave: Mosquitos. Morfometria Geométrica Alar. Genoma Mitocondrial. Evolução. Perfil Proteico. Translocação. Seleção Purificadora.

ABSTRACT

LORENZ, C. **Use of morphometric techniques, MALDI-TOF spectrometry and genetic sequencing for classification and phylogeny of Culicidae (Diptera).** [Ph. D. Thesis (Parasitology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Mosquitoes (Culicidae; Diptera) comprise a monophyletic group, but some relationships within the family are not fully resolved. There are significant gaps in group knowledge, especially for Neotropical genera. The aim of this study was to elaborate a phylogenetic hypothesis for the Culicidae family based on the already traditional characters of genetic variability and in the newly added protein profile characters evidenced by mass spectrometry (MALDI-TOF). In addition, it was analyzed how wing shape evolved over time in these groups. We analyzed 1,429 wings of 76 different species covering 20 genera. For genetic analysis, sequences from eight nuclear genes and mitochondrial genomes from 21 species were used. The Canonical Variate Analysis grouped all the species of the genus *Anopheles* into a single cluster; the same was observed for representatives of the Sabethini tribe. The wing shape proved to be a good taxonomic marker, because the analyzes in each tribe or genus were able to reveal natural clusters. The landmark #1 (located between the wing veins R1 and RS) was the most variable among all Culicidae genera. The magnitude of the morphological divergence seems to follow a hierarchical pattern, where: subfamily > tribe > genus > subgenus > species > population. Analyzes of MP, ML and AB using nuclear genes converged to the same tree, where Anophelinae appears as the sibling group of all other Culicinae. Regarding the mitochondrial genomes, the topology constructed with these data revealed well supported groups, and some were discordant to the current phylogeny of the family. Mitochondrial genomes generally followed the same genus order, except in the representatives of the Sabethini tribe, where there was a translocation of two transporter RNAs; this fact is unprecedented in Culicidae so far. The genes CO1, NAD2 and NAD6 presented high nucleotide diversity and could be used as markers for other studies. The ratio between non-synonymous and synonymous mutations revealed that the mitochondrial genome of the Culicidae is under strong purifying selection. Through MALDI-TOF spectrometry, 24 biomarkers were identified in the analyzed species; the phenetic topology constructed using these protein profiles did not show congruence with other markers, but may have potential in the taxonomic identification of the species. The Sabethini tribe presented a unique grouping in both genetic and morphological analyzes. In general, morphology, genetics and protein profiles were inconsistent, and this may be occurring due to (a) distinct evolutionary rates between them, (b) any marker used to be under positive selection or (c) genetic canalization. Great support was found for some groups within Culicidae, such as Anophelinae and Sabethini tribe, and the mitochondrial genome proved to be a useful tool in the reconstruction of the evolutionary history of mosquitoes

Keywords: Mosquitoes. Wing Geometric Morphometry. Mitochondrial Genome. Evolution. Protein Profile. Translocation. Purifying Selection.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A família Culicidae

Os culicídeos, conhecidos popularmente como mosquitos ou pernilongos, compreendem um grupo monofilético (Wood, Borkent, 1989; Miller et al., 1997; Harbach, Kitching, 1998) e pertencem à ordem Diptera. São insetos nematóceros – apresentam antenas longas com mais de seis segmentos articulados - distinguíveis dos demais da ordem pela presença de escamas nas veias alares, caráter que não se encontra nem mesmo nas famílias Chaoboridae e Dixidae, que lhes são próximas (Forattini, 2002). São facilmente reconhecidos pela longa probóscide e pela presença de escamas na maioria das partes do corpo. Encontram-se distribuídos pelas regiões tropicais e temperadas, inclusive no Círculo Ártico (Harbach, 2007). A área Neotropical detém o maior nível de biodiversidade e endemidade, já que 27% dos culicídeos são restritos a essa região biogeográfica (Ward, 1982; Forattini, 2002).

Atualmente são reconhecidas 3.555 espécies (Mosquito Taxonomic Inventory, 2017), mas pode existir um número três vezes maior do que este, já que muitos mosquitos podem ser membros de complexos ou formas isomórficas de outras espécies, além daqueles ainda desconhecidos pela ciência (Figura 1). Apenas cerca de 200 culicídeos, principalmente dos gêneros *Anopheles*, *Aedes* e *Culex* são vetores de patógenos que causam doenças em humanos, incluindo vírus (arboviroses), filárias (helminthíases) e protozoários. Essa relação entre mosquitos e saúde pública tem direcionado a maioria das pesquisas, com foco principalmente nas espécies com interesse médico (Reidenbach et al., 2009).

A família Culicidae tem origem antiga, provavelmente no período Jurássico (Edwards, 1932; Bertone et al., 2008), comprovado pelo registro fóssil de seu grupo-irmão Chaoboridae (Borkent, 1993). Mas infelizmente os poucos achados fósseis não solucionam as relações evolutivas dentro da família (Reidenbach et al., 2009). Devido a sua importância médica, Culicidae é um dos grupos mais estudados entre os insetos. Ironicamente, apesar dos inúmeros estudos morfológicos e moleculares, pouco progresso foi feito em relação ao entendimento da história evolutiva da família (Harbach, 2007).

Figura 1 – Exemplos da diversidade dentro da família Culicidae. **(A)** *Haemagogus janthinomys* (Foto: Dr. Nicolas Dégallier); **(B)** *Toxorhynchites* spp. (Foto: Narelle Power); **(C)** *Culex quinquefasciatus* (Foto: James Gathany); **(D)** *Sabethes* spp. (Foto: S. Drechsel); **(E)** *Anopheles albimanus* (Foto: James Gathany); **(F)** *Aedes aegypti* (Foto: Muhammad Mahdi).

1.2 Histórico da taxonomia da família

A classificação tradicional dos Culicidae é morfológica e predominantemente gradista, sendo baseada nos estudos de Edwards (1932). Desse modo, os níveis taxonômicos conhecidos são grupos arbitrários baseados na interpretação subjetiva das similaridades morfológicas, sendo a grande maioria parafiléticos ou polifiléticos (Harbach, 2007).

Havia uma dúvida quanto ao monofiletismo do grupo Culicidae (Wood, Borkent, 1989; Miller et al., 1997; Harbach, Kitching, 1998). Entretanto, três sinapomorfias anatômicas dos mosquitos adultos suportam o monofiletismo da família: presença de escamas eretas na cabeça (com várias perdas e reduções), aparelho bucal desenvolvido numa longa probóscide única e a presença de cerdas pré-alares (perdido em *Hodgesia*, *Malaya* e *Sabethes*) (Forattini, 2002).

Os gêneros existentes dentro de Culicidae raramente são revisados por completo, então também existem várias questões não resolvidas sobre o status taxonômico de muitas espécies, principalmente com aquelas dos gêneros: *Aedes*, *Armigeres*, *Coquillettidia*, *Culex*, *Mansonia*, *Mimomyia*, *Ochlerotatus*, *Psorophora*, e *Wyeomyia*. Tratam-se de gêneros que abrigam espécies extremamente variáveis e

difíceis de identificar, justamente pelo compartilhamento de características morfológicas (Harbach, 2007).

1.3 Cenário Atual

Os métodos contemporâneos de classificação têm incorporado revisões importantes de grande parte dos gêneros e tribos baseados tanto na morfologia quanto em dados moleculares. A classificação atual divide a família Culicidae em duas subfamílias (Anophelinae e Culicinae), 11 tribos e no mínimo 44 gêneros (Reinert et al., 2006, 2009; Harbach, 2007). A Figura 2 foi retirada e modificada de Reidenbach et al. (2009) e representa uma das filogenias atuais mais abrangentes, utilizando seis genes nucleares e 81 caracteres morfológicos em 25 gêneros de Culicidae. Entretanto, a maioria dos estudos atuais com culicídeos é limitada a poucos gênero ou grupos de espécies particulares de determinado país ou região. Existem lacunas significativas no conhecimento da taxonomia de Culicidae, pois se trata de um grupo muito extenso com uma quantidade enorme de espécies, inclusive algumas ainda não descritas.

Figura 2 - Árvore filogenética de inferência bayesiana construída com dados dos aminoácidos de seis genes e 81 caracteres morfológicos, amostrando 25 gêneros de Culicidae (modificado de Reidenbach et al., 2009).

Até os dias de hoje existem poucos estudos de filogenia molecular de Culicidae ao nível de gênero; a maioria é focada em níveis específicos. Todos esses estudos genéricos foram capazes de demonstrar, de acordo com a filogenia morfológica, que *Anopheles* é grupo-irmão dos outros gêneros amostrados (Besansky, Fahey, 1997; Miller et al., 1997; Mitchell et al., 2002; Shepard et al., 2006). Um estudo abrangente foi o de Shepard et al. (2006) baseado na subunidade 18S do DNA ribossomal de 39 espécies representando nove gêneros. Entretanto não foi possível resolver relações filogenéticas infra-genéricas com aquelas análises. Besansky e Fahey (1997) utilizaram o gene da proteína nuclear (*white*) para desvendar essas relações, que incluiu 13 espécies representando nove gêneros. Dessa forma, eles confirmaram a linhagem basal de Anophelinae e revelaram que Sabethini, Culicini e Aedini são grupos monofiléticos, demonstrando o potencial das sequências codificantes para reconstrução de relações filogenéticas dentro de Culicidae (Reidenbach et al., 2009).

Estudos de Sallum et al. (2000), Harbach e Kitching (2005) e Collucci e Sallum (2007) demonstraram os efeitos causados por diferentes interpretações das homologias, codificação dos caracteres e amostragem taxonômica sobre o resultado de uma reconstrução filogenética. Do mesmo modo, a escolha de fragmentos de DNA, interpretações da estrutura do gene, homologias, alinhamento, bem como erros no sequenciamento e escolha do método também têm efeitos importantes nas filogenias. Como ressaltado por Stevens e Schofield (2003), os genes podem ter histórias evolutivas distintas das dos organismos e por isso nem sempre a evolução dos marcadores moleculares é congruente com a evolução das espécies. É importante ressaltar que a diversidade encontrada em Culicidae deve ser muito antiga no tempo evolutivo; estudos de Reidenbach et al. (2009) demonstram que alguns gêneros como *Culex*, por exemplo, divergiram há pelo menos 150 milhões de anos. Além disso, existem evidências de uma irradiação rápida em alguns táxons, como é o caso dos anofelinos do subgênero *Kerteszia* (Lorenz et al., 2015). Ambas as questões criam problemas para a reconstrução filogenética, tanto com base em morfologia como em genética.

1.4 Classificação dos Culicidae

A subfamília Anophelinae inclui 476 espécies formalmente descritas. Muitas espécies pertencem a complexos e esperam por nomenclaturas formais. A tradicional

classificação desta subfamília inclui três gêneros: *Anopheles* (cosmopolita), *Bironella* (Australásia) e *Chagasia* (Neotropical). Análises filogenéticas com dados morfológicos e sequências de DNA mitocondrial, ribossômico e nuclear suportam fortemente o monofiletismo desta subfamília, e classificam *Chagasia* como ancestral de todos os outros anofelinos (Besansky, Fahey, 1997; Foley et al., 1998; Harbach, Kitching, 1998, 2005; Sallum et al., 2000, 2002; Krzywinski et al., 2001a,b; Harbach, 2007).

Aedini é a maior tribo da família Culicidae, com cerca de 1.240 espécies reconhecidas. Belkin (1962) classificou essa tribo como grupo natural, mas notou que alguns membros também apresentavam afinidades com outros táxons mais superiores dentro de Culicidae. Espécies dessa tribo são polimórficas e muito difíceis de identificar o gênero, já que há grande compartilhamento de características. Dessa forma, combinações de várias características são necessárias para definir a maioria dos gêneros, subgêneros e espécies.

O monofiletismo da tribo Culicini nunca foi contestado. Ela inclui 789 espécies classificadas em quatro gêneros: *Culex* (cosmopolita), *Deinocerites* (Neotropical), *Galindomyia* (Neotropical) e *Lutzia* (ausente no Paleártico ocidental e regiões Neárticas). A tribo Sabethini inclui 417 espécies distribuídas em 14 gêneros, principalmente Neotropicais, Orientais e regiões da Australásia.

Como síntese das principais informações sobre mosquitos que atualmente são adotadas, de acordo com Harbach (2007), pode-se citar:

- A família Culicidae é monofilética, mas as relações entre os gêneros não estão resolvidas;
- A subfamília Anophelinae é uma linhagem monofilética basal irmã dos demais Culicidae;
- O gênero *Anopheles* não pode ser monofilético se considerado juntamente com o gênero *Bironella*;
- As tribos Aedini, Culicini e Sabethini são monofiléticas;
- Os gêneros *Aedes* e *Ochlerotatus* são tradicionalmente definidos como polifiléticos;
- O monofiletismo das demais tribos, gêneros, subgêneros e grupos de espécies de Culicidae ainda não foi testado, e suas relações filogenéticas são incertas;

Apesar da importância médica e do longo histórico de pesquisas, a taxonomia dos Culicidae está longe de estar completa e o sistema de classificação existente não segue completamente sua história evolutiva (Belkin, 1962; Judd, 1996; Harbach,

Kitching, 1998; Reinert et al., 2004, 2006; Harbach, 2007). A aplicação de métodos moleculares nas análises filogenéticas está revelando a limitação da classificação tradicional dos mosquitos baseada somente em características morfológicas. O principal problema não está em reconhecer grupos monofiléticos, mas sim em decidir qual é seu status taxonômico em relação aos outros táxons (Harbach, 2007).

A seguir serão descritos alguns dos métodos atualmente utilizados para identificação de insetos, e que possuem particular utilidade nos casos de escassez ou pouca evidência de caracteres diagnósticos. Os métodos a seguir também têm aplicabilidade filogenética, como será esclarecido adiante.

1.5 Sequenciamento de Genes

A sistemática molecular de insetos tem complementado e reforçado os dados morfológicos e ecológicos, fazendo contribuições significativas para o entendimento dos processos evolutivos em insetos (Caterino et al., 2000). Entretanto, há várias controvérsias entre os sistematas na escolha de marcadores genéticos para construção de filogenias, o que explica o grande número de trabalhos usando genes diferentes. Essa situação problemática não é predominante em outros grupos, como vertebrados e plantas. Para ambos os grupos, geralmente há um reduzido grupo de marcadores aceitos como padrão, sendo usados globalmente para todos os táxons com o intuito de acumular dados similares (Caterino et al., 2000; GenBank, 2017).

A análise filogenética de um *loco* particular produz uma *gene-tree* (“árvore do gene”) que pode ou não concordar com a filogenia dos táxons (Avice, 1994; Doyle, 1997; Maddison, 1997). A incongruência entre as *gene-trees* e *species-tree* pode ser esperada sob certas circunstâncias, como: seleção diversificadora, transferência horizontal (incluindo hibridização), *lineage sorting* (coalescência antiga – manutenção de polimorfismo ancestral) e duplicação do gene seguido de extinção (Doyle, 1992; Maddison, 1997). Métodos específicos têm sido propostos para resolver esses problemas, como utilizar múltiplas *gene-trees* para inferir a filogenia verdadeira das espécies (Page, 1998).

A importância de se amostrar diversos genes nas reconstruções filogenéticas é bem reconhecida (Rannala, Yang, 2008). O DNA mitocondrial e o ribossomal nuclear são alvos convenientes devido aos sítios de ligação conservados para os primers e à facilidade de amplificação baseada em seu número de cópias elevado. Entretanto,

ambos podem ser problemáticos para resolver relações filogenéticas profundas: o DNA mitocondrial pode apresentar uma taxa elevada de mutações em alguns genes ou até mesmo ser modificado por bactérias simbiotes do organismo (Lin, Danforth, 2004; Hurst, Jiggins, 2005; Morais et al., 2012); o DNA ribossomal pode ser difícil de alinhar. Devido à crescente disponibilidade de genomas completos de mosquitos, os genes nucleares codificadores de proteínas representam uma alternativa viável, além de rica fonte de recursos largamente inexplorados (Reidenbach et al., 2009).

Genes nucleares ribossômicos e genes codificantes de proteínas diferem pouco nos padrões de substituição nucleotídica. É recomendado combinar ambos os marcadores, pois cada um possui vantagens distintas (Danforth et al., 2005). Os primeiros são os mais comumente utilizados em filogenias superiores de insetos (Whiting et al., 1997; Wiegmann et al., 2000; Dietrich et al., 2001; Giribet et al., 2001; Kjer et al., 2001; Wheeler et al., 2001; Belshaw, Quicke, 2002), mas em alguns casos eles podem apresentar problemas no alinhamento entre as sequências (Hickson et al., 2000). Genes nucleares codificadores de proteínas podem ser uma boa escolha para análises filogenéticas em insetos. As regiões codificantes desses genes são geralmente alinhadas com facilidade e sem ambiguidade. Baseado no genoma completo de *Drosophila melanogaster*, foram encontrados 13.379 genes codificantes para proteínas (Adams et al., 2000). Eles apresentam variadas taxas de substituição, que podem evoluir rapidamente – sendo boas escolhas para estudos de divergências recentes (ex: gene *period*, Regier et al., 1998) – ou serem mais estáveis – sendo boas escolhas para análises de divergências antigas (ex: RNA polimerase II, Shultz e Regier, 2000). Atualmente há poucos estudos combinando genes ribossomais com genes codificantes de proteínas para efetuar uma análise mais detalhada nos vários níveis filogenéticos em Culicidae (Danforth et al., 2005).

1.5.1 Genes mitocondriais

Atualmente, os genomas mitocondriais completos estão ganhando popularidade na resolução de filogenias principalmente pela facilidade em sequenciar o genoma inteiro e pela habilidade em resolver relações filogenéticas mais basais do que outros genes (Saccone et al., 1999; Nardi et al., 2003; Cameron et al., 2004). Contendo 37 genes – 13 codificantes de proteínas, dois RNAs ribossomais e 22 RNAs de

transferência – o típico genoma mitocondrial dos metazoários é circular e possui aproximadamente 15,000 bp, que pode ser facilmente amplificado por PCR utilizando uma combinação de *primers* universais (Cameron et al., 2012). Além disso, vários estudos recentes têm demonstrado que o genoma mitocondrial é um dos marcadores mais informativos para resolver relações filogenéticas em insetos, incluindo Phasmatodea (Komoto et al., 2011), Orthoptera (Fenn et al., 2008), Hemiptera (Hua et al., 2008, 2009), Hymenoptera (Cameron et al., 2008; Dowton et al., 2009), Coleoptera (Song et al. 2010; Timmermans et al., 2010), Diptera (Cameron et al., 2007) e Lepidoptera (Kim et al., 2011).

Além dos dados de sequência nucleotídica, outras informações filogenéticas úteis também podem ser extraídas dos genomas mitocondriais, como variabilidade no tamanho gênico e intergênico (Schneider, Ebert, 2004), eventos de inserção e deleção (Rokas, Holland, 2000), e rearranjo de genes (Boore, Brown, 1998). A mitocôndria constitui um modelo ideal para estudar a evolução justamente devido a esse rearranjo no genoma, onde a ordem dos genes pode reter traços de relações filogenéticas (Boore et al., 1998). Além disso, o número de genes existente dentro do genoma mitocondrial (37 genes) é conveniente para estudos filogenéticos, já que não necessita de um tempo computacional muito grande para rodar as análises e permite conclusões estatisticamente confiáveis (Sankoff et al., 1992).

Outro argumento que favorece o uso do genoma mitocondrial para reconstruções filogenéticas é que o tamanho efetivo populacional desse marcador é menor quando comparado a um nuclear, por exemplo (cerca de 25% devido à sua haploidia e herança materna). Quanto menor for o tamanho efetivo populacional, maior é a probabilidade de a árvore do gene ser congruente com a árvore da espécie (Moore, 1995). Ao analisar 34 espécies de aves, Moore (1995) constatou esse fato principalmente em ramos filogenéticos longos, onde a probabilidade de a árvore-mitocondrial ser compatível com a árvore da espécie é cerca de 95%, contra apenas 62% quando um gene nuclear é utilizado. Ele também observou que esse fato está diretamente relacionado com o grau de profundidade filogenética entre os organismos.

1.6 Morfometria Geométrica Alar

Como citado anteriormente, a caracterização morfológica de estruturas complexas e de variabilidade individual é difícil e sujeita à subjetividade, muitas vezes

prejudicando as análises filogenéticas. Nesses casos é útil ter-se um método que permita a percepção e a quantificação dessas variações entre indivíduos, como a morfometria. Trata-se de um modelo matemático descritivo das dissimilaridades entre as formas geométricas de objetos.

A morfometria geométrica, em especial, permite um estudo estatístico multivariado das estruturas biológicas (Monteiro, Reis, 1999), ou seja, considera simultaneamente várias características de uma estrutura corporal complexa. Nos insetos, a principal estrutura-alvo dessa análise são as asas, pois possuem uma estrutura bidimensional e as nervuras alares se cruzam formando pontos, ideais para comparações morfométricas. Há estudos na literatura que indicam ser possível separar espécies através da morfometria geométrica (Calle et al., 2002; Vidal et al., 2011; Lorenz et al., 2012), o que nos leva a crer que também seria possível distinguir gêneros dentro de uma mesma tribo ou família.

Para a análise da forma alar, geralmente faz-se uma sobreposição de Procrustes e posterior estudo de componentes principais (*relative warps*) e variáveis canônicas, que excluem a variação do tamanho isométrico e definem a variação real dos formatos nas asas (Monteiro, Reis, 1999). E para a descrição de tamanho alar utiliza-se o vetor tamanho do centroide, definido pela a raiz quadrada da soma dos quadrados das distâncias de cada ponto anatômico do centroide na configuração total (Rohlf, 1993). É uma estratégia para sintetizar o tamanho da asa numa única variável (Dujardin, 2008).

Em Culicidae, futuramente os caracteres morfométricos alares poderão eventualmente auxiliar em estudos comportamentais, visto que as características das asas geralmente estão relacionadas a outras particularidades biológicas do mosquito, como eficiência no voo, produção de sons alares de corte pré-cópula e até fecundidade (Brogdon, 1994). Além disso, a morfometria alar é um método rápido, barato e os dados provenientes de sua análise podem ser utilizados por outros profissionais da saúde em vigilância sanitária epidemiológica (Dujardin, 2008).

Existem estudos na literatura que utilizam dados morfométricos para construção de filogenias (Zelditch et al., 1995, 1998; Swiderski et al., 2000; Guerrero et al., 2003), codificando características quantitativas em estados discretos. Isso é possível se houver um forte sinal filogenético (Cole, 2002) nos dados morfométricos, ou seja, se os táxons mais próximos apresentarem forma mais semelhante entre si do que os outros não-relacionados. A força desse sinal filogenético é refletida no grau de congruência

entre o fenograma morfométrico e a árvore filogenética conhecida daquele táxon (MacLeod, Forey, 2002).

1.7 Espectrometria de Massa – MALDI-TOF

Outra abordagem que atualmente tem sido empregada para identificação de espécies é o perfil proteico total das espécies, principalmente evidenciado pela espectrometria de massa tipo MALDI-TOF. Inicialmente, a análise dos perfis proteicos era empregada para caracterização de colônias de bactérias. Na última década, ela tornou-se um método rotineiro para identificação desses microrganismos em laboratórios de diagnóstico (Sauer, Kliem, 2010). Em dois trabalhos pioneiros, o perfil proteico total também tem sido avaliado quanto ao seu potencial para identificar insetos. Campbell (2005) demonstrou que através de análises com MALDI-TOF é possível de distinguir espécies crípticas de *Drosophila melanogaster*. Da mesma forma, perfis proteicos espécie-específicos foram identificados em três espécies de gêneros diferentes de pulgões (Perera et al., 2005). Em um estudo recente, Feltens et al. (2010) também utilizou uma abordagem proteica para estabelecer relações filogenéticas entre 13 espécies de moscas *Drosophila*. Finalmente, Kaufmann et al. (2011) utilizou o MALDI-TOF para caracterização de *Culicoides*, obtendo resultados informativos.

Todos esses estudos comprovam o potencial do uso de perfis proteicos evidenciados por MALDI-TOF para identificação de espécies/gêneros. Além de ser uma técnica rápida, simples e confiável, ela também tem um ótimo custo-benefício se comparada a outras técnicas de identificação proteica (Kaufmann et al., 2011). A utilização do MALDI-TOF para identificação de táxons resolveria problemas básicos da taxonomia, como exemplares degradados pelo tempo e características taxonômicas muito subjetivas ou de difícil interpretação (Carpenter et al., 2008; Meiswinkel et al., 2008; Kaufmann et al., 2011).

A técnica de espectrometria de massas é considerada uma das mais precisas da atualidade e serve para analisar as moléculas de maneira quantitativa e qualitativa. É possível obter com facilidade 5 ou 6 algarismos significativos na massa molar, com erros que chegam a apenas 0,001% em equipamentos de alta resolução (Ross et al., 1998). Durante os anos 80 foram desenvolvidos novos mecanismos de ionização em espectrômetros de massa para moléculas grandes e polares, como peptídeos e

proteínas, o que permitiu que muitos problemas bioquímicos pudessem ser esclarecidos.

Um espectrômetro de massa é formado basicamente de duas partes: o sistema de ionização das moléculas, responsável por vaporiza-las e carrega-las eletricamente, e o analisador de massa – o espectrômetro de massa propriamente dito – que separa os íons resultantes de acordo com a massa.

A técnica de ionização MALDI (sigla em inglês para *matrix-assisted laser desorption ionization*) baseia-se na dessorção a laser das moléculas. O analisador de massa TOF (sigla em inglês para *time-of-flight*) lança as moléculas ionizadas e aceleradas em um tubo sob vácuo e sem campo elétrico para medida do seu tempo de “vôo” até um detector. Esse tempo de “vôo” é proporcional à massa molar da molécula; sendo assim, esse caracter pode ter significado evolutivo e consequentemente possibilidade de emprego na filogenia dos grupos.

1.8 Problema Biológico

A filogenia dos Culicidae ainda não está totalmente compreendida. Existem lacunas significativas no conhecimento do grupo, principalmente para espécies/gêneros Neotropicais. Os caracteres morfológicos utilizados em taxonomia muitas vezes são subjetivos ou de difícil interpretação, prejudicando a análise de homologias em estudos filogenéticos. É desejável, portanto, que filogenias agreguem também dados moleculares, no intuito de minimizar esses problemas. Podemos obter benefícios da grande quantidade de sequências gênicas e da disponibilidade atual de espectrômetros de massa que permitem fina caracterização de moléculas espécie-específicas. Dessa forma propomos aqui elaborar uma hipótese filogenética para os gêneros de Culicidae baseada nos já tradicionais caracteres de variabilidade genética, nos genomas mitocondriais e nos recém-agregados caracteres de “perfil proteico” evidenciados por espectrometria de massa (MALDI-TOF). O resultado será comparado ao fenograma de morfometria geométrica alar com intuito de entender a evolução do formato da asa dentro do grupo.

6 CONCLUSÕES

- As análises filogenéticas de ML, MP e AB utilizando oito genes nucleares convergiram para a mesma árvore, revelando o monofiletismo da família Culicidae e da tribo Sabethini;
- A topologia de árvore filogenética construída com dados nucleares corroborou a literatura mais recente, e continua se mostrando ineficiente para resolver algumas relações dentro de Culicidae;
- A topologia de árvore filogenética construída com dados mitocondriais revelou grupos bem suportados, sendo que alguns foram discordantes da filogenia atual da família;
- O formato alar mostrou-se um bom marcador taxonômico, já que as análises em cada tribo, gênero ou subgênero foram capazes de revelar agrupamentos naturais;
- Para os Culicidae, o formato alar de um modo geral parece não apresentar sinal filogenético congruente com as topologias genéticas, devendo ser usado com cautela para inferir a evolução dos grupos;
- A magnitude da divergência morfológica parece seguir um padrão hierárquico, onde: subfamília > tribo > gênero > subgênero > espécie > população;
- O *landmark* #1, situado entre as veias R1 e RS do rádio setorial da asa, foi o mais variável entre todos os grupos de Culicidae;
- Existe um forte viés A-T nos genomas mitocondriais de Culicidae;
- Os genomas mitocondriais em geral seguiram a mesma ordem gênica, exceto nos representantes da tribo Sabethini, onde houve uma translocação de dois RNAs transportadores. Esse fato é inédito entre os culicídeos;
- Os genes CO1, NAD2 e NAD6 apresentaram alta diversidade nucleotídica, podendo ser empregados como marcadores informativos;

- A razão entre mutações não-sinônimas e sinônimas revelou que o genoma mitocondrial dos Culicidae está sob forte seleção purificadora;
- Os gêneros da tribo Sabethini formaram um agrupamento único tanto nas análises genéticas quanto morfológicas, além de apresentarem autapomorfias como translocação de genes mitocondriais;
- Foram identificados 24 biomarcadores com significado taxonômico ou de diagnose específica utilizando espectrometria MALDI-TOF nas espécies analisadas;
- Os perfis proteicos identificados por espectrometria MALDI-TOF não mostraram congruência com outros marcadores, mas podem ter potencial na identificação taxonômica das espécies;
- A morfologia, a genética e os perfis proteicos não foram concordantes, possivelmente devido a (a) taxas evolutivas distintas entre eles, (b) algum marcador utilizado estar possivelmente sob seleção positiva ou (c) canalização genética ou morfológica;

REFERÊNCIAS*

- Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, George RA. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. Science. 2000; 287(5): 2185-95.
- Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. 2010.
- Avise JC, Moritz C. Molecular Markers Natural History and Evolution. Trends in Ecology and Evolution. 1994; 9(12): 499-499.
- Beard CB, Hamm D, Collins FH. The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae*: DNA sequence, genome organization, and comparisons with mitochondrial sequences of other insects. Insect Molecular Biology. 1993; 2(2): 103-24.
- Behura SK, Lobo NF, Haas B, Lovin DD, Shumway MF, Puiu D, Severson DW. Complete sequences of mitochondria genomes of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* and comparative analysis of mitochondrial DNA fragments inserted in the nuclear genomes. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 2011; 41(10): 770-7.
- Belkin JN. The Mosquitoes of the South Pacific (Diptera, Culicidae), Vol. 2. The Mosquitoes of the South Pacific (Diptera, Culicidae). 1962.
- Belshaw R, Quicke DL. Robustness of ancestral state estimates: evolution of life history strategy in ichneumonoid parasitoids. Systematic Biology. 2002; 51(3): 450-77.
- Bernt M, Donath A, Jühling F, Externbrink F, Florentz C, Fritzsche G, Stadler PF. MITOS: Improved de novo metazoan mitochondrial genome annotation. Molecular phylogenetics and evolution. 2013; 69(2): 313-9.
- Bertone MA, Courtney GW, Wiegmann BM. Phylogenetics and temporal diversification of the earliest true flies (Insecta: Diptera) based on multiple nuclear genes. Systematic Entomology. 2008; 33(4): 668-87.
- Besansky NJ, Lehmann T, Fahey GT, Fontenille D, Braack LE, Hawley WA, Collins FH. Patterns of mitochondrial variation within and between African malaria vectors, *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis*, suggest extensive gene flow. Genetics. 1997; 147(4): 1817-28.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [update 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>.

Birdsell JA. Integrating genomics, bioinformatics, and classical genetics to study the effects of recombination on genome evolution. *Molecular Biology and Evolution*. 2002; 19(7): 1181-97.

Bitner-Mathé BC, Klaczko LB. Heritability, phenotypic and genetic correlations of size and shape of *Drosophila mediopunctata* wings. *Heredity*. 1999; 83(6): 688-96.

Bodmer M, Ashburner M. Conservation and change in the DNA sequences coding for alcohol dehydrogenase in sibling species of *Drosophila*. *Nature*. 1984; 309: 425-30.

Boore JL, Brown WM. Big trees from little genomes: mitochondrial gene order as a phylogenetic tool. *Current Opinion in Genetics & Development*. 1998; 8(6): 668-74.

Boore JL, Brown WM. Mitochondrial genomes of Galathealium, Helobdella, and Platynereis: sequence and gene arrangement comparisons indicate that Pogonophora is not a phylum and Annelida and Arthropoda are not sister taxa. *Molecular Biology and Evolution*. 2000; 17(1): 87-106.

Borkent A. A world catalogue of fossil and extant Corethrellidae and Chaoboridae (Diptera), with a listing of references to keys, bionomic information and descriptions of each known life stage. *Insect Systematics & Evolution*. 1993; 24(1): 1-24.

Brandt U. Energy converting NADH: quinone oxidoreductase (complex I). *Annu. Rev. Biochem.* 2006; 75: 69-92.

Breuker CJ, Debat V, Klingenberg CP. Functional evo-devo. *Trends in Ecology & Evolution*. 2006; 21(9): 488-92.

Brogdon WG. Measurement of flight tone differences between female *Aedes aegypti* and *A. albopictus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*. 1994; 31(5): 700-3.

Brower AV, Desalle R. Practical and theoretical considerations for choice of a DNA sequence region in insect molecular systematics, with a short review of published studies using nuclear gene regions. *Annals of the Entomological Society of America*. 1994; 87(6): 702-16.

Calle L, David A, Quiñones ML, Erazo HF, Jaramillo O. Morphometric discrimination of females of five species of *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus* from Southern and Northwest Colombia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2002; 97(8): 1191-5.

Cameron SL, Miller KB, D'Haese CA, Whiting MF, Barker SC. Mitochondrial genome data alone are not enough to unambiguously resolve the relationships of Entognatha, Insecta and Crustacea sensu lato (Arthropoda). *Cladistics*. 2004; 20(6): 534-57.

Cameron SL, Lambkin CL, Barker SC, Whiting MF. A mitochondrial genome phylogeny of Diptera: whole genome sequence data accurately resolve relationships over broad timescales with high precision. *Systematic Entomology*. 2007; 32(1): 40-59.

- Cameron SL, Downton M, Castro LR, Ruberu K, Whiting MF, Austin AD, Stevens J. Mitochondrial genome organization and phylogeny of two vespid wasps. *Genome*. 2008; 51(10): 800-8.
- Cameron SL, Lo N, Bourguignon T, Svenson GJ, Evans TA. A mitochondrial genome phylogeny of termites (Blattodea: Termitidae): robust support for interfamilial relationships and molecular synapomorphies define major clades. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2005; 65(1): 163-73.
- Campbell PM. Species differentiation of insects and other multicellular organisms using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry protein profiling. *Systematic Entomology*. 2012; 30(2): 186-90.
- Campbell MP, Royle L, Radcliffe CM, Dwek RA, Rudd PM. GlycoBase and autoGU: tools for HPLC-based glycan analysis. *Bioinformatics*. 2008; 24(9): 1214-6.
- Cardini A. The geometry of the marmot (Rodentia: Sciuridae) mandible: phylogeny and patterns of morphological evolution. *Systematic Biology*. 2003; 52(2): 186-205.
- Cardini A, Elton S. Does the skull carry a phylogenetic signal? Evolution and modularity in the guenons. *Biological Journal of the Linnean Society*. 2008; 93(4): 813-34.
- Carpenter S, Mellor PS, Torr SJ. Control techniques for Culicoides biting midges and their application in the U.K. and northwestern Palaearctic. *Medical and Veterinary Entomology*. 2008; 22: 175–87.
- Caterino MS, Cho S, Sperling FA. The current state of insect molecular systematics: a thriving Tower of Babel. *Annual Review of Entomology*. 2000; 45(1): 1-54.
- Cator LJ, Ng'Habi KR, Hoy RR, Harrington LC. Sizing up a mate: variation in production and response to acoustic signals in *Anopheles gambiae*. *Behavioral Ecology*. 2010; 5: 7-13.
- Chevreaux B. MIRA: an automated genome and EST assembler. 2017.
- Clements AN. The biology of mosquitoes - Transmission of viruses and interactions with bacteria (Vol. 3). 1993.
- Cole TM, Lele S, Richtsmeier. A parametric bootstrap approach to the detection of phylogenetic signals in landmarks data. Capítulo 6. Kansas City: School of Medicine, University of Missouri-Kansas City. 2002.
- Collucci E, Sallum MAM. Cladistic analysis of the subgenus *Anopheles* (*Anopheles*) *Meigen* (Diptera: Culicidae) based on morphological characters. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2007; 102(3): 277-92.
- Cook CE. The complete mitochondrial genome of the stomatopod crustacean *Squilla mantis*. *BMC genomics*. 2005; 6(1): 105.

- Courant F, David B, Laurin B, Chaline J. Quantification of cranial convergences in arvicolids (Rodentia). *Biological Journal of the Linnean Society*. 1997; 62(4): 505-17.
- Danforth BN, Lin CP, Fang J. How do insect nuclear ribosomal genes compare to protein-coding genes in phylogenetic utility and nucleotide substitution patterns?. *Systematic Entomology*. 2005; 30(4): 549-62.
- Das S, Radtke A, Choi YJ, Mendes AM, Valenzuela JG, Dimopoulos G. Transcriptomic and functional analysis of the *Anopheles gambiae* salivary gland in relation to blood feeding. *BMC genomics*. 2010; 11(1): 566.
- David B, Laurin B. Morphometrics and cladistics: measuring phylogeny in the sea urchin *Echinocardium*. *Evolution*. 1996; 5: 348-59.
- Debat V, David P. Mapping phenotypes: canalization, plasticity and developmental stability. *Trends in Ecology & Evolution*. 2001; 16(10): 555-61.
- Degnan JH, Rosenberg NA. Gene tree discordance, phylogenetic inference and the multispecies coalescent. *Trends in Ecology & Evolution*. 2009; 24(6): 332-40.
- Demari-Silva B, Vesgueiro FT, Sallum MAM, Marrelli MT. Taxonomic and phylogenetic relationships between species of the genus *Culex* (Diptera: Culicidae) from Brazil inferred from the cytochrome c oxidase I mitochondrial gene. *Journal of Medical Entomology*. 2011; 48(2): 272-9.
- Demari-Silva B, Foster PG, de Oliveira TM, Bergo ES, Sanabani SS, Pessôa R, Sallum MAM. Mitochondrial genomes and comparative analyses of *Culex camposi*, *Culex coronator*, *Culex usquatus* and *Culex usquatissimus* (Diptera: Culicidae), members of the coronator group. *BMC Genomics*. 2015; 16(1): 831.
- Dieme C, Yssouf A, Vega-Rúa A, Berenger JM, Failloux AB, Raoult D, Almeras L. Accurate identification of Culicidae at aquatic developmental stages by MALDI-TOF MS profiling. *Parasites & Vectors*. 2014; 7(1): 544.
- Dietrich CH, Rakitov RA, Holmes JL, Black WC. Phylogeny of the major lineages of Membracoidea (Insecta: Hemiptera: Cicadomorpha) based on 28S rDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2001; 18(2): 293-305.
- Dowton M, Cameron SL, Dowavac JI, Austin AD, Whiting MF. Characterization of 67 mitochondrial tRNA gene rearrangements in the Hymenoptera suggests that mitochondrial tRNA gene position is selectively neutral. *Molecular Biology and Evolution*. 2009; 26(7): 1607-17.
- Doyle JJ. Gene trees and species trees: molecular systematics as one-character taxonomy. *Systematic Botany*. 1992; 144-63.
- Doyle JJ. Trees within trees: genes and species, molecules and morphology. *Systematic Biology*. 1997; 46(3): 537-53.

Dujardin JP. Morphometrics applied to medical entomology. *Infection, Genetics and Evolution*. 2008; 8(6): 875-90.

Dvorak V, Halada P, Hlavackova K, Dokianakis E, Antoniou M, Volf P. Identification of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. *Parasites & Vectors*. 2014; 7(1): 21.

Edwards FW. Diptera. Fam. Culicidae. Gen. Ins., 194. 1932.

Englund S, Seifter S. Precipitation techniques. *Methods in enzymology*. 1990; 182: 285-300.

Félix RC, Müller P, Ribeiro V, Ranson H, Silveira H. *Plasmodium* infection alters *Anopheles gambiae* detoxification gene expression. *BMC Genomics*. 2010; 11(1): 312.

Felsenstein J. PHYLIP (phylogeny inference package) Department of Genetics. University of Washington, Seattle. 1995.

Feltens R, Görner R, Kalkhof S, Gröger-Arndt H, von Bergen M. Discrimination of different species from the genus *Drosophila* by intact protein profiling using matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *BMC Evolutionary Biology*. 2010; 10(1): 85-95.

Fenn JD, Song H, Cameron SL, Whiting MF. A preliminary mitochondrial genome phylogeny of Orthoptera (Insecta) and approaches to maximizing phylogenetic signal found within mitochondrial genome data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2008; 49(1): 59-68.

Flook PK, Rowell CHF, Gellissen G. The sequence, organization, and evolution of the *Locusta migratoria* mitochondrial genome. *Journal of Molecular Evolution*. 1995; 41(6): 928-41.

Foley DH, Bryan JH, Yeates D, Saul A. Evolution and Systematics of *Anopheles*: Insights from a Molecular Phylogeny of Australasian Mosquitoes. *Molecular phylogenetics and Evolution*. 1998; 9(2): 262-75.

Forattini OP. Culicidologia médica. São Paulo: EDUSP; 2002. 864 p.

GenBank - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> – [acesso em Jan/2017]

Gibson G, Wagner G. Canalization in evolutionary genetics: a stabilizing theory? *BioEssays*. 2000; 22(4): 372-80.

Gilchrist AS, Partridge L. The contrasting genetic architecture of wing size and shape in *Drosophila melanogaster*. *Heredity*. 2001; 86(2): 144-52.

Giribet G, Edgecombe GD, Wheeler WC. Arthropod phylogeny based on eight molecular loci and morphology. *Nature*. 2001; 413(6): 157.

Goloboff P, Farris S, Nixon K. TNT (Tree analysis using New Technology). 2000.

Gómez G, Jaramillo L, Correa MM. Wing geometric morphometrics and molecular assessment of members in the *Albitarsis* Complex from Colombia. *Molecular Ecology Resources*. 2013; 13(6): 1082-92.

Gómez GF, Márquez EJ, Gutiérrez LA, Conn JE, Correa MM. Geometric morphometric analysis of Colombian *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) reveals significant effect of environmental factors on wing traits and presence of a metapopulation. *Acta Tropica*. 2014; 135: 75-85.

Guerrero JA, De Luna E, Sánchez-Hernandez COR. Morphometrics in the quantification of character state identity for the assessment of primary homology: an analysis of character variation of the genus *Artibeus* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Biological Journal of the Linnean Society*. 2003; 80(1): 45-55.

Guill JM, Heins DC, Hood CS. The effect of phylogeny on interspecific body shape variation in darters (Pisces: Percidae). *Systematic Biology*. 2003; 52(4): 488-500.

Harbach RE. The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. *Zootaxa*. 2007; 1668(1): 538-91.

Harbach RE, Kitching IJ. Phylogeny and classification of the Culicidae (Diptera). *Systematic Entomology*. 1998; 23(4): 327-70.

Harbach, RE, Kitching IJ. Phylogeny of the pyretophorus series of *Anopheles* subgenus *Cellia* (Diptera: Culicidae). *Systematic Entomology*. 1999; 24(2): 193-205.

Harbach RE, Kitching IJ. Reconsideration of anopheline mosquito phylogeny (Diptera: Culicidae: Anophelinae) based on morphological data. *Systematics and Biodiversity*. 2005; 3(4): 345-74.

Harbach RE, Peyton EL. Systematics of *Onirion*, a new genus of Sabethini (Diptera: Culicidae) from the Neotropical Region. *Bulletin of Natural History Museum Entomology Series*. 2000; 69(2): 115-70.

Hebert PD, Cywinska A, Ball SL. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 2003; 270(12): 313-21.

Henry A, Thongsripong P, Fonseca-Gonzalez I, Jaramillo-Ocampo N, Dujardin JP. Wing shape of dengue vectors from around the world. *Infection, Genetics and Evolution*. 2010; 10(2): 207-14.

Hickson RE, Simon C, Perrey SW. The performance of several multiple-sequence alignment programs in relation to secondary-structure features for an rRNA sequence. *Molecular Biology and Evolution*. 2000; 17(4): 530-9.

Hillis DM, Dixon MT. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology*. 1991; 66(4): 411-53.

Hoffmann AA, Shirriffs J. Geographic variation for wing shape in *Drosophila serrata*. *Evolution*. 2002; 56(5): 1068-73.

Hoppenheit A, Murugaiyan J, Bauer B, Steuber S, Clausen PH, Roesler U. Identification of Tsetse (*Glossina* spp.) using matrix-assisted laser desorption/ionisation time of flight mass spectrometry. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7(7): 2305.

Hortin GL. The MALDI-TOF mass spectrometric view of the plasma proteome and peptidome. *Clinical Chemistry*. 2006; 52(7): 1223-37.

Houle D, Mezey J, Galpern P, Carter A. Automated measurement of *Drosophila* wings. *BMC Evolutionary Biology*. 2003; 3(1): 25.

Hu S. Akaike Information Criterion. Center for Research in Computation. 2007.

Hua J, Li M, Dong P, Cui Y, Xie Q, Bu W. Comparative and phylogenomic studies on the mitochondrial genomes of Pentatomomorpha (Insecta: Hemiptera: Heteroptera). *BMC Genomics*. 2008; 9(1): 610.

Hua J, Li M, Dong P, Cui Y, Xie Q, Bu W. Phylogenetic analysis of the true water bugs (Insecta: Hemiptera: Heteroptera: Nepomorpha): evidence from mitochondrial genomes. *BMC Evolutionary Biology*. 2009; 9(1): 134.

Hurst GD, Jiggins FM. Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 2005. 272(15), 1525-34.

Hwang UW, Park CJ, Yong TS, Kim W. One-step PCR amplification of complete arthropod mitochondrial genomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2001; 19(3): 345-52.

Ingman M, Gyllensten U. Rate variation between mitochondrial domains and adaptive evolution in humans. *Human Molecular Genetics*. 2007; 16(19): 2281-7.

Iriarte PF, Céspedes W, Santos M. Quantitative-genetic analysis of wing form and bilateral asymmetry in isochromosomal lines of *Drosophila subobscura* using Procrustes methods. *Journal of Genetics*. 2003; 82(3): 95-113.

Jirakanjanakit N, Leemingsawat S, Thongrungrat S, Apiwathnasorn C, Singhaniyom S, Bellec C, Dujardin JP. Influence of larval density or food variation on the geometry of the wing of *Aedes (Stegomyia) aegypti*. *Tropical Medicine & International Health*. 2007; 12(11): 1354-60.

Judd D. Review of the systematics and phylogenetic relationships of the Sabethini (Diptera: Culicidae). *Systematic Entomology*. 1996; 21(2): 129-50.

Karger A, Stock R, Ziller M, Elschner MC, Bettin B, Melzer F, Tomaso H. Rapid identification of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* by intact cell matrix-

assisted laser desorption/ionisation mass spectrometric typing. BMC Microbiology. 2012; 12(1): 229.

Kaufmann C, Ziegler D, Schaffner F, Carpenter S, Pflüger V, Mathis A. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry for characterization of *Culicoides nubeculosus* biting midges. Medical and Veterinary Entomology. 2011; 25(1): 32-8.

Kim MJ, Kang AR, Jeong HC, Kim KG, Kim I. Reconstructing intraordinal relationships in Lepidoptera using mitochondrial genome data with the description of two newly sequenced lycaenids, *Spindasis takanonis* and *Protantigius superans* (Lepidoptera: Lycaenidae). Molecular Phylogenetics and Evolution. 2011; 61(2): 436-45.

Kjer KM, Blahnik RJ, Holzenthal RW. Phylogeny of Trichoptera (caddisflies): characterization of signal and noise within multiple datasets. Systematic Biology. 2001; 50(6): 781-816.

Klingenberg CP. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. Molecular Ecology Resources. 2011; 11(2): 353-7.

Komoto N, Yukuhiro K, Ueda K, Tomita S. Exploring the molecular phylogeny of phasmids with whole mitochondrial genome sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution. 2011; 58(1): 43-52.

Krzywinski J, Wilkerson RC, Besansky NJ. Toward understanding Anophelinae (Diptera, Culicidae) phylogeny: insights from nuclear single-copy genes and the weight of evidence. Systematic Biology. 2001; 3: 540-56.

Krzywinski J, Wilkerson RC, Besansky NJ. Evolution of mitochondrial and ribosomal gene sequences in Anophelinae (Diptera: Culicidae): implications for phylogeny reconstruction. Molecular Phylogenetics and Evolution. 2001; 18(3): 479-87.

Krzywinski J, Grushko OG, Besansky NJ. Analysis of the complete mitochondrial DNA from *Anopheles funestus*: an improved dipteran mitochondrial genome annotation and a temporal dimension of mosquito evolution. Molecular Phylogenetics and Evolution. 2006; 39(2): 417-23.

Krzywinski J, Li C, Morris M, Conn JE, Lima JB, Pova MM, Wilkerson RC. Analysis of the evolutionary forces shaping mitochondrial genomes of a Neotropical malaria vector complex. Molecular Phylogenetics and Evolution. 2011; 58(3): 469-77.

Lanfear R, Calcott B, Ho SY, Guindon S. PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. Molecular Biology and Evolution. 2012; 29(6): 1695-1701.

Lee MSY. Hidden support from unpromising data sets strongly unites snakes with anguimorph 'lizards'. Journal of Evolutionary Biology. 2009; 22(6): 1308-16.

Lin CP, Danforth BN. How do insect nuclear and mitochondrial gene substitution patterns differ? Insights from Bayesian analyses of combined datasets. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2004; 30(3): 686-702.

Linares AR, Hancock JM, Dover GA. Secondary structure constraints on the evolution of *Drosophila* 28 S ribosomal RNA expansion segments. *Journal of Molecular Biology*. 1991; 219(3): 381-90.

Lockhart PJ, Howe CJ, Bryant DA, Beanland TJ, Larkum AWD. Substitutional bias confounds inference of cyanelle origins from sequence data. *Journal of Molecular Evolution*. 1992; 34(2): 153-62.

Lockwood CA, Lynch JM, Kimbel WH. Quantifying temporal bone morphology of great apes and humans: an approach using geometric morphometrics. *Journal of Anatomy*. 2002; 201(6): 447-64.

Logue K, Chan ER, Phipps T, Small ST, Reimer L, Henry-Halldin C, Serre D. Mitochondrial genome sequences reveal deep divergences among *Anopheles punctulatus* sibling species in Papua New Guinea. *Malaria Journal*. 2013; 12(1): 64.

Lorenz C, Marques TC, Sallum MAM, Suesdek L. Morphometrical diagnosis of the malaria vectors *Anopheles cruzii*, *An. homunculus* and *An. bellator*. *Parasites & Vectors*. 2012; 5(1), 257.

Lorenz C, Marques TC, Sallum MAM, Suesdek L. Altitudinal population structure and microevolution of the malaria vector *Anopheles cruzii* (Diptera: Culicidae). *Parasites & Vectors*. 2014; 7(1): 581.

Lorenz C, Patané JS, Suesdek L. Morphogenetic characterisation, date of divergence, and evolutionary relationships of malaria vectors *Anopheles cruzii* and *Anopheles homunculus*. *Infection, Genetics and Evolution*. 2015; 35: 144-52.

Lozovei AL, Silva MAN. Análise comparativa entre métodos alternativo e convencional para amostras de mosquitos obtidos a partir de habitats fitotélmicos (Bromeliaceae) na Floresta Atlântica, Serra do Mar, Paraná, Brasil. *Rev Bras Zool*. 1999; 16: 957-66.

MacLeod N, Forey PL. Phylogenetic signals in morphometric data. *Morphology, shape and phylogeny*. 2002; 100: 138.

Maddison WP. Gene trees in species trees. *Systematic Biology*. 1997; 46(3): 523-36.

Marcus L, Hingst-Zaher E, Zaher H. Application of landmark morphometrics to skulls representing the orders of living mammals. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*. 2000; 11(1): 34.

Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, Dewell SB. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*. 2005; 437(7): 376-80.

- Mathis A, Depaquit J, Dvořák V, Tuten H, Bañuls AL, Halada P, Volf P. Identification of phlebotomine sand flies using one MALDI-TOF MS reference database and two mass spectrometer systems. *Parasites & Vectors*. 2015; 8(1): 266.
- Meiswinkel R, Baldet T, De Deken R, Takken W, Delécolle JC, Mellor PS. The 2006 outbreak of bluetongue in northern Europe — the entomological perspective. *Preventive Veterinary Medicine*. 2008; 87(1): 55-63.
- Meyer A. Shortcomings of the cytochrome b gene as a molecular marker. *Trends in Ecology & Evolution*. 1994; 9(8): 278-80.
- Minh BQ, Nguyen MAT, von Haeseler A. Ultrafast approximation for phylogenetic bootstrap. *Molecular biology and evolution*. 2013. 4: 25.
- Miller BR, Crabtree MB, Savage HM. Phylogenetic relationships of the Culicomorpha inferred from 18S and 5.8 S ribosomal DNA sequences (Diptera: Nematocera). *Insect Molecular Biology*. 1997; 6(2): 105-14.
- Milne I, Bayer M, Cardle L, Shaw P, Stephen G, Wright F, Marshall D. Tablet—next generation sequence assembly visualization. *Bioinformatics*. 2010; 26(3): 401-2.
- Milne N, O'Higgins P. Inter-specific variation in *Macropus* crania: form, function and phylogeny. *Journal of Zoology*. 2002; 256(4): 523-35.
- Mitchell A, Sperling FA, Hickey DA. Higher-level phylogeny of mosquitoes (Diptera: Culicidae): mtDNA data support a derived placement for *Toxorhynchites*. *Insect Systematics & Evolution*. 2002; 33(2): 163-74.
- Monteiro LR, Reis SFD. *Princípios de Morfometria Geométrica*. Holos. 1999.
- Montooth KL, Abt DN, Hofmann JW, Rand DM. Comparative genomics of *Drosophila* mtDNA: novel features of conservation and change across functional domains and lineages. *Journal of Molecular Evolution*. 2009; 69(1): 94.
- Moore WS. Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. *Evolution*. 1995; 718-26.
- Morais SA, Almeida FD, Suesdek L, Marrelli MT. Low genetic diversity in Wolbachia-infected *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Brazil and Argentina. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2012; 54(6): 325-9.
- Mosquito Taxonomic Inventory, 2017 - <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/> [acesso em Jan/2017]
- Müller P, Pflüger V, Wittwer M, Ziegler D, Chandre F, Simard F, Lengeler C. Identification of cryptic *Anopheles* mosquito species by molecular protein profiling. *PLoS One*. 2013; 8(2): 86.
- Nardi F, Carapelli A, Fanciulli PP, Dallai R, Frati F. The complete mitochondrial DNA sequence of the basal hexapod *Tetrodontophora bielanensis*: evidence for

heteroplasmy and tRNA translocations. *Molecular Biology and Evolution*. 2001; 18(7): 1293-1304.

Nardi F, Carapelli A, Dallai R, Frati F. The mitochondrial genome of the olive fly *Bactrocera oleae*: two haplotypes from distant geographical locations. *Insect Molecular Biology*. 2003; 12(6): 605-11.

Navarro JC, Liria J. Phylogenetic relationships among eighteen Neotropical Culicini species. *Journal of American Mosquito Control Association*. 2000; 16(2): 75-85.

Nichols R. Gene trees and species trees are not the same. *Trends in Ecology & Evolution*. 2001; 16(7): 358-64.

Oliveira TMP, Foster PG, Bergo ES, Nagaki SS, Sanabani SS, Marinotti O, Sallum MAM. Mitochondrial Genomes of *Anopheles (Kerteszia)* (Diptera: Culicidae) From the Atlantic Forest, Brazil. *Journal of medical entomology*. 2016; 1:1-8

Olsen GJ, Woese CR. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *The FASEB Journal*, 1993; 7(1): 113-23.

Pabijan M, Spolsky C, Uzzell T, Szymura JM. Comparative analysis of mitochondrial genomes in *Bombina* (Anura; Bombinatoridae). *Journal of Molecular Evolution*. 2008; 67(3), 246-56.

Page RD. GeneTree: comparing gene and species phylogenies using reconciled trees. *Bioinformatics*. 1998; 14(9): 819-20.

Panchetti F, Scalici M, Carpaneto GM, Gibertini G. Shape and size variations in the cranium of elephant-shrews: a morphometric contribution to a phylogenetic debate. *Zoomorphology*. 2008; 127(2): 69-82.

Patterson JS, Klingenberg CP. Developmental buffering: how many genes?. *Evolution and Development*. 2007; 9(6): 525-6.

Peng Y, Leung HC, Yiu SM, Chin FY. IDBA-UD: a de novo assembler for single-cell and metagenomic sequencing data with highly uneven depth. *Bioinformatics*. 2012; 28(11): 1420-8.

Pereira ACN, Pereira Filho AA, Brito GA, Brito GA, Moraes JL, Rebêlo JM. First record of *Aedeomyia squamipennis* (Lynch Arribáizaga, 1878) (Diptera: Culicidae) in the state of Maranhão: epidemiological implications and distribution in Brazil. *Check List*. 2017; 13(2): 2084.

Perera MR, Vargas RDF, Jones MG. Identification of aphid species using protein profiling and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Entomologia experimentalis et applicata*. 2005; 117(3): 243-7.

Petersen V, Devicari M, Suesdek L. High morphological and genetic variabilities of *Ochlerotatus scapularis*, a potential vector of filarias and arboviruses. *Parasites & Vectors*. 2015; 8(1): 128.

Petersen JL, Linley JR. Description of the egg of *Aedeomyia squamipennis* (Diptera: Culicidae). Journal of medical entomology. 1995; 32(6): 888-94.

Pretorius E, Scholtz CH. Geometric morphometrics and the analysis of higher taxa: a case study based on the metendosternite of the Scarabaeoidea (Coleoptera). Biological Journal of the Linnean Society. 2001; 74(1): 35-50.

PubMed – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> - [acesso em Out/2016]

Rannala B, Yang Z. Phylogenetic inference using whole genomes. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2008; 9: 217-31.

Regier JC, Fang QQ, Mitter C, Peigler RS, Friedlander TP, Solis MA. Evolution and phylogenetic utility of the period gene in Lepidoptera. Molecular Biology and Evolution. 1998; 15(9): 1172-82.

Reidenbach KR, Cook S, Bertone MA, Harbach RE, Wiegmann BM, Besansky NJ. Phylogenetic analysis and temporal diversification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) based on nuclear genes and morphology. BMC Evolutionary Biology. 2009; 9(1): 298.

Reinert JF, Harbach RE, Kitching IJ. Phylogeny and classification of Aedini (Diptera: Culicidae), based on morphological characters of all life stages. Zoological Journal of the Linnean Society. 2004; 142(3): 289-368.

Reinert JF, Harbach RE, Kitching IJ. Phylogeny and classification of *Finlaya* and allied taxa (Diptera: Culicidae: Aedini) based on morphological data from all life stages. Zoological Journal of the Linnean Society. 2006; 148(1): 1-101.

Reinert JF, Harbach RE, Kitching IJ. Phylogeny and classification of *Ochlerotatus* and allied taxa (Diptera: Culicidae: Aedini) based on morphological data from all life stages. Zoological Journal of the Linnean Society. 2008; 153(1): 29-114.

Rieseberg LH, Whitton J, Linder CR. Molecular marker incongruence in plant hybrid zones and phylogenetic trees. Acta Botanica Neerlandica. 1996; 45(3): 243-62.

Mousseau TA, Roff DA. Natural selection and the heritability of fitness components. Heredity. 1987; 59(2): 181-97.

Rohlf FJ. Relative warp analysis and an example of its application to mosquito. Contributions to Morphometrics. 1993; 8: 131-60.

Rohlf FJ. TpsDig, digitize landmarks and outlines [Computer program]. Version 2.05. Department of Ecology and Evolution, State University of New York. Stony Brook; 2005.

Rohlf FJ. TpsRegr, shape regression [Computer program]. Version 1.28. Department of Ecology and Evolution, State University of New York. Stony Brook; 2003a.

Rohlf FJ. TpsRelw, relative warps analysis [Computer program]. Version 1.36. Department of Ecology and Evolution, State University of New York. Stony Brook; 2003b.

Rohlf FJ. TpsUtil, file utility program [Computer program]. Version 1.26. Department of Ecology and Evolution, State University of New York. Stony Brook; 2004.

Rokas A, Holland PW. Rare genomic changes as a tool for phylogenetics. *Trends in Ecology & Evolution*. 2000; 15(11): 454-9.

Ross P, Hall L, Smirnov I, Haff L. High level multiplex genotyping by MALDI-TOF mass spectrometry. *Nature Biotechnology*. 1999; 16(13): 1347-51.

Saccone C, De Giorgi C, Gissi C, Pesole G, Reyes A. Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. *Gene*. 1999; 238(1): 195-209.

Saito S, Tamura K, Aotsuka T. Replication origin of mitochondrial DNA in insects. *Genetics*. 2005; 171(4): 1695-705.

Sallum MAM, Schultz TR, Wilkerson RC. Phylogeny of Anophelinae (Diptera Culicidae) based on morphological characters. *Annals of the Entomological Society of America*. 2000; 93(4): 745-75.

Sallum MAM, Schultz TR, Foster PG, Aronstein K, Wirtz RA, Wilkerson RC. Phylogeny of Anophelinae (Diptera: Culicidae) based on nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequences. *Systematic Entomology*. 2002; 27(3): 361-82.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual* (Vol. 2). Cold spring harbor laboratory press. 1989.

Sandrin TR, Goldstein JE, Schumaker S. MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level: a review. *Mass spectrometry reviews*. 2013; 32(3): 188-217.

Sankoff D, Leduc G, Antoine N, Paquin B, Lang BF, Cedergren R. Gene order comparisons for phylogenetic inference: Evolution of the mitochondrial genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1993; 89(14): 6575-9.

Sauer S, Freiwald A, Maier T, Kube M, Reinhardt R, Kostrzewa M, Geider K. Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. *PloS one*. 2008; 3(7): 43.

Sauer S, Kliem M. Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. *Nature Reviews Microbiology*. 2010; 8(1): 74-82.

Schneider A, Ebert D. Covariation of mitochondrial genome size with gene lengths: evidence for gene length reduction during mitochondrial evolution. *Journal of Molecular Evolution*. 2004; 59(1): 90-6.

Shepard JJ, Andreadis TG, Vossbrinck CR. Molecular phylogeny and evolutionary relationships among mosquitoes (Diptera: Culicidae) from the northeastern United

States based on small subunit ribosomal DNA (18S rDNA) sequences. *Journal of Medical Entomology*. 2006; 43(3): 443-54.

Shultz JW, Regier JC. Phylogenetic analysis of arthropods using two nuclear protein-encoding genes supports a crustacean+ hexapod clade. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 2000; 267(1447): 1011-9.

Smith KL, Harmon LJ, Shoo LP, Melville J. Evidence of constrained phenotypic evolution in a cryptic species complex of agamid lizards. *Evolution*. 2011; 65(4): 976-92.

Smith JF. Phylogenetic signal common to three data sets: combining data which initially appear heterogeneous. *Plant Systematics and Evolution*. 2000; 221(3): 179-98.

Song H, Sheffield NC, Cameron SL, Miller KB, Whiting MF. When phylogenetic assumptions are violated: base compositional heterogeneity and among-site rate variation in beetle mitochondrial phylogenomics. *Systematic Entomology*. 2010; 35(3): 429-48.

Soto-Adames FN, Robertson HM, Berlocher SH. Phylogenetic utility of partial DNA sequences of G6pdh at different taxonomic levels in Hexapoda with emphasis on Diptera. *Annals of the Entomological Society of America*. 1994; 87(6): 723-36.

Stark J, Bonacum J, Remsen J, DeSalle R. The evolution and development of Dipteran wing veins: A Systematic Approach. *Annual Review of Entomology*. 1999; 44:97-129

StatSoft, Inc. Statistica for Windows [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc; . Available from: <http://www.statsoft.com>. 2004. [2016 ago 13].

Steffan WA, Evenhuis NL. Classification of the subgenus *Toxorhynchites* (Diptera: Culicidae) I. Australasian, eastern Palaearctic, and Oriental species-groups. *Journal of Medical Entomology*. 1985; 22(4): 421-46.

Stevens JR, Schofield CJ. Phylogenetics and sequence analysis—some problems for the unwary. *Trends in Parasitology*. 2003; 19(12): 582-8.

Strimmer K, Von Haeseler A. Likelihood-mapping: a simple method to visualize phylogenetic content of a sequence alignment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997; 94(13): 6815-9.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. 2011; 28(10): 2731-9.

Team AC. Adobe Photoshop CS3 classroom in a book. Bookman Editora.2009.

Tellam RL, Wijffels G, Willadsen P. Peritrophic matrix proteins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 1999; 29(2): 87-101.

Thompson JD, Gibson T, Higgins DG. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Current Protocols in Bioinformatics*. 2002; 2-3.

Timmermans MJ, Vogler AP. Phylogenetically informative rearrangements in mitochondrial genomes of Coleoptera, and monophyly of aquatic elateriform beetles (Dryopoidea). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2012; 63(2): 299-304.

Tyers M, Mann M. From genomics to proteomics. *Nature*. 2003; 422(6928): 193-7.

Vaidya G, Lohman DJ, Meier R. SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. *Cladistics*. 2011; 27(2): 171-80.

Vesgueiro FT, Demari-Silva B, Malafronte RDS, Sallum MAM, Marrelli MT. Intragenomic variation in the second internal transcribed spacer of the ribosomal DNA of species of the genera *Culex* and *Lutzia* (Diptera: Culicidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2011; 106(1): 1-8.

Vidal PO, Peruzin MC, Suesdek L. Wing diagnostic characters for *Culex quinquefasciatus* and *Culex nigripalpus* (Diptera, Culicidae). *Revista Brasileira de Entomologia*. 2011; 55(1): 134-7.

Volz K. A test case for structure-based functional assignment: The 1.2 Å crystal structure of the yjgF gene product from *Escherichia coli*. *Protein Science*. 1999; 8(11): 2428-37.

Walker JE. The mitochondrial transporter family. *Current Opinion in Structural Biology*. 1992; 2(4): 519-26.

Ward RA. Culicidae. Aquatic biota of Mexico, Central America and the West Indies San Diego, CA: San Diego State University. 1982.

Warscheid B, Jackson K, Sutton C, Fenselau C. MALDI analysis of *Bacilli* in spore mixtures by applying a quadrupole ion trap time-of-flight tandem mass spectrometer. *Analytical Chemistry*. 2003; 75(20): 5608-17.

Wheeler WC, Whiting M, Wheeler QD, Carpenter JM. The phylogeny of the extant hexapod orders. *Cladistics*. 2001; 17(2): 113-69.

Whiting MF. Phylogeny of the holometabolous insect orders: molecular evidence. *Zoologica Scripta*. 2002; 31(1): 3-15.

Wiegmann BM, Tsaur SC, Webb DW, Yeates DK, Cassel BK. Monophyly and relationships of the Tabanomorpha (Diptera: Brachycera) based on 28S ribosomal gene sequences. *Annals of the Entomological Society of America*. 2000; 93(5): 1031-8.

Wood DM. Phylogeny and classification of the Nematocera. *Manual of Nearctic Diptera*. 1989; 3: 1333-70.

Wootton RJ. Functional morphology of insect wings. *Annual Review of Entomology*. 1992; 37(1): 113-40.

Yakovchuk P, Protozanova E, Frank-Kamenetskii MD. Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix. *Nucleic Acids Research*. 2006; 34(2): 564-74.

Yssouf A, Flaudrops C, Drali R, Kernif T, Socolovschi C, Berenger JM, Parola P. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for rapid identification of tick vectors. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013; 51(2): 522-8.

Yssouf A, Almeras L, Berenger JM, Laroche M, Raoult D, Parola P. Identification of tick species and disseminate pathogen using hemolymph by MALDI-TOF MS. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 2015; 6(5): 579-86.

Zelditch ML, Fink WL, Swiderski DL. Morphometrics, homology, and phylogenetics: quantified characters as synapomorphies. *Systematic Biology*. 1995; 44(2): 179-89.

Zelditch ML, Fink WL, Swiderski DL, Lundrigan BL. On applications of geometric morphometrics to studies of ontogeny and phylogeny: a reply to Rohlf. *Systematic Biology*. 1998; 47(1): 159-67.

Zelditch ML, Swiderski DL, Fink WL. Discovery of phylogenetic characters in morphometric data. *Phylogenetic Analysis of Morphological Data*. Smithsonian Institution Press, Washington. 2000; 37-83.

Zellner M, Winkler W, Hayden H, Diestinger M, Eliassen M, Gesslbauer B, Oehler R. Quantitative validation of different protein precipitation methods in proteome analysis of blood platelets. *Electrophoresis*. 2005; 26(12): 2481-9.