

Rafael de Oliveira Christe

Estudos sistemáticos do subgênero *Microculex* de *Culex* (Diptera:  
Culicidae) ocorrentes no Brasil

Tese apresentada à Faculdade de Medicina  
da Universidade de Paulo para obtenção do  
título de Doutor em Ciências

Programa de Medicina Tropical

Área de concentração: Doenças Tropicais e  
Saúde Internacional

Orientador: Prof. Dr. Mauro Toledo  
Marrelli

São Paulo

2022

Rafael de Oliveira Christe

Estudos sistemáticos do subgênero *Microculex* de *Culex* (Diptera:  
Culicidae) ocorrentes no Brasil

Tese apresentada à Faculdade de Medicina  
da Universidade de Paulo para obtenção do  
título de Doutor em Ciências

Programa de Medicina Tropical

Área de concentração: Doenças Tropicais e  
Saúde Internacional

Orientador: Prof. Dr. Mauro Toledo  
Marrelli

São Paulo

2022

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Oliveira Christie, Rafael de  
Estudos sistemáticos do subgênero *Microculex* de  
*Culex* (Diptera: Culicidae) ocorrentes no Brasil /  
Rafael de Oliveira Christie. -- São Paulo, 2022.  
Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.  
Programa de Medicina Tropical. Área de  
Concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional.  
Orientador: Mauro Toledo Marrelli.

Descritores: 1.Entomologia 2.Ecologia 3.Culex  
4.Taxonomia 5.Morfometria geométrica alar  
6.Urbanização 7.Culicidae

USP/FM/DBD-138/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Às minhas avós (In Memoriam): Maria Reimberg Christe, por guardar pedaços de bolo e ensinar sobre insetos; Diolinda Cavalcante de Oliveira, por seu exemplo de força, coragem e perseverança. À ambas, por proporcionarem os pais companheiros e apoiadores que tenho.

## Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Mauro Toledo Marrelli pela oportunidade de ingressar no mundo da pesquisa, inicialmente no Programa de Aprimoramento Profissional (FUNDAP) e sequencialmente em todo o caminho da pós-graduação.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão da bolsa de doutorado (Processo: 2017/02342) e pelas duas prorrogações ao prazo original de finalização desta tese, em razão dos prejuízos decorrentes da pandemia de Covid-19.

Meus préstimos aos biólogos técnicos da Faculdade de Saúde Pública. Dr<sup>a</sup> Márcia Bicudo de Paula, pelo incentivo e palavras de apoio e Dr. Paulo Roberto Urbinatti pela amizade e cessão de material comparativo. Especial agradecimento à Msc. Denise Sant’ana, pelo auxílio na consulta ao material pertencente à Coleção de Referência da Faculdade de Saúde Pública.

Agradeço a todos os amigos que o Laboratório de Entomologia em Saúde Pública me proporcionou. Dr. Daniel Pagotto Vendrami, Dr<sup>a</sup> Gabriela Carvalho, Msc. Eduardo Evangelista. Estes, que presenciaram os primeiros passos da presente tese. Dr. Walter Ceretti-Junior, e futuro Doutor, Ramon Wilk-da-Silva. Estes, não apenas testemunhas da condução deste trabalho, mas companheiros em atividades de campo e congressos, conceitualização, escrita de artigos, longas e esclarecedoras conversas na hora do café.

Especial agradecimento ao amigo Dr. Antonio Ralph Medeiros de Sousa, companheiro de cervejas, cafés, travessias transoceânicas, exploração de abrigos da Segunda Guerra, escalada de vulções, visitas a castelos medievais, negociações no Gran Bazar, coletas de campo e valiosos conselhos científicos

Meus agradecimentos à Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Anice Mureb Sallum pelos valiosos comentários, sugestões, correções, puxões de orelha e encorajamento na condução deste trabalho.

Agradeço ao meu primo, Luiz Fernando Christe Roschel por permitir minha estadia em suas casas, uma no Condomínio Vale das Fontes, Distrito de Embú-Guaçu e outra no Condomínio Jardim Pernambuco II, Guarujá, de onde importante percentual do material desta tese foi obtido em coletas de campo.

Agradeço ao meu pai, Antonio Reimberg Christe e meu irmão, Eduardo de Oliveira Christe, por me fazerem companhia em muitas (e arriscadas) ocasiões de coleta. Agradeço à minha mãe, Marlene Aparecida de Oliveira Christe, por me ceder boa parte da casa para acomodar meus utensílios de coleta de campo e criação de mosquitos.

Agradeço a minha irmã (quase filha), Victoria Beatriz de Oliveira Christe, por sempre ter preenchido minha vida de uma forma que não consigo expressar em palavras, e por ter proporcionado a Helena, que é como presenciar a viagem no tempo que sempre quis fazer.

Agradeço a meus sogros, Melita Batista e Adimar Batista, por literalmente me cederem um quarto da casa para instalação de um laboratório entomológico

emergencial, em razão das restrições impostas pela pandemia de Covid-19. Sem este apoio crucial, não seria exagero dizer que esta tese não contemplaria todos os objetivos propostos em sua fundamentação.

Aos meus amigos de 4 patas que se foram durante o período do doutorado: *Pépe* e *Dodô*, que foram responsáveis por belas risadas e tornavam o ambiente da casa da minha mãe muito mais engraçado.

Minha imensa gratidão ao biólogo Arístides Fernandes, ex-técnico do Laboratório de Entomologia em Saúde Pública. Grande mestre, a quem devo não apenas a ideia original desta tese, como também toda inspiração para iniciar a jornada na taxonomia de culicídeos.

Por fim agradeço à minha esposa, Lilian Batista Christe, que participou da primeira coleta solitária (e perigosa) deste projeto e muitas outras. Obrigado por compartilhar das alegrias e tristezas comigo. Senão para isso, para quê haveria de ser? Sem o seu apoio e paciência certamente não teria chego até aqui.

A César Batista Bento Reimberg Christe (In memoriam), nunca esquecerei o *por quê*.

“Se consegui enxergar mais longe, foi porque me apoiei nos ombros de gigantes”

Isaac Newton

## RESUMO

Oliveira-Christe R. *Estudos sistemáticos do subgênero Microculex de Culex (Diptera: Culicidae) ocorrentes no Brasil* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

Os mosquitos do subgênero *Microculex* de *Culex* (Diptera: Culicidae) pertencem a um grupo composto de espécies associadas quase que exclusivamente a bromélias como seus criadouros principais. Nas últimas décadas é notável a presença e aumento desordenado da ocupação humana em áreas silvestres e de proteção ambiental. Conforme esse processo de invasão avança, o ser humano entra em contato com organismos que antes permaneciam restritos ao ambiente selvagem. Apesar de nenhuma espécie deste subgênero ser incriminada como vetora de agentes etiológicos para humanos, seu papel na manutenção de ciclos enzoóticos é completamente desconhecido e estudos que tratam de sua taxonomia e de seus aspectos ecológicos carecem de informações. Baseado nessas premissas, o intuito deste trabalho foi verificar a validade da técnica da morfometria geométrica alar na identificação de espécies *Microculex*; avaliar a existência de padrão de dispersão dos mosquitos deste subgênero em gradientes de cobertura vegetal e propor nova chave dicotômica de genitálias masculinas. A morfometria geométrica alar mostrou-se eficaz na distinção das espécies *Culex (Microculex) imitator*; *Cx. (Mcx.) worontzowi*; *Cx. (Mcx.) pleuristriatus*; *Cx. (Mcx.) albipes* e *Cx. (Mcx.) lanei*. Os resultados são baseados no uso de 18 marcos anatômicos das asas por meio do software MorphoJ 1.02, onde a Análise de Variável Canônica (CVA) e o teste de reclassificação se mostraram indicados para determinar o padrão do formato alar de cada espécie. A variação nas Distâncias de Mahalanobis foi de 4.404 – 6.3171, com significância estatística ( $p < 0,001$ ). O tamanho do Centróide foi mensurado através e regressão multivariada (10.000 randomizações) tendo significância estatística ( $p < 0,0001$ ). O padrão de dispersão *Microculex* em gradientes de cobertura vegetal foi avaliado por meio do Índice de Sorensen. A média de abundância larvária e a densidade larvária foram utilizadas como variáveis resposta. Modelos de Efeito-Misto foram utilizados a partir das pseudo-réplicas amostrais. Os valores de cobertura vegetal dos pontos de coleta (60%, 70% e 90%) foram adotados como efeitos fixos. Os resultados apontam *Cx. (Mcx.) imitator* foi a espécie mais abundante, enquanto as espécies pertencentes à Serie *Pleuristriatus* é a melhor adaptada à criadouros artificiais, havendo, provavelmente existência de processo evolutivo-adaptativo nestas espécies. O

estudo morfológico das genitálias masculinas demonstrou avanço na pesquisa taxonômica deste subgênero, conseguindo expor a importância da correta dissecação e observação de estruturas morfológicas antes pouco exploradas, tais como esclerito do edeago (AeS) e placa lateral (PL). Através de ilustrações técnicas foi possível redescrever a genitálias de 22 espécies e organizar nova chave dicotômica ilustrada. Devido ao grau de variação encontrado, é proposta a existência de um complexo de espécies em *Cx. (Mcx.) neglectus*, perfazendo o Complexo Neglectus. A distinção entre as espécies *Cx. pleuristriatus* e *Cx. albipes* foi sugerida. O encontro de espécies que não correspondem às descrições e orientações das chaves existentes pressupõem a existência de espécies desconhecidas.

**Descritores:** Entomologia; Ecologia; Culex; Taxonomia; Morfometria geométrica alar; Urbanização; Culicidae.

## ABSTRACT

Oliveira-Christe R. *Taxonomics studies of the Microculex subgenus (Diptera: Culicidae) occurring in Brazil* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2022.

The subgenus *Microculex* of *Culex* (Diptera: Culicidae) are a mosquitoes group composed for species almost exclusively associated with bromeliads as their main breeding sites. In recent decades, the presence and disorderly increase of human occupation in wild and environmental protection areas is remarkable. As this invasion process progresses, humans come into contact with organisms that were previously restricted to the wild. Although no species in this subgenus are incriminated as etiological agents vector for humans, its role in the maintenance of enzootic cycles is completely unknown and studies dealing with its taxonomy and ecological aspects have lack of information. Based on these premises, the aim of this work was to verify the validity of the wing geometric morphometric morphometry technique in the identification of *Microculex* species; to evaluate the existence of a pattern of dispersion of mosquitoes of this subgenus in gradients of vegetation cover and to propose a new dichotomous key of male genitalia. The geometric wing morphometric proved to be effective in species distinguishing *Culex (Microculex) imitator*; *Cx. (Mcx.) worontzowi*; *Cx. (Mcx.) pleuristriatus*, *Cx. (Mcx.) albipes* e *Cx. (Mcx.) lanei*. The results are based on the use of 18 anatomical landmarks of wings through the MorphoJ 1.02 Software, where the Canonical Variable Analysis (CVA) and the reclassification test were indicated to determine the pattern of the wing shape of each species. The variation in Mahalanobis Distances was 4.404 – 6.3171, with statistical significance ( $p < 0.001$ ). Centroid-Size was measured using multivariate regression (10,000 randomizations) with statistical significance ( $p < 0.0001$ ). The pattern of *Microculex* dispersion in gradients vegetation cover was evaluated using the Sorensen Index. Mean larval abundance and larval density were used as response variables. Mixed-Effect Models were used from the sample pseudo-replicates. The vegetation cover values of collection sites (60%, 70% and 90%) were adopted as Fixed Effects. The results appointed to *Cx. (Mcx.) imitator* was the most abundant species, while the species belonging to the Series Pleuristriatus are the best adapted to artificial breeding sites, and there is probably an evolutionary-adaptive process in these species. The morphological study of male genitalia has demonstrated progress in the taxonomic research of *Microculex*, managing to expose the

importance of correct dissection and observation of morphological structures previously little explored, such as aedeagus sclerite (AeS) and lateral plate (PL). Through technical illustrations, it was possible to redescribe the genitalia of 23 species and organize a new illustrated dichotomous key. Due to degree of variation found, the existence of a species complex in *Cx. (Mcx.) neglectus*, making up the Neglectus Complex. The distinction between the species *Cx. pleuristriatus* and *Cx. albipes* was suggested. The finding of species that do not correspond to the descriptions and orientations of the existing keys presupposes the unknown species existence.

**Descriptors:** Entomology; Ecology; Culex; Taxonomy; Culicidae; Geometric wing morphometric; Urbanization; Culicidae.

## Índice

RESUMO

ABSTRACT

Lista de figuras.....	15
Lista de tabelas.....	19
Lista de abreviaturas.....	20
1 INTRODUÇÃO.....	21
1.1 Gênero <i>Culex</i> Linnaeus.....	22
1.1.2 Subgênero <i>Microculex</i> Theobald.....	23
1.2 Associação com Bromélias.....	23
1.3 História taxonômica do subgênero <i>Microculex</i> .....	26
1.4 Histórico de <i>Microculex</i> em coletas entomológicas, adaptação a ambientes impactados e problemas taxonômicos.....	34
1.5 Taxonomia da genitália masculina em Culicidae.....	38
1.6 Morfometria Geométrica Alar.....	39
1.7 Distribuição de mosquitos em Gradientes de Cobertura Vegetal.....	41
2 OBJETIVO.....	42
2.1 Objetivos específicos.....	42
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.1 Procedimento de coleta em campo e monitoramento em ambiente laboratorial..	43
3.2 Preparação e montagem das genitálias masculinas.....	46
3.3 Análise morfológica das genitálias masculinas.....	48
3.4 Ilustrações.....	48
3.5 Extração das asas e preparação das lâminas.....	49
3.6 Dispersão das espécies na Cobertura Vegetal.....	50
4 RESULTADOS.....	55
4.1 Morfometria geométrica alar.....	54
4.2 Distribuição de <i>Microculex</i> na Cobertura Vegetal.....	59
4.3 Taxonomia das genitálias masculinas.....	65
4.4 Estudo morfológico.....	66

4.5 Redescritção das genitálias masculinas do subgênero <i>Microculex</i> .....	66
<i>Culex (Microculex) imitator</i> Theobald, 1903.....	67
<i>Culex (Microculex) imitator retrosus</i> Lane & Whitman, 1951.....	70
<i>Culex (Microculex) dubitans</i> Lane & Whitman, 1951.....	73
<i>Culex (Microculex) pleuristriatus</i> Theobald, 1903.....	76
<i>Culex (Microculex) albipes</i> Lutz, 1904.....	79
<i>Culex (Microculex) lanei</i> Coutinho & Forattini, 1962.....	82
<i>Culex (Microculex) aureus</i> Lane & Whitman, 1951.....	85
<i>Culex (Microculex) intermedius</i> Lane & Whitman, 1951.....	88
<i>Culex (Microculex) davisi</i> Kumm, 1933.....	91
<i>Culex (Microculex) worontzowi</i> Pessoa & Galvão, 1936.....	94
<i>Culex (Microculex) reducens</i> Lane & Whitman, 1951.....	97
<i>Culex (Microculex) hedys</i> Root, 1927.....	100
<i>Culex (Microculex) aphyllactus</i> Root, 1927.....	103
<i>Culex (Microculex) inimitabilis</i> Dyar & Knab, 1906.....	106
<i>Culex (Microculex) fuscatus</i> Lane & Whitman, 1951.....	109
<i>Culex (Microculex) neglectus</i> Lutz, 1904.....	112
<i>Culex (Microculex) neglectus</i> Sp1.....	115
<i>Culex (Microculex) neglectus</i> Sp2.....	118
<i>Culex (Microculex) neglectus</i> Sp3.....	121
<i>Culex (Microculex) elongatus</i> Rozeboom & Komp, 1950.....	125
<i>Culex (Microculex)</i> Sp1.....	128
<i>Culex (Microculex)</i> Sp2.....	131
5. Chave de identificação das espécies de <i>Microculex</i> baseado nas genitálias masculinas.....	134
6. DISCUSSÃO.....	157
7. CONCLUSÕES.....	169
8. REFERÊNCIAS.....	170
APÊNDICES.....	179

APÊNDICE A: Artigo publicado na revista Acta Tropica. “Distribution of *Culex (Microculex)* in forest cover gradients” – OLIVEIRA-CHRISTE R et al, 2019

APÊNDICE B: Artigo publicado na revista Journal of Vector Ecology. “Using geometric morphometric analysis of wings to identify mosquito species from the subgenus *Microculex* (Diptera: Culicidae)” – OLIVEIRA-CHRISTE R & Marrelli MT, 2021.

## Lista de Figuras

**Figura 1:** Vegetal Bromeliacea. (Fonte: Oliveira-Christe R).

**Figura 2:** Espécimes adultos, exúvia das larvas e pupas separados e identificados individualmente.

**Figura 3:** Lâminas utilizadas para o estudo taxonômico das genitálias masculinas do subgênero *Microculex*.

**Figura 4:** Mapa indicando a localização dos pontos de coleta das espécies de *Microculex* na Cidade de São Paulo. Os espaços preenchidos pela cor verde representam a cobertura vegetal típica da região da APA Capivari-Monos (Floresta ombrófila densa ou floresta heterogênea). Os espaços em branco fazem menção as regiões afetadas pela atividade humana (ruas, propriedades rurais e bairros). As sinalizações em forma de “cruz” apontam para os locais onde as coletas foram efetivamente executadas. Os círculos representam os “buffers” de 1km estabelecidos como margem de comparação entre os locais. O mapa foi gerado a partir do software QGIS v2.18.9 ([www.qgis.org](http://www.qgis.org)). Adaptado de Oliveira-Christe et al., 2019).

**Figura 5:** Representação do morfoespaço produzida pelas Variáveis Canônicas encontradas no formato alar das espécies de *Microculex*. **A)** Comparação entre as CVA das cinco espécies do Subgênero *Microculex*. **B)** Comparação das CVA das três espécies pertencentes ao Grupo *Pleuristriatus*.

**Figura 6: Wireframe baseado na sobreposição da Variável Canônica 1.** Linha Azul: Representa a média das variações encontradas nas espécies. Linha Azul Escuro: Representação da variação encontrada na CV1. **A)** *Cx. (Mcx.) imitator*, *Cx. (Mcx.) worontzowi*, *Cx.(Mcx.) pleuristriatus*, *Cx. (Mcx.) albipes* e *Cx.(Mcx.) lanei*. **B)** *Cx. (Mcx.) imitator*, *Cx. (Mcx.) worontzowi*. **C)** *Cx.(Mcx.) pleuristriatus*, *Cx. (Mcx.) albipes* e *Cx. (Mcx.) lanei*.

**Figura 7:** Gráfico expondo a variação no índice de densidade larvária (a, c, e) como também a abundância larvária (b,d, f) das espécies do subgênero *Microculex* em relação a proporção de cobertura vegetal. As linhas escuras representam a média prevista; linhas acidentadas representam a variação esperada, em relação aos meses do ano. Predições referentes a *Cx. (Mcx.) imitator* são mostradas em a e b; predições para *Cx. (Mcx.) pleuristriatus* são exibidas em c e d; predições que envolvem todo o subgênero são expostas em e e f.

**Figura 8:** Genitália masculina de *Culex (Microculex) imitator*. Gc - gonocoxito, Gs – gonóstilo, dSL – divisão distal do lobo subapical, pSL – divisão proximal do lobo subapical. GC – garra do gonóstilo. Lateral – vista lateral, Medial – vista medial. X-TL – lobos IX tergito. Falósoma: AeS- esclerito do edeago, LP – placa lateral. Proctiger: BP – placa basal. X-Te – X tergito.

**Figura 9:** Genitália masculina de *Culex (Microculex) imitator retrosus* Gc - gonocoxito, Gs – gonóstilo, dSL – divisão distal do lobo subapical, pSL – divisão proximal do lobo subapical. GC – garra do gonóstilo. Lateral – vista lateral, Medial – vista medial. X-TL – lobos IX tergito. Falósoma: AeS- esclerito do edeago, LP – placa lateral. Proctiger: BP – placa basal. X-Te – X tergito.

**Figura 10:** Genitália masculina de *Culex (Microculex) dubitans*. Gc - gonocoxito, Gs - gonóstilo, dSL - divisão distal do lobo subapical, pSL - divisão proximal do lobo subapical. GC - garra do gonóstilo. Lateral - vista lateral, Medial - vista medial. X-TL - lobos IX tergito. Falósoma: AeS- esclerito do edeago, LP - placa lateral. Proctiger: BP - placa basal. X-Te - X tergito.

**Figura 11:** Genitália masculina de *Culex (Microculex) pleuristriatus*. Gc - gonocoxito, Gs - gonóstilo, dSL - divisão distal do lobo subapical, pSL - divisão proximal do lobo subapical. GC - garra do gonóstilo. Lateral - vista lateral, Medial - vista medial. X-TL - lobos IX tergito. Falósoma: AeS- esclerito do edeago, LP - placa lateral. Proctiger: BP - placa basal. X-Te - X tergito.

**Figura 12:** Genitália masculina de *Culex (Microculex) albipes*. Gc - gonocoxito, Gs - gonóstilo, dSL - divisão distal do lobo subapical, pSL - divisão proximal do lobo subapical. GC - garra do gonóstilo. Lateral - vista lateral, Medial - vista medial. X-TL - lobos IX tergito. Falósoma: AeS- esclerito do edeago, LP - placa lateral. Proctiger: BP - placa basal. X-Te - X tergito.

**Figura 13:** Genitália masculina de *Culex (Microculex) lanei*. Gc - gonocoxito, Gs - gonóstilo, dSL - divisão distal do lobo subapical, pSL - divisão proximal do lobo subapical. GC - garra do gonóstilo. Lateral - vista lateral, Medial - vista medial. X-TL - lobos IX tergito. Falósoma: AeS- esclerito do edeago, LP - placa lateral. Proctiger: BP - placa basal. X-Te - X tergito.

**Figura 14:** Genitália masculina de *Culex (Microculex) aureus*. Gc - gonocoxito, Gs - gonóstilo, dSL - divisão distal do lobo subapical, pSL - divisão proximal do lobo subapical. GC - garra do gonóstilo. Lateral - vista lateral, Medial - vista medial. X-TL - lobos IX tergito. Falósoma: AeS- esclerito do edeago, LP - placa lateral. Proctiger: BP - placa basal. X-Te - X tergito.

**Figura 15:** Genitália masculina de *Culex (Microculex) intermedius*. Gc - gonocoxito, Gs - gonóstilo, dSL - divisão distal do lobo subapical, pSL - divisão proximal do lobo subapical. GC - garra do gonóstilo. Lateral - vista lateral, Medial - vista medial. X-TL - lobos IX tergito. Falósoma: AeS- esclerito do edeago, LP - placa lateral. Proctiger: BP - placa basal. X-Te - X tergito.

**Figura 16:** Genitália masculina de *Culex (Microculex) davisi*. Gc - gonocoxito, Gs - gonóstilo, dSL - divisão distal do lobo subapical, pSL - divisão proximal do lobo subapical. GC - garra do gonóstilo. Lateral - vista lateral, Medial - vista medial. X-TL - lobos IX tergito. Falósoma: AeS- esclerito do edeago, LP - placa lateral. Proctiger: BP - placa basal. X-Te - X tergito.

**Figura 17:** Genitália masculina de *Culex (Microculex) worontzowi*. Gc - gonocoxito, Gs - gonóstilo, dSL - divisão distal do lobo subapical, pSL - divisão proximal do lobo subapical. GC - garra do gonóstilo. Lateral - vista lateral, Medial - vista medial. X-TL - lobos IX tergito. Falósoma: AeS- esclerito do edeago, LP - placa lateral. Proctiger: BP - placa basal. X-Te - X tergito.

**Figura 18:** Genitália masculina de *Culex (Microculex) reducens*. Gc - gonocoxito, Gs – gonóstilo, dSL – divisão distal do lobo subapical, pSL – divisão proximal do lobo subapical. GC – garra do gonóstilo. Lateral – vista lateral, Medial – vista medial. X-TL – lobos IX tergito. Falósoma: AeS- esclerito do edeago, LP – placa lateral. Proctiger: BP – placa basal. X-Te – X tergito.

**Figura 19:** Genitália masculina de *Culex (Microculex) hedys*. Gc - gonocoxito, Gs – gonóstilo, dSL – divisão distal do lobo subapical, pSL – divisão proximal do lobo subapical. GC – garra do gonóstilo. Lateral – vista lateral, Medial – vista medial. X-TL – lobos IX tergito. Falósoma: AeS- esclerito do edeago, LP – placa lateral. Proctiger: BP – placa basal. X-Te – X tergito.

**Figura 20:** Genitália masculina de *Culex (Microculex) aphyllactus*. Gc - gonocoxito, Gs – gonóstilo, dSL – divisão distal do lobo subapical, pSL – divisão proximal do lobo subapical. GC – garra do gonóstilo. Lateral – vista lateral, Medial – vista medial. X-TL – lobos IX tergito. Falósoma: AeS- esclerito do edeago, LP – placa lateral. Proctiger: BP – placa basal. X-Te – X tergito.

**Figura 21:** Genitália masculina de *Culex (Microculex) inimitabilis*. Gc - gonocoxito, Gs – gonóstilo, dSL – divisão distal do lobo subapical, pSL – divisão proximal do lobo subapical. GC – garra do gonóstilo. Lateral – vista lateral, Medial – vista medial. X-TL – lobos IX tergito. Falósoma: AeS- esclerito do edeago, LP – placa lateral. Proctiger: BP – placa basal. X-Te – X tergito.

**Figura 22:** Genitália masculina de *Culex (Microculex) fuscatus*. Gc - gonocoxito, Gs – gonóstilo, dSL – divisão distal do lobo subapical, pSL – divisão proximal do lobo subapical. GC – garra do gonóstilo. Lateral – vista lateral, Medial – vista medial. X-TL – lobos IX tergito. Falósoma: AeS- esclerito do edeago, LP – placa lateral. Proctiger: BP – placa basal. X-Te – X tergito.

**Figura 23:** Genitália masculina de *Culex (Microculex) neglectus*. Gc - gonocoxito, Gs – gonóstilo, dSL – divisão distal do lobo subapical, pSL – divisão proximal do lobo subapical. GC – garra do gonóstilo. Lateral – vista lateral, Medial – vista medial. X-TL – lobos IX tergito. Falósoma: AeS- esclerito do edeago, LP – placa lateral. Proctiger: BP – placa basal. X-Te – X tergito.

**Figura 24:** Genitália masculina de *Culex (Microculex) neglectus* sp.1. Gc - gonocoxito, Gs – gonóstilo, dSL – divisão distal do lobo subapical, pSL – divisão proximal do lobo subapical. GC – garra do gonóstilo. Lateral – vista lateral, Medial – vista medial. X-TL – lobos IX tergito. Falósoma: AeS- esclerito do edeago, LP – placa lateral. Proctiger: BP – placa basal. X-Te – X tergito.

**Figura 25:** Genitália masculina de *Culex (Microculex) neglectus* sp.2. Gc - gonocoxito, Gs – gonóstilo, dSL – divisão distal do lobo subapical, pSL – divisão proximal do lobo subapical. GC – garra do gonóstilo. Lateral – vista lateral, Medial – vista medial. X-TL – lobos IX tergito. Falósoma: AeS- esclerito do edeago, LP – placa lateral. Proctiger: BP – placa basal. X-Te – X tergito.

**Figura 26:** Genitália masculina de *Culex (Microculex) neglectus* sp.3. Gc - gonocoxito, Gs – gonóstilo, dSL – divisão distal do lobo subapical, pSL – divisão proximal do lobo subapical. GC – garra do gonóstilo. Lateral – vista lateral, Medial – vista medial. X-TL – lobos IX tergito. Falósoma: AeS- esclerito do edeago, LP – placa lateral. Proctiger: BP – placa basal. X-Te – X tergito.

**Figura 27:** Genitália masculina de *Culex (Microculex) elongatus*. Gc - gonocoxito, Gs – gonóstilo, dSL – divisão distal do lobo subapical, pSL – divisão proximal do lobo subapical. GC – garra do gonóstilo. Lateral – vista lateral, Medial – vista medial. X-TL – lobos IX tergito. Falósoma: AeS- esclerito do edeago, LP – placa lateral. Proctiger: BP – placa basal. X-Te – X tergito.

**Figura 28:** Genitália masculina *Culex (Microculex)* sp.1 próximo *stonei*. Gc - gonocoxito, Gs – gonóstilo, dSL – divisão distal do lobo subapical, pSL – divisão proximal do lobo subapical. GC – garra do gonóstilo. Lateral – vista lateral, Medial – vista medial. X-TL – lobos IX tergito. Falósoma: AeS- esclerito do edeago, LP – placa lateral. Proctiger: BP – placa basal. X-Te – X tergito.

**Figura 29:** Genitália masculina *Culex (Microculex)* Sp2. Gc - gonocoxito, Gs – gonóstilo, dSL – divisão distal do lobo subapical, pSL – divisão proximal do lobo subapical. GC – garra do gonóstilo. Lateral – vista lateral, Medial – vista medial. X-TL – lobos IX tergito. Falósoma: AeS- esclerito do edeago, LP – placa lateral. Proctiger: BP – placa basal. X-Te – X tergito.

## Lista de Tabelas

**Tabela 1:** Espécies de *Microculex* conhecidas, determinação de Série, descritores, localidades-tipo, distribuição conhecida e último estudo taxonômico realizado.

**Tabela 2:** Relação das lâminas cedidas para estudo comparativo das genitálias masculinas.

**Tabela 3:** Espécies de *Microculex* utilizadas e seu número amostral (N)

**Tabela 4:** Valores e significância estatística das Distâncias de Mahalanobis.

**Tabela 5:** Valores (%) referentes a Validação Cruzada das cinco espécies de *Microculex*.

**Tabela 6:** Espécies de *Culex (Microculex)* coletados entre Março/2015 – Abril/2017, de acordo com a localidade e o criadouro documentado.

**Tabela 7:** Índice de Similaridade de Sorensen esboçando a similaridade de espécies entre os locais investigados

**Tabela 8:** Valores dos parâmetros usados nos Modelos de Efeito Misto para investigar a densidade e abundância larvária do subgênero *Microculex* em relação a variação na proporção de cobertura vegetal. Os valores de P indicam a significância entre os ambientes com “baixa”, “moderada” e “alta” cobertura vegetal. O desvio-padrão estimado é exposto entre parênteses.

**Tabela 9:** Identificação, período, local e município de realização das coletas de campo.

## **Lista de Abreviaturas**

Gc – Gonocoxito

Gs- Gonóstilo

GC – Garra do Gonóstilo

dSL - Divisão distal do lobo subapical

pSL – Divisão proximal do lobo subapical

IX-TL – Lobos do IX tergito

AeS – Esclerito do edeago

LP – Placa lateral

BP – Placa basal.

X-Te – X tergito

♀ - Fêmea

♂ - Macho

G♂ - Genitália masculina

Le – Exúvia larval

Pe – Exúvia pupal

spp – espécies

WRBU - Walter Reed Biosystematics Unit;

MTI - Mosquito Taxonomic Inventory;

NHM – Museu de História Natural, Londres;

NMNH – Museu Nacional de História Natural, Washington;

FSP - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo;

USP – Universidade de São Paulo;

LESP – Laboratório de Entomologia em Saúde Pública da FSP/USP

## 1 INTRODUÇÃO

A família Culicidae é representada por insetos dípteros conhecidos popularmente por mosquitos, muriçocas, pernalongos ou carapanãs. São insetos inseridos na ordem Diptera, subordem Nematocera, que são diferenciados dos demais por possuírem escamas que recobrem as veias alares (Forattini, 2002). Estes insetos têm aparência delgada, longas pernas, e sua característica probóscide, aliada com as escamas densamente presentes na maior parte do corpo, torna o reconhecimento facilitado. As larvas se caracterizam por terem desenvolvimento associado a coleções hídricas, de onde extraem os nutrientes. Possuem estruturas que permitem a obtenção de oxigênio atmosférico, que podem ser papilas anais e um par de aberturas respiratórias (subfamília Anophelinae) ou na forma de um sifão alongado (subfamília Culicinae), situado na extremidade do abdome. A exceção das regiões polares, os culicídeos estão presentes em todas as outras regiões do planeta (Consoli & Lourenço de Oliveira, 1994; Forattini, 2002).

Atualmente essa família apresenta cerca de 3500 espécies válidas (Harbach, 2022). Os gêneros *Aedes*, *Anopheles* e *Culex* concentram a maior parte das espécies importantes do ponto de vista epidemiológico, ou seja, capazes de veicular, em diversas regiões do planeta, agentes causadores de doenças, a exemplo da dengue, malária, filariose linfática, chikungunya e Vírus do Nilo Ocidental (Bhatt et al., 2013; Weaver, 2013; WHO, 2013; 2013b).

Culicinae é a maior subfamília de mosquitos, sendo encontrados em todas as regiões do mundo, embora a maioria seja de ocorrência em áreas tropicais. É dividida em 109 gêneros, compondo 11 tribos, sendo: Aedeomyiini (um gênero); Aedini (82 gêneros); Culicini (quatro gêneros); Culisetini (um gênero); Ficalbiini (dois gêneros); Hodgesiini (um gênero); Mansoniini (dois gêneros); Orthopodomyiini (um gênero); Sabethini (14 gêneros); Toxorhynchitini (um gênero) e Uranotaeniini (um gênero) (Harbach, 2022).

Relativo à tribo Culicini, existem 795 espécies distribuídas em quatro gêneros: *Culex* Linnaeus, 1758; *Deinocerites* Theobald, 1901, *Galindomyia* e *Lutzia*. Destes, *Culex* e *Deinocerites* são registrados em território brasileiro, o primeiro sendo o maior gênero, alocando 770 espécies, divididas em 26 subgêneros (Harbach, 2022). Além de ser o gênero predominante em Culicini, *Culex* apresenta inúmeras polimorfias e a classificação correta desses mosquitos em muitos casos é problemática.

## 1.1 Gênero *Culex* Linnaeus

Nas Américas, *Culex* é dividido em 13 subgêneros: *Culex* Linnaeus, 1758; *Lutzia* Theobald, 1903; *Melanoconion* Theobald, 1903, *Aedinus* Lutz, 1904; *Carrolia* Lutz, 1905; *Neoculex* Dyar, 1905, *Micraedes* Coquillett, 1906; *Tinolestes* Coquillett, 1906; *Microculex* Theobald, 1907; *Anoedioporpa* Dyar, 1923; *Allimanta* Casal & Garcia, 1968; *Belkinomyia* Adames & Galindo, 1973; *Phenacomyia* Harbach & Peyton, 1992 (Forattini, 2002)

A identificação morfológica e classificação das espécies de *Culex* é uma atribuição permeada por problemas, devido à presença de inúmeros entraves taxonômicos. As estruturas morfológicas de uma forma geral têm pouca ou nenhuma variação entre as espécies, principalmente a respeito das fêmeas (Vesgueiro et al., 2011). Também há escassez de estudos acerca da taxonomia dos grupos que compõem esse gênero, e como consequência a inexistência de chaves de identificação atualizadas, é um fator complicador (Torres et al., 2016). Devido à grande sobreposição de características nos indivíduos adultos de *Culex*, para haver a determinação correta da espécie, é preciso observar estruturas morfológicas presentes em outras fases de desenvolvimento do inseto, como larvas e pupas. Neste campo, a observação da genitália masculina é um procedimento taxonômico altamente eficaz (Demari-Silva et al., 2011; Laurito et al., 2013).

Dentro deste gênero existem as espécies de mosquitos melhor adaptadas ao ambiente urbano, sendo *Culex quinquefasciatus* a espécie mais disseminada por todo o mundo, mas *Cx. nigripalpus* e *Cx. pipiens* também possuem importância como vetores urbanos (WHO, 2010). No entanto, membros de outros subgêneros de *Culex* apresentam tendência de adaptação à ambientes urbanos, e dentre estes, estudos faunísticos apontam para a grande presença de *Microculex* em ambientes urbanos ou com atividade humana, fruto da atividade de ocupação desordenada (Marques et al., 2012; Ceretti-Junior et al., 2015).

### 1.1.2 Subgênero *Microculex* Theobald

As 33 espécies descritas no subgênero *Microculex* estão distribuídas nas Américas do Sul e Central (Harbach, 2022). Estão divididas prioritariamente em quatro Séries: Imitator, Pleuristriatus, Consolator e Inimitabilis (Lane & Whitman, 1951). As características utilizadas para esta distinção são, principalmente, a cor e brilho das

escamas do mesonoto e as marcações das patas traseiras. Importante mencionar que existem espécies não enquadradas em nenhum dos grupos, sendo a classificação adotada restrita, quase exclusivamente às espécies descritas em território brasileiro. As espécies deste subgênero são encontradas em recipientes naturais permanentes como buracos de árvores e bambus, mas principalmente em bromélias (Forattini, 1965), embora seja evidente a tendência de algumas espécies em ovipor em recipientes artificiais ou bromélias localizadas em locais com atividade humana (Ceretti et al., 2015; Forattini et al., 1997). Em revisão da Série Pleuristriatus, Cotrim & Galati (1977) atribuem 34 espécies dentro de *Microculex*. Além de serem dotados de caracteres diferenciais escassos, estes apresentam grande variabilidade, resultando em perfis homogêneos para todo o grupo. O estudo taxonômico clássico de *Microculex* é deficiente de informações devido à falta de estudos propondo linhas de pesquisa com esse objetivo. E por não haver nenhuma tentativa no sentido de desenvolver uma classificação para as espécies, *Microculex* permanece desprovido de informações atualizadas (Harbach, 2011). Até o momento, as espécies pertencentes a esse subgênero não são incriminadas como potenciais vetores de agentes etiológicos para humanos ou outros animais. No entanto, vale reforçar o precário conhecimento a respeito dos hábitos ecológicos e hematofágicos dessas espécies.

## **1.2 Associação com Bromélias**

A Família Bromeliaceae tem distribuição Neotropical, onde apenas uma, das cerca de 300 espécies, a saber: *Pitcarnia feliciana* (A. Chevalier) Harms & Mildbraed é encontrada na África (Leme & Marigo, 1993). As condições climáticas do território brasileiro, em especial o Bioma da Mata Atlântica, proporciona as condições ideais para o desenvolvimento e propagação destes vegetais. Os gêneros mais comumente encontrados são *Vriesea*, *Aechmea*, *Nidularium*, *Billbergia* e *Tillandsia* (Joly, 1970).

Na maior parte das bromélias, a disposição das folhas forma uma espécie de tanque central, onde é possível o acúmulo de água, tanto no tanque como nas axilas que o circundam. A água acumulada em ocasião de chuvas permite o desenvolvimento de habitat adequado para artrópodes cujas larvas são aquáticas. No geral, a maior parte das larvas encontradas em bromélias pertencem à Ordem Diptera, porém, também é importante mencionar o encontro de imaturos de outras Ordens, tais como Coleoptera, Odonata, Plecoptera, Trichoptera e Hemiptera. Baseado nessas afirmações é possível determinar o papel relevante que as bromélias possuem na manutenção do ciclo de vida

de Culicídeos, por serem criadouros altamente eficazes. De acordo com observações ecológicas, é possível definir que algumas espécies de culicídeos são altamente especializados na exploração do ambiente bromelicola, enquanto outras são encontradas apenas ocasionalmente nesse micro-habitat (Frank & Lounibos, 2009).

O estudo acerca da composição da fauna de culicídeos em relação à presença de bromélias demonstra que a natureza da planta pode ter efeitos relevantes, onde alguns grupos de mosquitos são mais frequentes em vegetais nativos e outros mais associados a exemplares exóticos (O'meara et al., 2003). Armbruster et al. (2002) demonstraram que fatores como tamanho da bromélia, a taxa de manutenção do conteúdo hídrico, a quantidade de folhas, o volume de água presente no tanque, o ambiente onde o vegetal está inserido e própria quantidade de detritos diluídos são fatores determinantes que influenciam a composição da fauna de mosquitos encontrada nas bromélias. A capacidade de bromélias maiores abrigarem maior número de espécies se dá ao fato de possuírem mais micro-habitats. O maior volume de água disponível também proporciona maior riqueza de fauna, devido à relação direta com o diâmetro da planta (Araújo et al., 2007).

Tal como ocorre no Brasil, a Venezuela apresenta expressivo número de espécies de Culicidae relacionadas com bromélias. Na região de Panaquire, foram identificadas 23 espécies de culicídeos em associação com vegetais bromeliacea, com ênfase as pertencentes às Famílias Aechmea, Tillandsia e Guzmania). Na região do Parque Nacional San Esteban del Estado Carabobo, as espécies *Culex (Microculex) consolator* e *Culex (Microculex) neglectus* foram identificadas e relacionadas com as espécies de bromélias *Aechmea fendleri* e *Hohenbergia stellata* (Liria, 2007). Algumas espécies de *Microculex* foram coletadas em bromélias localizadas em regiões acima de 2000m no Parque Nacional El Ávila, Venezuela (Smith 1971; Chacín, 1993). As espécies *Culex (Microculex) elongatus* Rozeboom & Komp, 1950 e *Culex (Microculex) stonei* Lane & Whitman, 1943 são relacionadas com bromélias localizadas em áreas de floresta tropical Peruana (Pecor, 2000). Como demonstrado por Dorvillé (1996), na região de Mata Atlântica, algumas espécies de *Microculex* podem ser utilizadas como importantes indicadores ambientais e em áreas andinas de grande altitude, já que possuem a capacidade de desenvolver-se nestas regiões (Navarro et al., 2010).

Em região de Mata Atlântica, espécies de *Microculex* podem constituir até 80% do total de culicídeos encontrados no interior das bromélias (Muller & Marcondes, 2006). Baseado nos achados de levantamentos faunísticos, *Microculex* pode ser definido

como um subgênero típico de ambientes preservados, no entanto, em anos recentes o encontro de formas imaturas de algumas espécies no interior de bromélias localizadas em área periurbana, ou mesmo criadouros artificiais vem levantando a discussão sobre a capacidade desses mosquitos em adaptar-se às condições adversas. Ceretti-Junior et al. (2015) relataram a presença de *Culex (Mcx.) imitator* em bromélias nos parques municipais da Cidade de São Paulo. O encontro de espécies do Grupo Pleuristriatus, com ênfase ao próprio *Culex (Microculex) pleuristriatus* foi averiguado por Marques & Forattini (2008).

Poucos são os dados a respeito do hábito alimentar e capacidade vetorial de *Microculex*. Lane (1953) indica que as fêmeas possuem a tendência de realizar a hematofagia em pássaros. Experimentos tendo como objetivo a observação de repastos sanguíneos não observaram a presença de fêmeas de *Microculex*, mesmo contando com razoável variedade de hospedeiros, como galináceos, coelhos e humanos expostos, apesar da grande quantidade de formas imaturas tendo sido encontradas nos arredores (Stein et al, 2011; Stein et al, 2013). Resultados similares a estes foram obtidos por Lourenço-de-Oliveira & Heyden (1986), mesmo expandindo a variabilidade de potenciais hospedeiros, sendo cavalos, bovinos, ovelhas e anfíbios (sapos). Por fim, o citado estudo conclui e classifica que *Microculex* é um subgênero de mosquitos com aparente tendência a realizar repasto em animais ectotérmicos. No entanto, é importante frisar que o estudo citado conta com dados de experimento em ambiente controlado.

Poucos são os registros de atividade hematofágica de *Microculex* em ambiente natural. Apesar do baixo número de espécimes de *Microculex* obtidos, e carecer da informação das espécies (ou espécie) capturadas, a investigação de Santos et al. (2018) sobre hábito alimentar demonstra a aparente tendência do subgênero em realizar repasto de fato, em aves e anfíbios. Este trabalho conseguiu identificar as espécies de anfíbios, tratando-se de *Sninax argyrmeornatus* e a outra possivelmente *Trachycephalus sp.* Este resultado pode apontar para uma necessária investigação na relação mosquito-hospedeiro.

### **1.3 História Taxonômica do Subgênero *Microculex*.**

A primeira menção ao subgênero *Microculex* foi feito no trabalho de Theobald, (1907) “A Monograph of the Culicidae of the World”, onde o espécie-tipo é apontado como *Microculex argenteoumbrosus*, a partir de duas fêmeas e dois machos. As características morfológicas que aventaram a possibilidade de tratar-se de um novo

subgênero foi a aparência do palpo da fêmea bem como singularidades em relação às escamas das asas. Assim, foi proposta a criação de um novo subgênero para alocar esse “pequeno mosquito robusto”, nas palavras no próprio autor.

As principais características demarcadas para o subgênero são: cabeça, tórax e abdome recobertos com escamas, em similaridade com *Culex*. Por outro lado, as asas mostram padrão externo “espinoso”, como em *Uranotaenia*. A venação das asas é similar a encontrada em *Culex*, as escamas também são equivalentes.

Com a publicação do referido trabalho, e aceitação pela comunidade científica, algumas espécies anteriormente classificadas como *Culex* foram então reexaminadas e alocadas em *Microculex*, sendo elas: *albipes* Lutz, *azymus* Dyar & Knab, *consolator* Dyar & Knab, *imitator* Theobald, *inimitabilis* Dyar & Knab, *pleuristriatus* Theobald e *rejector* Dyar & Knab.

Importante mencionar que ainda no ano de 1907, antes da instauração oficial de *Microculex* como subgênero, Dyar & Knab publicaram “*Mosquitoes from Canal Zone*”, um trabalho feito no Panamá, onde trazem as descrições de algumas novas espécies, dentre elas: *gaudeator* e *jenningsi*, ainda como pertencentes ao subgênero *Culex*. A primeira, descrita a partir de sete espécimens coletados em bromélias na cidade de Tabernilla, conta apenas com informações acerca dos adultos. De acordo com os descritores, é uma espécie que possui semelhanças com *imitator*, como as escamas prateadas no mesonoto e os anéis brancos nas articulações tarsais. Porém essas características morfológicas se mostram mais discretas. Os autores ainda nos revelam que descreveram *gaudeator* como sendo uma “variação” de *jenningsi*, que possuiria ornamentação no mesonoto. Baseado na observação da larva (embora não seja provida a descrição desta) é relatado semelhança com a forma imatura de *rejector* Dyar & Knab, 1906, descrito a partir de indivíduos coletados em bromélias na cidade de Córdoba, México. É colocada a possibilidade de *rejector* e *gaudeator* serem a mesma espécie, no entanto, no momento da publicação do trabalho, essa averiguação não fora executada. A segunda, descrita a partir de 4 espécimens coletados em bromélias na cidade de Tabernilla, conta apenas com a descrição dos adultos. De acordo com os autores, guarda semelhanças com *consolator*.

Dyar & Knab (1919) apresentam uma série de descrições, dentre elas *Culex (Microculex) chryselatus*, que ao tudo indica, historicamente, torna-se o primeiro espécime descrito prioritariamente como pertencente ao subgênero proposto em 1907. Sua descrição, a partir de três indivíduos (um macho e duas fêmeas), coletados em

bromélias na Cidade de Campagnie des Mines d'or, Lawa River, à época Guiana Holandesa, hoje Suriname, em Março de 1917. A descrição conta com informações acerca dos adultos (macho e fêmea), pupa larva e genitália masculina. Segundo os descritos, a estrutura da genitália masculina conta com similiaridades a *Microculex inimitabilis* e *Culex ocellatus*. A respeito do espécime adulto, a coloração dos tarsos não trás qualquer semelhança com os outros conhecidos membros do subgênero, da mesma que forma que *daumastocampa* Dyar & Knab, o que os tornaria espécies próximas, hipótese essa levantada pelos descritores.

Root (1927) apresenta a descrição de cinco novas espécies de *Microculex*, sendo elas: *Culex (Microculex) gairus*. Descrito a partir de espécimens coletados em bromélias do Jardim Botânico, Rio de Janeiro. A genitália masculina e larva foram descritas. De uma forma geral é uma espécie tida como semelhante à *pleuristriatus*, no entanto, menos comum. *Culex (Microculex) hedys*, descrito a partir de único exemplar macho, guarda semelhanças à *pleuristriatus*, por possuir anéis de escamas brancas no último tarso. A genitália masculina foi descrita; informações sobre larva e pupa não constam. Este único exemplar foi perdido quando em cuidados do museu. *Culex (Microculex) aphyllactus*, descrito a partir de um macho e duas fêmeas, coletados em bromélias na região de Magé, Rio de Janeiro. O trabalho apresenta a descrição das formas adultas e genitália masculina. *Culex (Microculex) trychnus*, descrito a partir de um macho e uma fêmea, coletados em bromélia na região de Magé, Rio de Janeiro. A descrição conta com informações a respeito da forma adulta e genitália masculina. Importante mencionar que no ato da descrição os autores estabelecem similitude quanto às estruturas da genitália masculina em relação à *imitator*. Inclusive mencionam que os espécimes utilizados foram encontrados habitando em bromélias onde também foram coletados exemplares de *Microculex imitator*. *Culex (Microculex) microphyllus*, descrito a partir de exemplares coletados em bromélias da região de Magé e Jardim Botânico, Rio de Janeiro. A descrição apresenta informações sobre as formas adultas e genitália masculina. Os autores relatam a similaridade das estruturas da genitália masculina desta espécie com *consolator*.

Importante verificar que o citado trabalho de Root (1927) apresenta uma pequena discussão a respeito de estruturas no mesonoto onde uma comparação entre os subgêneros *Melanoconion* e *Microculex* é feita e o exemplo usado pelos autores é *Culex (Microculex) ocellatus* Theobald, 1903. No entanto, hoje *Cx. ocellatus* não pertence a qualquer subgênero, tendo sua taxonomia e classificação fragmentada e incerta.

Posteriormente a novas espécies descritas, Edwards (1932) informações acerca de *Microculex*, onde menciona esse subgênero como sendo uma exceção dentro de *Culex*, no que tange a oviposição. Neste caso, ao contrário da característica “jangada”, os ovos são envelopados separadamente em uma cobertura gelatinosa. Neste mesmo trabalho, é aventada a possibilidade de proximidade evolutiva com o Subgênero *Micraedes* Coquillett, pela existência de apenas cerdas retas no vértice.

Kumm (1933) apresenta entre outras, a descrição do *Culex (Microculex) davisii*, baseado em exemplares adultos, genitália masculina e larva. Os espécimes foram coletados em bromélias localizadas em São Salvador, Bahia. Esta espécie é apontada como semelhante à *pleuristriatus* quando adultos e com singularidades importantes na fase larval, em especial no que se refere ao comprimento do sifão respiratório. Em termos expositivos, é justo apontar este trabalho como um dos grandes avanços no estudo de *Microculex*. Ao contrário das publicações anteriores, este torna públicas as ilustrações tanto de genitálias como de larvas, pernas e mesonoto das espécies avaliadas, a saber: *Microculex pleuristriatus*, *Microculex albipes*, *Microculex davisii* e *Microculex imitator*.

Pessoa & Galvão (1936) apresentam a descrição de *Culex (Microculex) worontzowi*. Neste trabalho, os autores descrevem o macho, fêmea e larva. Os descritores apontam semelhanças com *Microculex consolator*, tanto na fase adulta como nas estruturas da genitália masculina. Os espécimes foram oriundos de coletas feitas em bromélias na cidade de Tabatingueira, São Paulo.

Anduze (1942), apresenta a descrição de *Microculex kukenan*. Esta espécie foi descrita a partir de dois machos e três fêmeas. O Exame das genitálias masculinas também foi relatado. Os espécimes foram coletados em bromélias localizadas em Surukum em La Gran Sabana. Segundo o autor, a forma adulta é semelhante à *Cx. inimitabilis*, *Cx. azymus* e *Cx. neglectus*, dos quais é apenas separável pela genitália masculina, com exceção de *azymus*, cujo exemplar macho ainda era desconhecido na ocasião. Porém, uma mancha branca apical, na tibia posterior carrega semelhança com a observada em *Cx. davisii*. Não foi possível executar a descrição da larva e pupa por advento de deterioração do material, tornando assim, essas fases de vida até o presente, desconhecidas.

Lane & Whitman (1943) descrevem *Microculex stonei*. Os espécimes, originários de Trinidad contemplavam machos, fêmeas, pupas e larvas. Neste trabalho, a anatomia da genitália masculina foi descrita.

Rozeboom & Komp (1950) apresentam a descrição, baseada em exemplares adultos, genitália masculina, larva e pupa do *Microculex elongatus*. Este é um importante trabalho na história do subgênero. Embora não seja o primeiro a trazer uma descrição completa de todas as fases de vida, o nível de detalhamento da exposição das ilustrações merece menção. O artigo aborda uma discussão acerca de todas as 18 espécies que compunham o subgênero na ocasião da publicação. Importante mencionar que este trabalho apresenta chave de genitálias masculinas de *Microculex*, um relevante avanço na taxonomia comparativa do grupo.

Um ano depois, Lane & Whitman (1951) trouxeram o trabalho que viria a ser o mais completo documento a respeito de *Microculex* até então. “*The subgenus “Microculex” in Brazil*” tem como propósito reunir e discutir em detalhes tanto o histórico do subgênero como seus problemas e avanços. Este é o trabalho que fundamenta a existência das Séries de *Microculex*: *Imitator*, *Pleuristriatus*, *Consolator* e *Inimitabilis*. A separação em Séries é proposta com base em caracteres dos indivíduos adultos, genitália masculina e larva. Este trabalho apresenta a descrição de sete novas espécies: *Microculex intermedius*, coletado em bromélias na região no Distrito Federal, Brasil. Descrito com base no macho e fêmea, genitália masculina, larva e pupa. *Microculex aureus*, também fruto de coletas na região do Distrito Federal, Brasil. A espécie é descrita com base no macho, fêmea, genitália masculina, larva e pupa. A respeito de *Cx. aureus*, os autores frisam a necessidade de se observar as bromélias localizadas em maiores altitudes, já que esta espécie foi descrita com material obtido de bromélias que caíram de galhos localizadas a 30 metros de altura. Tanto *Microculex aureus* como *Microculex intermedius* foram alocados na Série *Pleuristriatus*, juntamente com *Cx. pleuristriatus*, *Cx. davisi* e *Cx. gairus*.

À Série *Consolator*, a qual foram agrupados as espécies *Cx. consolator*, *Cx. worontzowi*, foi acrescentada a espécie *Cx. Microculex reducens*, descrita a partir de único exemplar macho, coletado no Distrito Federal, Brasil. Pupa e larva também constam na descrição, no entanto, os autores guardam questionamento próprio sobre a validade da espécie, devido ao insuficiente poder comparativo do material analisado.

A Série *Imitator*, que era composta na ocasião por uma espécie *Cx. (Mcx. imitator* tem a inserção de três novas espécies: *Cx. (Mcx.) dubitans*, *Cx. (Mcx.) retrosus* e *Cx. (Mcx.) carioca*. A primeira é descrita com espécimes coletados em bromélias na região do Distrito Federal, Brasil. A princípio não existem diferenças nas formas adultas quando comparadas com *imitator*, o que levou os autores a considerarem a possibilidade

de se tratar de um sinônimo. Porém foram observadas relevantes diferenças na genitália masculina, pupa e larva (esta, quando viva, apresenta típica coloração esverdeada). A segunda espécie é descrita com material proveniente de bromélias localizadas no Distrito Federal, Brasil, sendo macho, fêmea, genitálias masculinas, pupa e larva. Os autores determinam que a diferença mais relevante é a respeito de discretas singularidades na estrutura da genitália, no entanto, algumas particularidades da larva também podem ser relacionadas. A terceira espécie (*Microculex carioca*), também proveniente de coletas em bromélias no Distrito Federal, Brasil, guarda algumas singularidades observáveis nos indivíduos adultos, bem como em todos os demais estágios de vida. São disponibilizadas as descrições do macho, fêmea, genitália masculina, pupa e larva.

Quanto a Série *Inimitabilis* foi inserida a subespécie *Cx. (Mcx.) inimitabilis fuscatus*, assim, agregando às espécies: *Cx. (Mcx.) inimitabilis*, *Cx. (Mcx.) neglectus*, *Cx. (Mcx.) microphyllus* e *Cx. (Mcx.) aphyllactus*. *Cx. inimitabilis fuscatus* é descrito com espécimes coletadas em bromélias na região do Distrito Federal, Brasil. A descrição aborda macho, fêmea, genitálias masculinas, pupa e larva.

Seguindo os estudos iniciados por Lane & Whitman (1951), Lane (1953) publica o Volume 1 do “*Neotropical Culicidae*” obra que teria razoável porção dedicada a reunião de toda informação obtida a respeito de *Microculex*, proporcionando a consulta, em único volume das principais informações a respeito da biologia, ecologia de cada espécie descrita até a ocasião, aliado a chaves de identificação para adultos, larvas e genitália masculina. A obra ainda se mantém como importante volume para consulta.

Forattini & Coutinho (1962) apresentam o artigo “*Notas sobre Culicidae (Diptera). 4º- Contribuição ao estudo do subgênero Microculex, com a descrição duma nova espécie*”. Nesse documento, além da descrição de *Microculex lanei*, de forma extremamente minuciosa, com fornecimento de ilustrações da genitália masculina, pupa e larva, algo que ainda pouco averiguado nos trabalhos anteriores, os autores propõem a redescricao de outras duas espécies da Série *Pleuristriatus* (onde *Cx. (Mcx.) lanei* também foi inserido), sendo elas: *Cx. (Mcx.) intermedius* e *Cx. (Mcx.) pleuristriatus*. Este acréscimo de informações foi de enorme valia, visto que as primeiras descrições não contavam com muitos detalhes, o tornava o trabalho dos taxonomistas particularmente árduo.

Seguindo em síntese as mesmas prerrogativas do trabalho anterior, Forattini & Coutinho (1963) publicam o artigo “*Sobre duas espécies do Subgênero Microculex*”

Neste trabalho, os autores trazem a revisão pormenorizada de *Microculex aureus* e *Microculex imitator*. Ambas as espécies, anteriormente descritas com escassez de informações, agora contavam com detalhadas e ricas informações a respeito de todos os estágios de vida. Porém, não foram acrescentadas informações ou ilustrações acerca das estruturas da genitália masculina.

Em continuidade com a sequência de contribuições no estudo de *Microculex*, Forattini & Toda (1966) publicam “*Notas sobre Culicidae. 11. Algumas espécies amazônicas de Microculex*”. Vale evidenciar que ao contrário dos demais registros de *Microculex* em território brasileiro, este trabalho buscou informações sobre os mosquitos deste subgênero na região amazônica. Os autores comentam que Lane & Whitman (1943) assinalam para a existência de representantes tanto de *Microculex* e *Melanoconion* que possuem nítida mancha negra no mesonoto. No documento é trazida a redescrição de *Cx. (Mcx.) stonei*, que inicialmente fora descrita como *Culex (Melanoconion) ocellatus*, Theobald 1903. A redescrição acrescenta informações sobre todos os estágios de vida, bem como genitália masculina. Neste trabalho é descrita a espécie *Cx. (Mcx.) shopei*. A descrição é feita com espécimes coletados em bromélias na região de Utinga, Belém, Pará, contando com machos, fêmeas, genitália masculina, pupa e larva. Importante informar que no caso de *Cx. shopei*, embora a descrição da genitália masculina seja ricamente sumarizada, não são fornecidas ilustrações compatíveis.

Cotrim & Galati (1977) valioso trabalho intitulado “*Revisão da Série Pleuristriatus do Subgênero Microculex Theobald, 1907*”. Neste volume, é complementado os esforços que vinham sendo implementados por pesquisadores como Forattini e Coutinho na tentativa de fornecer melhores informações no campo de estudo deste grupo. Nove espécies são redescritas, chaves de larvas e genitália masculina são fornecidas e estas estruturas, ilustradas. Até a presente data, este trabalho é o mais completo estudo executado dentro de *Microculex*, sendo referência imprescindível para o estudo e identificação do Grupo Pleuristriatus. Torna relevante a informação da inexistência de semelhante volume de informações para as outras Séries.

Lourenço-de-Oliveira & Silva (1987), apresentam a última espécie de *Microculex* reconhecida até o presente. A descrição de *Cx. (Mcx.) siphantulatus* é representativamente a mais completa obra individual. Sua descrição vale de um extenso e aprofundado documento, rico em detalhamento, tanto escrito como ilustrado. Macho,

fêmea, genitália masculina, pupa e larva são apresentados. *Cx. siphonulatus* não é agrupado em nenhuma das quatro Séries existentes.

De forma sintetizada, as espécies validas de *Microculex*, Séries designadas, distribuição geográfica e descritor estão sumarizadas na Tabela 1.

**Tabela 1:** Espécies de *Microculex* conhecidas, determinação de Série, descritores, localidades-tipo, distribuição conhecida e último estudo taxonômico realizado.

Espécie	Série	Distribuição geográfica	Descrições
<i>Culex (Microculex) albipes</i> Lutz, 1904	Pleuristriatus	Brasil	Macho, Fêmea, Larva (Kumm, 1933) Macho, Fêmea, Larva (Cotrim & Galati, 1977)
<i>Culex (Microculex) aureus</i> Lane & Whitman, 1951	Pleuristriatus	Brasil	Macho, Fêmea, Pupa, Larva (Lane & Whitman, 1951) Pupa, Larva (Forattini & Coutinho, 1963) Macho, Fêmea, Pupa, Larva (Cotrim & Galati, 1977)
<i>Culex (Microculex) azymus</i> Dyar & Knab, 1906	Pleuristriatus	Trinidad	Fêmea, Larva (Dyar & Knab, 1906) Fêmea, larva (Cotrim & Galati, 1977)
<i>Culex (Microculex) davisi</i> Kumm, 1933	Pleuristriatus	Brasil	(Kumm, 1933) Macho, Fêmea, Larva (Cotrim & Galati, 1977)
<i>Culex (Microculex) gairus</i> Root, 1927	Pleuristriatus	Brasil	Macho, Fêmea, Larva, Pupa (Cotrim & Galati, 1977) Root, 1927
<i>Culex (Microculex) lanei</i> Coutinho & Forattini, 1962	Pleuristriatus	Brasil	Macho, Fêmea, Pupa, Larva (Coutinho & Forattini, 1962) Macho, Fêmea, Pupa, Larva (Cotrim & Galati, 1977)
<i>Culex (Microculex) pleuristriatus</i> Theobald, 1903	Pleuristriatus	Bolívia, Brasil, Guiana, Trinidad, Venezuela,	Macho, Fêmea, Pupa, Larva (Theobald, 1903) Macho, Fêmea, Pupa, Larva (Cotrim & Galati, 1977)
<i>Culex (Microculex) xenophobus</i> Ronderos, 1965	Pleuristriatus	Venezuela	Macho, Fêmea, Larva, Pupa (Ronderos, 1965) Macho, Fêmea, Larva, Pupa (Cotrim & Galati)
<i>Culex (Microculex) carioca</i> Lane & Whitman, 1951	Imitator	Brasil	Macho, Fêmea, Larva, Pupa (Lane & Whitman, 1951)
<i>Culex (Microculex) dubitans</i> Lane & Whitman, 1951	Imitator	Brasil	Macho, Fêmea, Larva, Pupa (Lane & Whitman, 1951)
<i>Culex (Microculex) imitator</i> Theobald, 1903	Imitator	Argentina Brasil	Macho (Theobald, 1903)

		Colômbia Equador Guiana México Trinidad Venezuela	Macho, Fêmea, Larva (Lane & Whitman, 1951) Larva, Pupa (Forattini & Coutinho, 1963)
<i>Culex (Microculex) retrosus</i> Lane & Whitman, 1951	Imitator	Brasil	Macho, Fêmea, Larva, Pupa (Lane & Whitman, 1951)
<i>Culex (Microculex) aphyllactus</i> Root, 1927	Inimitabilis	Brasil	Macho, Fêmea (Root, 1927) Macho, Fêmea, Larva, Pupa (Lane & Whitman, 1951)
<i>Culex (Microculex) inimitabilis</i> Dyar & Knab, 1906	Inimitabilis	Brasil, Granada, Suriname, Trinidad, Venezuela	Larva (Dyar & Knab, 1906) Macho, Fêmea, Pupa, Larva (Lane & Whitman, 1951)
<i>Culex (Microculex) fuscatus</i> Lane & Whitman, 1951	Inimitabilis	Brasil	Macho, Fêmea, Pupa, Larva (Lane & Whitman, 1951)
<i>Culex (Microculex) microphyllus</i> Root, 1927	Inimitabilis	Brasil	Macho (Root, 1927) Macho, Fêmea, Pupa, Larva Lane & Whitman, 1951
<i>Culex (Microculex) neglectus</i> Lutz, 1904	Inimitabilis	Brasil	Macho, Fêmea (Bourroul, 1904) Macho, Fêmea, Pupa, Larva
<i>Culex (Microculex) consolator</i> Dyar & Knab	Consolator	Brasil, Trinidad.	Macho, Larva (Dyar & Knab, 1906) Macho, Fêmea, Pupa, Larva (Lane & Whitman, 1951)
<i>Culex (Microculex) reducens</i> Lane & Whitman, 1951	Consolator	Brasil	Macho, Pupa, Larva (Lane & Whitman, 1951)
<i>Culex (Microculex) worontzowi</i> Pessoa & Galvão, 1935	Consolator	Brasil	Macho, Fêmea, Larva (Pessoa & Galvão, 1935) Macho, Fêmea, Pupa, Larva.
<i>Culex (Microculex) hedys</i> Root, 1927	Consolator	Brasil	Macho (Root, 1927)
<i>Culex (Microculex) chryselatus</i> Dyar & Knab, 1919	S/S	Brasil Colômbia Guiana Francesa Panamá Suriname Venezuela	Macho, Fêmea, Pupa, Larva (Dyar & Knab, 1919)
<i>Culex (Microculex) daumastocampa</i> Dyar & Whitman, 1951	S/S	Panamá, México	Macho, Fêmea (Dyar & Knab, 1908)
<i>Culex (Microculex) elongatus</i> Rozeboom & Komp, 1950	S/S	Colômbia	Macho, Fêmea, Fêmea, Larva (Rozeboom & Komp, 1950)
<i>Culex (Microculex) gaudeator</i> Dyar & Knab, 1907	S/S	Panamá, Costa Rica	Macho, Fêmea (Dyar & Knab, 1907)
<i>Culex (Microculex) jenningsi</i> Dyar & Knab, 1907	S/S	Panamá	Macho, Fêmea (Dyar & Knab, 1907) Larva (Dyar, 1928)
<i>Culex (Microculex) kukanan</i> Anduze,	S/S	Colombia,	Macho, Fêmea

1942		Venezuela	(Anduze, 1942)
<i>Culex (Microculex) pulidoi</i> Cova Garcia & Sutil, 1974	S/S	Venezuela	Macho (confirmar) (Cova & Sutil, 1974)
<i>Culex (Microculex) reginae</i> Flock & Fauran, 1955	S/S	Guiana Francesa	Macho (Flock & Fauran, 1955)
<i>Culex (Microculex) rejector</i> Dyar & Knab, 1906	S/S	México	Larva (Dyar & Knab, 1906) Macho, Fêmea (Dyar & Knab, 1915)
<i>Culex (Microculex) shopei</i> Forattini & Toda, 1966	S/S	Brasil	Macho, Fêmea, Pupa, Larva (Forattini & Toda, 1966)
<i>Culex (Microculex) siphanulatus</i> Lourenço-de-Oliveira & Silva, 1987	S/S	Brasil	Macho, Fêmea, Pupa, Larva (Lourenço-de-Oliveira & Silva, 1987)
<i>Culex (Microculex) stonei</i> Lane & Whitman, 1943	S/S	Brasil Guiana Francesa Suriname Trinidad	Fêmea, Larva, Pupa (Lane & Whitman, 1943) Macho, Fêmea, Larva, Pupa (Forattini & Toda, 1966)
<i>Culex (Microculex) sutili</i> Cova Garcia & Pulido, 1974	S/S	Venezuela	Macho, Larva (Cova Garcia & Pulido, 1974)

\* Informações reunidas e adaptadas a partir de WRBU – The Walter Reed Biosystematics Unit (acessado em (14/08/2021) ([www.mosquitocalog.org/](http://www.mosquitocalog.org/)) e mosquito-taxonomic-inventory.myspecies.info (acessado em (12/08/2021)

#### 1.4 Histórico de *Microculex* em coletas entomológicas, adaptação a ambientes impactados e problemas taxonômicos.

Ao longo de todo período histórico, o encontro de formas imaturas de *Microculex* em coletas entomológicas é um acontecimento comum, por vezes, perfazendo o maior porcentual representativo da amostragem, especialmente em ambiente de Mata Atlântica (Muller & Marcondes, 2006; Marques et al., 2012). O microhabitat proporcionado pelo interior dos vegetais bromeliacea permanece como sendo o local que melhor define o criadouro típico do subgênero (Dorvillé, 1996; Cotrim & Galati), no entanto, é importante mencionar o encontro de algumas espécies em colmos expostos de bambus, sobretudo *Microculex neglectus* (Theobald, 1903) e buracos de árvores (Dorvillé, 1996).

Em anos recentes, passaram a ser reportados os encontros de espécies de *Microculex* em bromélias localizadas em ambientes periurbanos, visivelmente impactados pela ação humana (Ceretti-Junior et al., 2015). Relatos de encontros semelhantes remontam a resultados de pesquisas anteriores. Forattini et al. (1997) salienta não apenas a presença de espécimes de *Microculex* em bromélias de ambiente antropizado como a presença de representantes da Série Pleuristriatus em criadouros

artificiais. Esses registros revelam a possibilidade de que estes espécimes possam ter potencial de adaptação à ambientes impactados.

Clastrier (1970) traz a descrição de *Culex (Melanoconion) dolichophyllus*, e apresenta um novo de registro de localização de *Culex (Microculex) stonei*. As duas espécies foram encontradas na Guiana Francesa, região de Matoury (outubro-novembro de 1968) e também na região de Kaw (Março de 1969).

Em um trabalho promovido na região de Jacarepaguá (Granjas Calábrias), Rio de Janeiro, Lourenço-de-Oliveira et al (1986) obtiveram considerável resultado a respeito da presença de *Microculex* nas bromélias. É pertinente salientar novamente a dificuldade na precisa identificação dos espécimes, onde grande parte não pode ser classificados além do posicionamento em uma das quatro Séries. Das espécies que puderam ser identificadas, *Cx. imitator*, *Cx. microphyllus*, *Cx. pleuristriatus* e *Cx. gairus*, esta foi notadamente a mais frequente em criadouros artificiais. Neste mesmo estudo, alguns representantes do subgênero não correspondiam às características propostas pelas chaves dicotômicas, e foram definidas como *Cx. (Mcx) sp1* e *Cx. (Mcx) sp2*.

Utilizando de vários espécimes de culicídeos depositados em 4º estágio larval na Coleção Entomológica do Laboratório de Biologia de Vetores pertencente ao Museu de Biologia da Universidade Central da Venezuela (por, Guimarães, 1977), Navarro & Liria (2000) objetivaram realizar análise cladística baseada em 30 caracteres do aparelho bucal das larvas. Neste trabalho, que abordou sete subgêneros de *Culex*, incluindo *Microculex*, com as espécies *Cx. microphyllus*, *Cx. chryselatus*, *Cx. pleuristriatus* e um gênero de *Deinocerites*, além de suportar a monofilia de *Culex*, as relações de *Microculex*, *Melanoconion* e *Deinocerites* não puderam ser esclarecidas.

Forattini & Marques (2008) em estudo realizado no município de Ilhabela, litoral norte do Estado de São Paulo, tendo por objetivo a averiguação da fauna de culicídeos presente no interior das bromélias de ambientes urbano, periurbano e silvestre, foi demonstrado que *Cx. pleuristriatus* era a espécie dominante no ambiente urbano. Além de *Cx. pleuristriatus*, foram coletadas outras 10 espécies de *Microculex*: *Cx. albipes* (esta espécie em alguns casos não pode ser distinguida de *pleuristriatus*), *Cx. aphyllactus*, *Cx. neglectus* (estas duas espécies em alguns casos não puderam ser distinguidas), *Cx. aureus*, *Cx. davisii*, *Cx. gairus*, *Cx. imitator*, *Cx. lanei*, *Cx. reducens*, *Cx. worontozowi*. Neste trabalho, foram encontrados espécimes de *Microculex* que não coincidiam com as chaves dicotômicas. Estes espécimes foram nomeados como *Cx.*

(*Microculex*) *sp1* e *Cx. (Microculex) sp2*. A sugestão de maiores investigações taxonômicas a respeito foi reforçada pelos autores.

*Cx. pleuristriatus* foi a espécie dominante na investigação levada a cabo no Jardim Botânico do Rio de Janeiro, tendo como objeto a bromélias cultivadas no solo do local, perfazendo 42.5% da amostragem (Mocellin et al., 2009), reforçando o argumento desta espécie ser extremamente presente e capaz de colonizar bromeliáceas localizadas em ambientes modificados.

Em um esforço para esclarecer a posição filogenética de alguns subgêneros de *Culex*, baseado em inferências baseadas no gene COI, Demari-Silva et al. (2011), relatam que *Microculex* é um grupo monofilético. Ainda é aventada a possibilidade de *Microculex* (juntamente com *Melanoconion* e *Carrollia*) ser alçado à categoria de gênero. No entanto, pelo trabalho ser baseado em um gene mitocondrial, os autores reforçam a necessidade de bases mais sólidas para sustentar tal afirmação. Estudos dispendo de maior número amostral baseado em informações filogenéticas oriundas de genes nucleares podem trazer maiores esclarecimentos.

Realizado na Serra do Mar, região de Mata Atlântica, Marques et al. (2012) averiguaram a associação de culicídeos com vegetais bromeliacea (*Nidularium* e *Vriesea*). Como um dos resultados, foram inventariadas 11 espécies de *Microculex*, sendo: *Cx. neglectus*, *Cx. reducens*, *Cx. worontzowi*, *Cx. imitator*, *Cx. imitator retrosus*, *Cx. aphyllactus*, *Cx. inimitabilis fuscatus*, *Cx. microphyllus*, *Cx. intermedius*, *Cx. pleuristriatus* e *Cx. daumasturus*. Neste trabalho, alguns exemplares não puderam ser identificados, por apresentarem características singulares às chaves de identificação. Por esta razão, foram sumarizados como *Culex (Microculex) sp1*. A espécie *Cx. daumasturus*, embora seja sinonizada com *Cx. imitator* foi interpretada como espécie singular, baseado no argumento de que a validação das espécies carece de maiores investigações.

Em estudo de campo realizado no Parque Nacional do Itatiaia (PARNA-Itatiaia), oito espécies de *Microculex* foram capturadas, sendo: *Cx. neglectus*, *Cx. reducens*, *Cx. inimitabilis*, *Cx. dubitans*, *Cx. consolator*, *Cx. worontzowi*, *Cx. aphyllactus*, *Cx. davisii* e *Cx. intermedius* (Cardoso et al, 2015). Neste trabalho, é evidente a dificuldade em identificar os espécimes de *Microculex*. Do total de espécies, 8,28% não puderam ser nomeadas em nível de espécie e 5,03% puderam ser organizadas somente em nível de Série (Imitator e Pleuristriatus).

Em estudo da fauna de culicídeos da Caatinga, Marteis et al. (2016) apontaram para a existência dominante em bromélias de espécies de *Microculex* até então não descritas. Este trabalho, por seu caráter precursor ao explorar uma região do Brasil carente de informações a respeito da fauna de culicídeos e sua ecologia, revelou a riqueza de espécies desconhecidas e a necessidade de maiores estudos em locais inexplorados do território brasileiro.

Ortega-Morales et al. (2018) fazem o primeiro relato de *Culex daumastocampa* no México, estendendo assim sua área de ocorrência (**Tabela 1**). No mesmo trabalho, é aventada a possibilidade de *Cx. imitator* ser erroneamente estabelecido como ocorrente em território mexicano, em provável erro de identificação (confundida com *Cx. rejector*). Assim, a espécie foi retirada da fauna de mosquitos mexicana.

Stein et al. (2018) como resultado de esforços de coleta em fitotelmatas, estenderam a área de ocorrência de *Cx. davisi* na Argentina, passando da região de Chaco e Corrientes, onde foi previamente relatado (Rossi, 2015) e no citado trabalho, é encontrado na região da província de Formosa.

Em extenso e pormenorizado estudo de revisão da fauna de culicídeos da Guiana Francesa, Talaga et al. (2020) registraram a ocorrência das seguintes espécies: *Cx. davisi*, esta, sendo registrada pela primeira vez. Importante salientar que os espécimens inventariados antes haviam sido identificados como *Cx. pleuristriatus* e *Cx. chryselatus*, em 1973. *Cx. imitator*, *Cx. pleuristriatus*, *Cx. stonei* tiveram suas identificações confirmadas. Porém, a maior mudança parece ter ocorrido quanto ao status de *Cx. reginae*. Esta espécie, como já mencionado, foi descrita baseado apenas em um exemplar macho, e teve seu posicionamento no subgênero *Microculex* em razão do lobo subapical do gonocoxito pouco desenvolvido, gonóstilo delgado e a robustes dos lobos do nono seguimento (Berlin and Belkin 1980). Após a observação da genitália, que segundo os autores, encontra-se em deteriorado estado de conservação, além de notável processo de distorção (em razão do procedimento de montagem), corresponde as informações presentes na descrição (Flock & Fauran, 1955). Porém, foi observado que o a genitália não foi dissecada e orientada corretamente. O mesmo pode ser atribuído ao nono seguimento, argumento este, que pode ter contribuído para uma falsa impressão de “achatamento” dos lóbos, levando a crer que não poderia ser uma espécie de *Melanoconion*. Fator este que levou os autores a considerarem um erro de identificação. O comprometimento da montagem da lâmina pode ser causado ainda um destacamento da cerda foliforme, normalmente inserida no ápice da divisão distal subapical do

gonocoxito do Grupo Atratus de *Melanoconion*. Assim, *Culex reginae* Floch & Fauran, 1955, foi sinonimizado (equivocadamente) com *Culex zeteki* Dyar, 1918b.

Em diferentes níveis, cada um desses trabalhos brevemente sumarizados contou com problemas e dificuldades no momento da identificação dos espécimes de *Microculex*. A razão desta dificuldade tem origem em dois problemas. O primeiro é a falta de informações sobre a taxonomia do grupo, onde os conhecimentos até hoje obtidos são restritos a trabalhos antigos, por vezes de difícil acesso, o que pode limitar muito a própria tentativa de consulta. O segundo problema reside na falta de profissionais capacitados a executar a correta identificação dos espécimes. A soma destas realidades resulta em identificações superficiais, e por vezes, passíveis de questionamento. *Microculex* é um subgênero abundante no ambiente silvestre, tendo seu encontro também em locais periurbanos, e é desprovido de informações atualizadas sobre sua taxonomia e hábitos ecológicos. Neste sentido, um esforço para esclarecer estes pormenores se faz necessário. De forma urgente, uma averiguação sobre as estruturas da genitália masculina se faz necessário, bem como, a tentativa de agregar novas ferramentas taxonômicas. A respeito de questionamentos levantados nas últimas décadas, esclarecimentos sobre questões ecológicas também se fazem presentes. É fato que em anos recentes novas ferramentas vêm sendo implementadas para auxiliar na solução de problemas taxonômicos e esclarecimentos no campo da ecologia de mosquitos, a saber: Morfometria Geométrica Alar e Distribuição em Gradientes de Cobertura Vegetal.

### **1.5 Taxonomia da genitália masculina em Culicidae.**

A validade do estudo morfológico das estruturas que compõem a genitália masculina de culicídeos reside na utilidade diante dos problemas associados com a condição ou similaridades entre os espécimes adultos, acontecimento muito comum em Culicidae (Forattini, 2002). As estruturas que compõem a genitália masculina são na maior parte dos casos, espécie-específicas (Eberhard, 1985; Huber, 1995, 2004; Song & Wenzel, 2008), o que as tornam extremamente eficazes para a tarefa de identificação de mosquitos (Petersen et al., 2017). A utilização desta técnica vem mostrando sua validade ao longo de décadas, auxiliando na correta identificação de espécies crípticas ou membros de complexo de espécies. O exame da genitália masculina vem sendo utilizada com frequentes resultados positivos nos principais gêneros de Culicidae. Em *Anopheles*, pode-se exemplificar com a separação das espécies *Anopheles*

(*Nyssorhynchus*) *albertoi* Unti, 1941 e *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *arthuri* Unti, 1941. Também cabe mencionar a utilização desta técnica nos estudos taxonômicos realizados no Complexo *Anopheles strodei* Faran 1980 (Sallum et al., 2010). O mesmo é aplicado ao caso de *An. cruzii* e *An. homunculus*, duas espécies morfológicamente semelhantes na fase adulta (Calado & Navarro-Silva, 2005). Em *Culex*, resultados positivos foram conseguidos na distinção entre *Culex mollis* e *Cx. bidens* (Demari-Silva, 2011). Estudos aprofundados de revisão taxonômica de *Culex* são em grande parte baseados no estudo da genitália masculina. Os resultados de Sallum & Forattini (1996) e Sá et al. (2020) demonstraram a eficácia desta técnica em estudos detalhados aplicados ao subgênero *Melanoconion* de *Culex*.

A técnica de investigação das estruturas da genitália masculina é apontada como a ferramenta mais confiável para a distinção de espécies em taxonomia, porém é uma atividade extremamente específica e delicada, que requer protocolos sensíveis para a preparação das lâminas, bem como taxonomistas treinados para lidar e reconhecer as estruturas diminutas e frágeis que compõem a genitália (Sallum & Forattini, 1996)

Em *Microculex*, o procedimento de exame da genitália masculina se faz muito necessário ante a similaridade entre os indivíduos adultos, onde em muitos casos, somente dessa forma é possível a correta identificação da espécie. No entanto, ainda que a preparação da genitália obedeça a todos os preceitos técnicos, a ausência de chaves dicotômicas atualizadas e específicas para o subgênero dificulta, e não raro, impossibilita, a identificação.

### **1.6 Morfometria Geométrica Alar**

A técnica da morfometria tem por intenção, utilizando qualquer parte mensurável de determinado organismo, quantificar seu tamanho, sua forma e relacionar estas duas variáveis (Monteiro & Reis, 1999; Zelditch et al., 2012). Mais recentemente, uma variante da morfometria vem mostrando grande valia, por permitir melhor quantificação, visualização e comparação entre os padrões corporais convertidos em análises gráficas: a Morfometria Geométrica. Essa técnica é essencial na realização de estudos estatísticos multivariados de estruturas biológicas (Rohlf & Marcus, 1993; Monteiro & Reis, 1999). Os dados analisados são obtidos através da marcação de pontos anatômicos de uma determinada estrutura corporal do organismo em estudo, assim, mensura-se suas coordenadas posicionais em um plano cartesiano que recria a estrutura corporal (Rohlf & Marcus, 1993; Bookstein, 1991).

Quando utilizada em insetos, as asas são as estruturas que melhor atendem aos requisitos para a marcação dos marcos anatômicos. Por serem estruturas bidimensionais e possuir dezenas de pontos de encontro entre as nervuras alares, que são utilizados como pontos anatômicos, permitindo a utilização de um grande número de caracteres. As asas também revelam características herdadas pelo processo de adaptação e evolução (Dujardin, 2008; Jirakanjanakit et al., 2008). O tamanho alar é mensurado pelo vetor Tamanho do Centróide (*Centroid Size – CS*), uma técnica que visa, por meio de apenas uma variável, estimar o tamanho da asa (Bookstein, 1991). O formato alar é analisado pela sobreposição de Procrustes (*partial warps*) e posteriormente o estudo dos componentes principais (*relative warps*) e para excluir a variação do tamanho e obter a definição real dos formatos alares será realizada a análise de regressão das Coordenadas de Procrustes *versus* o tamanho do centróide, onde o efeito alométrico, que quantifica a influência do tamanho na forma é retirado das análises posteriores (Monteiro & Reis, 1999; Christe et al., 2016). Devido ao grande poder de resolução provenientes destas análises, é possível gerar marcadores populacionais, que por outro lado, apresentam grande utilidade no campo da taxonomia (Dujardin, 2008).

Utilizando da morfometria geométrica alar (MGA) voltada para o uso específico como marcador taxonômico em culicídeos, alguns estudos têm mostrado sua validade conseguindo diferenciar espécies muito próximas, inclusive as pertencentes a complexo de espécies. Resultado este, que coloca a MGA como ferramenta adicional à taxonomia clássica. Lorenz et al (2012) obtiveram sucesso em separar *Anopheles cruzii*, *An. homunculus* e *An. bellator*. Demari-Silva et al., (2014) revelaram padrões alares distintos em espécies do Complexo Coronator, de *Culex*. Wilke et al. (2016) mostraram a eficiência da morfometria geométrica alar como ferramenta taxonômica na identificação de gêneros e espécies de culicídeos.

No entanto, ao se notar a quantidade de conhecimento gerado a respeito de estudos existentes visando a caracterização por meio da morfometria geométrica alar, aqueles que visam as espécies silvestres à fauna brasileira são notavelmente raros.

### **1.7 Distribuição de mosquitos em Gradientes de Cobertura Vegetal.**

É sabido que o processo de urbanização é o acontecimento mais drástico e destrutivo que os ambientes naturais podem ser expostos. Esse processo causa mudanças radicais no ecossistema, causando fragmentação de habitats, e como

consequência, origina um padrão de mosaico no perfil de cobertura vegetal remanescente (Alberti & Marzluff, 2004).

A Mata Atlântica brasileira é um bioma caracterizado por floresta úmida e densa com alto nível de biodiversidade e endemismo. Em contrapartida, este é um dos biomas mais ameaçados do mundo (Myers et al., 2000). Nos últimos anos vem sendo observado seu crescente desmatamento e fragmentação, como resultado do processo de industrialização e aumento do território ocupado pela agricultura (Ribeiro et al., 2009). Estes eventos vêm tornando a Mata Atlântica, antes continua, em um mosaico de porções de vegetação existentes em uma matriz de territórios degradados (Joly et al., 2014).

A diminuição da riqueza de espécies nativas nos ambientes impactados, no geral, segue-se ao aumento da abundância de poucas espécies, que ao contrário das primeiras, são adaptadas a estes ambientes. Estudos de cunho epidemiológico vêm demonstrando que algumas dessas espécies adaptadas ao processo de urbanização têm potencial de se tornar pragas nos centros urbanos ou mesmo veicular agentes patogênicos a seres humanos (McKinney, 2002; Medeiros-Sousa et al., 2017; Johnson & Munshi-South, 2017). Do ponto de vista epidemiológico, os problemas decorrentes do processo de urbanização perfazem a proliferação de mosquitos adaptados, em decorrência do aumento substancial de criadouros artificiais (Edman, 1988). A adaptação de mosquitos nativos à ambientes alterados é algo que vem sendo investigado nas últimas décadas (Forattini et al., 1989, 1997). Porém, esse processo é muito mais verificado e demonstrado em mosquitos comprovadamente vetores de agentes etiológicos ao ser humano, como *Aedes albopictus* (Ayllón et al.; 2018), *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*, cujo comportamento de oviposição é intimamente associado a criadouros artificiais.

A diminuição da cobertura vegetal não acarreta unicamente a perda de biodiversidade e o isolamento de algumas espécies de mosquitos (Grime, 1973; Connel, 1978), mas também traz a possibilidade de aumento da circulação de arbovirus (Foley et al., 2005). Alguns estudos recentes vêm documentando que as alterações ambientais promovidas pelas ações humanas originam condições para mosquitos adaptados explorarem nova variedade de criadouros (Wilke et al., 2018; Montarsi et al., 2019).

Mesmo sendo considerado um subgênero típico de habitats silvestres e intermediários (Anjos & Navarro-Silva, 2008; Marchi et al., 2010; Silva et al., 2017),

encontrado em bromélias e buracos de árvores (Dorvillé et al. 1996), os encontros de espécies de *Microculex* em criadouras artificiais é um evento razoavelmente relatado. *Cx. (Mcx.) pleuristriatus* foi registrado em criadouro artificial por Kumm & Novis, 1938 e décadas mais tarde, o fato foi confirmado por outros pesquisadores (Forattini et al., 1997; Lourenço-de-Oliveira et al., 1986). *Cx. (Mcx.) gairus* foi observado em criadouro artificial, em associação com *Li. durhami* e *Cx. quinquefasciatus* (Lourenço-de-Oliveira et al., 1986). Esses registros podem ser um apontamento de que estas espécies, quando presentes em ambientes impactados, cuja principal característica é a perda de cobertura vegetal e aumento da oferta de criadouros artificiais podem migrar de seus criadouros típicos (bromélias) para aqueles que se mostrarem disponíveis.

Apesar de muito presente em estudos de levantamento de fauna de mosquitos, sobretudo aqueles cuja metodologia envolve a coleta das formas imaturas, *Microculex* conta apenas com dados secundários e pouco explorados a respeito de sua capacidade de adaptação e distribuição dentro dos gradientes de cobertura vegetal. Investigação esta que pode esclarecer panoramas a respeito do nível de adaptação do subgênero à ambientes impactados.

## **2 OBJETIVOS**

Examinar a variabilidade morfológica existente nas estruturas da genitália masculina, formato alar e avaliar questões ecológicas das espécies do subgênero *Microculex*.

### **2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Revisar características morfológicas da genitália masculina das espécies pertencentes ao subgênero *Microculex* de *Culex*.
- Redescrever as genitálias masculinas das espécies disponíveis.
- Caracterizar as espécies do subgênero *Microculex* por meio da morfometria geométrica alar.
- Avaliar os padrões ecológicos das espécies do subgênero *Microculex*.
- Propor nova chave dicotômica baseada nas estruturas das genitálias masculina.
- Investigar a presença de espécies não-descritas.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os espécimes utilizados nos estudos de MGA e padrões ecológicos são originários do Projeto de Pesquisa *“Biodiversidade de mosquitos (Diptera: Culicidae) no Parque Estadual da Cantareira e na Área de Proteção Ambiental Capivari-Monos, Estado de São Paulo”* (Processo FAPESP 2014/50444-5). Para a realização do estudo taxonômico, coletas foram realizadas em campo entre o período de Julho/2017 – Março/2021 (**Tabela 3**), como também consultas aos espécimes depositados na Coleção Entomológica de Referência da Faculdade de Saúde Pública (FSP/USP) e material cedido por pesquisadores (Aristides Fernandes, Biólogo; Dr. Paulo Roberto Urbinatti) (Tabela 2).

#### 3.1 Procedimento de coleta em campo e monitoramento em ambiente laboratorial.

Visando a disponibilidade do material referente a todos os estágios de vida dos espécimes, foi estabelecida a prerrogativa de atividade de campo voltada para a captura de formas larvais presente em bromélias (**Figura 1**). Os espécimes coletados em estágio larval ou de pupa foram acondicionados em recipientes plásticos vedados com tampa enquanto no ambiente de campo. Após a chegada ao laboratório, foram mantidos em vazilhames com cerca de 300ml, cada um rotulado com seu ponto de coleta discriminado. Após muitas observações e tentativas pouco efetivas de manutenção e monitoramento das larvas, foi constatado que a taxa de sobrevivência das espécies era em muito aumentada quando mantida a maior proporcionalidade do conteúdo aquático do criadouro original. Este método passou a ser adotado como conduta durante a maior parte das ocasiões. A substituição do conteúdo aquático foi realizada apenas em ocasiões específicas. A alimentação das larvas foi baseada em frações maceradas de ração para peixes tropicais (TetraMin®; Tetra Spectrum Brans, Blackburg, VA).



**Figura 1:** Vegetal Bromeliacea. (Fonte: Oliveira-Christe R)

As larvas foram monitoradas até seu desenvolvimento de 4º estágio. Nesse momento, cada uma era separada em recipientes menores, com cerca de 50ml. A metodologia de identificação de cada espécime associado com seu ponto de coleta foi mantido rigorosamente. O cuidado com esse procedimento garante que o exúvia larval pudesse ser comparada com a pupa e conseqüentemente, também com o indivíduo adulto. As exúvias das larvas e pupas foram mantidas armazenadas em microtubos contendo etanol 80%, identificadas com o local de coleta e código numérico específico, unicamente compatível com o código direcionado ao espécime adulto, armazenado em microtubo individual. Esse procedimento garante a fidedigna associação de todas as fases de vida de cada indivíduo (**Figura 2**)

Após a emergência do espécime adulto, era esperado o período de ao menos 24 horas para este ser eutanaziado com acetato de etila e posteriormente acondicionados em microtubos contendo sílica gel. Os espécimes machos foram submetidos ao processo de extração da genitália para posterior montagem em lâmina. Os espécimes fêmeas, bem como todo seu material associado foi mantido em freezer -20°C para posteriores

procedimentos de estudo que fogem aos preceitos desta tese, e exemplifica a forma adotada para manutenção dos espécimes em condições laboratoriais.

**Tabela 2.** Relação das lâminas cedidas para estudo comparativo das genitálias masculinas.

---

FSP/LESP224 - <i>Cx. aureus</i>
FSP/LESP2241 - <i>Cx. aureus</i>
FSP/LESP2978 - <i>Cx. dubitans</i>
FSP/LESP2979 - <i>Cx. dubitans</i>
FSP/LESP0736- <i>Cx.pleuristriatus</i>
FSP/LESP3179- <i>Cx.pleuristriatus</i>
FSP/LESP3282- <i>Cx.pleuristriatus</i>
FSP/LESP5282- <i>Cx.pleuristriatus</i>
FSP/LESP2081- <i>Cx.pleuristriatus</i>
FSP/LESP02492 - <i>Cx. aphyllactus</i>
FSP/LESP22492- <i>Cx. aphyllactus</i>
FSP/LESP089 - <i>Cx. aphyllactus</i>
FSP/LESP010 - <i>Cx. aphyllactus</i>
FSP/LESP011- <i>Cx. aphyllactus</i>
FSP/LESP212- <i>Cx. aphyllactus</i>
FSP/LESPJ7 - <i>Cx. aphyllactus</i>
FSP/LESP997- <i>Cx. aphyllactus</i>
FSP/LESP1485 - <i>Cx. elongatus</i>
FSP/LESP1482 - <i>Cx. elongatus</i>
FSP/LESP9284 - <i>Cx. elongatus</i>
FSP/LESP8582 - <i>Cx. elongatus</i>
FSP/LESP1487 - <i>Cx. elongatus</i>
FSP/LESP131 - <i>Cx. neglectus</i>
FSP/LESP811 - <i>Cx. lanei</i>
FSP/LESP1445 - <i>Cx. lanei</i>
FSP/LESP232 - <i>Cx. davisi</i>
FSP/LESP233 - <i>Cx. davisi</i>

---

### **3.2 Preparação e montagem da genitália masculina**

Os espécimes machos, após a retirada de suas respectivas genitálias, foram rotulados e devidamente armazenados em caixas entomológicas, seguindo todos os protocolos tradicionais instaurados pelas práticas entomológicas. Este procedimento resguarda os espécimes de degradação e garante a plena execução de futuros estudos de cunho taxonômico. Os códigos numéricos originais foram mantidos, assegurando a plena associação com as exúvias da larva e pupa (mantidas em freezer – 20°C).

As genitálias, retiradas com o auxílio de microtesoura. Após o procedimento, foram colocadas em placas de porcelana contendo solução de hidróxido de potássio (KOH) 20% em temperatura ambiente pelo período de 12 horas. Após esse espaço de tempo, a solução de hidróxido de potássio foi removida com auxílio de pipeta e subsequentemente, a substituição pelo álcool acético 20% pelo período de 15 minutos. Após este período, o álcool acético foi retirado e uma gota de fucsina acética foi adicionada e mantida por cerca de 20 minutos.

Após a retirada do volume de fucsina ácida, feito de maneira cuidadosa para manter a genitália preservada, foi dado início à série alcoólica crescente. Este passo consiste em períodos de 15 minutos de contato da genitália, plenamente submersa em volume de álcool (80%, 90%, 95% e 100%), respectivamente. Após a retirada da última porção alcoólica (100%), foi colocado eugenol, assim permanente por no mínimo duas horas.

Com uso de micro alfinetes as genitálias foram dissecadas em lâmina. Lupa estereoscópica foi utilizada para permitir a observação. Neste procedimento, diminuta quantidade de Eugenol foi utilizada para manter a superfície utilizada sem abrasão, e assim garantir a integridade das estruturas. Após a dissecação, todas as partes que compõem foram dispostas em posições padronizadas para garantir a melhor observação. Após este posicionamento, foi adicionado como agente fixador, discreta quantidade de Bálsamo do Canadá. Após este procedimento, as lâminas foram mantidas 24h em temperatura ambiente para a secagem do bálsamo. O passo seguinte foi adição de nova camada do agente fixador e novo período de secagem, este, não menor que 120 horas, em estufa a 40°C. Transcorrido esse período, as estruturas genitais foram cobertas com laminula, com o auxílio de nova e fina camada de bálsamo e acondicionadas novamente em estufa para secagem. Após a secagem, as lâminas foram devidamente rotuladas com

o código número referente ao seu material associado (identificação única) bem como local e data de coleta (**Figura 3**)



**Figura 2:** Espécimes adultos, exúvia das larvas e pupas separados e identificados individualmente.



**Figura 3:** Lâminas utilizadas para o estudo taxônomico das genitálias masculinas do subgênero *Microculex*.

### **3.3 Análise morfológica das genitálias**

Para os procedimentos de redescrição da genitália, foi utilizada a prerrogativa de comparação entre os indivíduos da mesma espécie. Para tanto, foram selecionados ao menos 10 exemplares, levando em consideração a disponibilidade. Para as espécies deprovidas deste número amostral, foram utilizadas as amostras disponíveis (Sá et al., 2020). A comparação com lâminas depositadas em coleção entomológica de referência foi determinada como passo essencial para a validação das espécies observadas. Porém, quando este procedimento não pode ser executado, a observação das estruturas previamente assinaladas como diagnósticas por estudos posteriores foi utilizada para a determinação das espécies. De forma concomitante, a observação e comparação de estruturas secundárias, menos salientadas nas descrições originais foi determinada como método imperativo para o completo conhecimento da estrutura genital. Estas observações trazem a perspectiva de novas informações sobre as características intrínsecas de cada espécie.

A observação das estruturas inerentes às genitálias foi realizada utilizando microscópio com aumento de 400X. As estruturas que compõem a genitália masculina foram observadas e comparadas com suas equivalentes, espécie por espécie, assim, tornando possível a distinção de características típicas e variáveis entre as amostras. As medições das estruturas componentes foram feitas utilizando de ocular milimetrada.

### **3.4 Ilustrações**

Baseado nas observações realizadas em microscópio foram elaboradas ilustrações taxonômicas. Estas, executadas com uso de grafite fino (0,3mm) e papel canson. Após minuciosa verificação da qualidade da ilustração, obedecendo preceitos de proporcionalidade e fundamentação das nuances observadas, os traços foram cobertos utilizando nanquin. Posteriormente as ilustrações foram digitalizadas em equipamento HP scanjet 3670 digital Flatbed Scanner.

### 3.5 Extração das asas e preparação das lâminas.

De acordo com os resultados previamente obtidos nas atividades de campo na Área de Proteção Ambiental Capivari-Monos durante os anos de 2018-2019, as espécies que detinham número amostral suficiente para contemplar os intentos estatísticos desta análise foram: *Cx. (Mcx.) imitator*; *Cx. (Mcx.) worontzowi*; *Cx. (Mcx.) pleuristriatus*; *Cx. (Mcx.) albipes*; *Cx. (Mcx.) lanei*, (**Tabela 3**).

As larvas e pupas das referidas espécies foram coletadas no interior de bromélias por meio da utilização de bombas de sucção com capacidade de 500ml, providas com mangueira de silicone. A seguir, os espécimes foram acondicionados em recipientes plásticos devidamente vedados e rotulados de acordo com a data e localização das bromélias e encaminhados para o Laboratório de Entomologia e Saúde Pública, (LESP) onde foram monitorados até a emergência dos adultos. A identificação dos espécimes foi realizada por meio da consulta de chaves especializadas (Lane & Whitman, 1951; Lane, 1953; Cotrim & Galati, 1977).

Os espécimes fêmeas selecionados para a condução dos experimentos tiveram suas asas direitas extraídas com uso de microtesoura. Para melhor observação das nervuras alares, de forma extremamente delicada, relativa quantidade de escamas das asas foram retiradas com pincel dotado com cerdas macias. Após esse procedimento, as asas foram fixadas entre lâmina e lâminula contendo Bálsamo do Canadá. As lâminas utilizadas continham obrigatoriamente todas as informações determinantes para às correlacionar com o espécime relativo à asa utilizada.

**Tabela 3:** Espécies de *Microculex* utilizadas nas análises de morfometria geométrica alar e seu número amostral (N)

Táxon	N
<i>Cx. (Mcx.) imitator</i>	20
<i>Cx. (Mcx.) worontzowi</i>	18
<i>Cx. (Mcx.) pleuristriatus</i>	30
<i>Cx. (Mcx.) albipes</i>	10
<i>Cx. (Mcx.) lanei</i>	7

A captura das imagens foi realizada com auxílio de camera Leica DFC320 munida de esteromicroscópio com aumento de 40X. Estas imagens digitalizadas foram armazenadas em banco de dados.

Para continuidade do experimento, 18 pontos anatômicos previamente validados por estudos anteriores, foram marcados em cada registro das asas por meio do Software TpsDig V1.40 (Louise et al., 2015; Dujardin et al., 2010; Fruciano, 2016; Christe et al, 2019). Importante mencionar que todos os registros fotográficos, bem como as marcações dos pontos anatômicos foram realizados pelo mesmo observador (Rafael de Oliveira Christe). Posteriormente, estes dados foram exportados para Software MorphoJ 1.02 (Klingenberg, 2011) e PAST (Hammer et al., 2001).

A avaliação do Tamanho do Centróide (*Centroid-Size* - CS), importante marcador para determinar o tamanho do objeto, foi mensurada com o auxílio do Software MorphoJ 1.02. O efeito alométrico, que é, de maneira simplificada, a quantificação do tamanho da estrutura em seu formato, foi determinado por meio da regressão multivariada das coordenadas de Procrustes com 10,000 randomizações. (Wilke et al., 2016).

Para determinar o grau de dissimilaridade entre as espécies estudadas, foi utilizada a Análise de Variáveis Canônicas (AVC). Esta análise é realizada por meio da utilização e comparação das Distâncias de Mahalanobis entre as espécies. Esta análise tem por intenção proporcionar uma descrição, baseada no índice de variação morfológica através do conjunto de dados multivariados. O resultado é, em síntese, a diferença entre os grupos (extrínseco) ou mesmo, dentro dos grupos (intrínseco) (Ravindra & Dayanand, 2000)

Também tendo por base as Distâncias de Mahalanobis mensuradas, foi realizada a análise de Validação Cruzada, que avalia o grau de semelhança entre os espécimes, de maneira “cega”. Neste método, cada indivíduo é classificado (reclassificado) de acordo com o grau de similaridade inerente a cada grupo pré-determinado. Para tornar a visualização do grau de deformação das asas entre as espécies melhor comparável, foram concebidos gráficos de deformação (Wireframes), também providos pelo Software MorphoJ 1.02.

### **3.6 Dispersão das espécies na Cobertura Vegetal.**

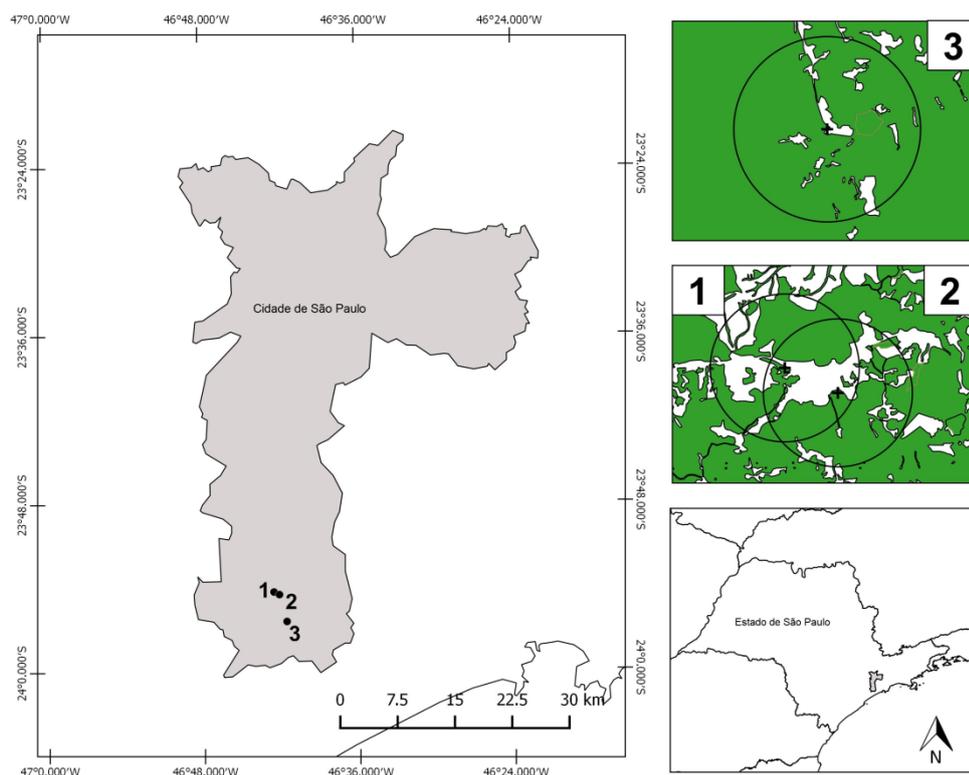
Os esforços de coleta foram realizados de Março de 2015 a Abril de 2017, mensalmente, especificamente na região de Marsilac, extremo Sul da Cidade de São Paulo. Três localidades foram selecionadas no citado distrito, cada um deles, correspondendo a determinado grau de cobertura vegetal. Nestes locais, vegetais *Bromeliacea* foram explorados com uso de bombas de sucção providas com mangueira de silicone, de forma a extrair o máximo do conteúdo aquático existente em suas axilas

folhiaras e tanque central. Criadouros artificiais, quando presentes foram investigados por meio de conchas entomológicas. Para visualizar o nível de cobertura vegetal de cada ponto, foram construídos *buffers* de 1km ao redor do ponto central, e a partir de tal informação, foi estimada a porcentagem de cobertura vegetal a partir do Software QGIS v2. 18.9 (<http://www.qgis.org>) (**Figura 4**)

**Local 1: Marsilac** (23° 54.395' S/46° 42.486' O). Este ponto faz referência ao local provido com maior volume de habitações e circulação de pessoas. A existência de via de automóveis e chácaras torna a localidade com razoável nível de antropização. Neste local foram exploradas 4 bromélias epífitas 1 bromélia de solo e um buraco de árvore.

**Local 2: Zona de Transição** (23° 54.556' S/46° 42.167' O). A escolha deste local se fez pertinente por representar a realidade do ambiente que comportam tanto o aspecto rural (com hortas, criações de galináceos e bovinos) que culmina nos efeitos da derrubada da mata original, como o aspecto da mata nativa, que ainda ocupa relevante parte do território da APA Capivari- Monos. A localidade em questão faz referência á propriedade particular, situada nas proximidades do centro do distrito de Marsilac. Neste local foram exploradas duas bromélias epífitas. De acordo com as mensurações, a cobertura vegetal da localidade corresponde a 70%.

**Local 3: Cachoeira** (23° 56.378' S/46° 41.659'O). Este ponto foi selecionado com sendo aquele que melhor representa, em termos de flora, o que melhor representa o conjunto nativo da região. Em sua área há uma cachoeira muito visitada na região. Apesar de possuir grande diversidade de vegetais Bromeliacea, foram selecionadas quatro (epífitas) para serem alvos das coletas durante o período do projeto. Por ser um local com baixa ação da atividade humana, o nível de cobertura vegetal é de 90%.



**Figura 4:** Mapa indicando a localização dos pontos de coleta das espécies de *Microculex* na Cidade de São Paulo. Os espaços preenchidos pela cor verde representam a cobertura vegetal típica da região da APA Capivari-Monos (Floresta ombrófila densa ou floresta heterogênea). Os espaços em branco fazem menção às regiões afetadas pela atividade humana (ruas, propriedades rurais e bairros). As sinalizações em forma de “cruz” apontam para os locais onde as coletas foram efetivamente executadas. Os círculos representam os “buffers” de 1km estabelecidos como margem de comparação entre os locais. O mapa foi gerado a partir do software QGIS v2.18.9 ([www.qgis.org](http://www.qgis.org)). (Adaptado de Oliveira-Christe et al., 2019).

Importante mencionar que nestes locais foram também explorados criadouros artificiais que eram compostos por pneus (existentes nos Locais 1 e 3) e recipientes plásticos (existentes no Local 2). Cabe expor que a presença de pneus no Local 3, tratado aqui como típico ambiente silvestre e preservado, se vale pela existência de uma (única) moradia humana no entorno. De acordo com investigações florísticas, foi consolidado que todas as bromélias investigadas eram representantes da mesma Família (*Vriesea* (Sub-Família: *Tillandsioidea*). Para manter o grau de confiabilidade do produto final do levantamento, foi certificado, em cada ação de coleta, que o vegetal, e também o mesmo criadouro artificial eram alvos da investigação.

As larvas e pupas de *Microculex* coletadas foram acondicionadas em recipientes plástico devidamente vedados e identificados tendo como identidade o local, o dia, e tipo de criadouro. Estes foram encaminhados para o Laboratório de Entomologia em

Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo. (LESP/USP). Para controle interno, visando a melhor organização do trabalho, cada criadouro contava com um número de identificação. Essa identificação, por ser de natureza não-oficial, foi desprezada após a consolidação das análises. Para o produto final dos intentos do trabalho, foram mantidas as discriminações “Bromélia de solo”, “Bromélia epífita” e “criadouro artificial”, sendo este item, contemplando a vasta gama de possibilidades dentro de sua natureza (pneus, garrafas, recipientes plásticos).

Os indivíduos imaturos foram mantidos em recipientes artificiais, onde seu conteúdo aquático original foi mantido pelo maior tempo possível. A alimentação das larvas foi feita com ração para peixes Tetra Min®. Estas foram de forma a não haver grande competição por alimento, para tanto, a separação em diversos recipientes foi providenciada. Diariamente o monitoramento foi executado, quando em estado de pupa, o indivíduo era separado para recipiente de tamanho reduzido, e sua exúvia conservada em microtubo de 1,5ml contendo álcool 80%, devidamente identificado com as informações pertinentes a corresponder ao adulto que viria a emergir.

Após a emergência do adulto, a exúvia da pupa era colocada no mesmo microtubo de sua exúvia larval correspondente. O adulto, após 24 horas era eutanasiado com Acetato de Etila. Os indivíduos foram identificados utilizando chaves dicotômicas especializadas (Lane & Whitman, 1951; Lane, 1953; Cotrim & Galati, 1977).

Para verificar investigar o grau de similaridade de espécies entre os ambientes pesquisados, foi utilizado o Índice de Sorensen. Pela sua natureza estabelecer a variação de 0 a 1, a similaridade de espécies é apontada como maior, quanto mais próximo do número “1” o índice se apresentar (Sorensen, 1948). A execução desta análise obedeceu a duas perspectivas. Primeiramente foram submetidas a ela todas as espécies de *Microculex* coletadas. Em seguida foram submetidas e separadas as duas espécies mais abundantes: *Cx. (Mcx.) imitator* e *Cx. (Mcx.) pleuristriatus*. Para a condução correta do experimento, baseado na premissa de que o Índice de Sorensen pressupõe a existência de variáveis de resposta, a Média de Abundância Larvária (o número total de larvas encontradas divididas pelo número total de criadouros explorados) e a Densidade Larvária (o número estimado de larvas existentes a cada 1.000ml de água extraído das bromélias ou criadouros artificiais) foram definidos como tais. Modelos de Efeito-Misto foram utilizados. Esta condução se justifica pela definição de que cada amostra coletada foi definida como uma pseudo-réplica, ou seja, repetidas mensurações foram obtidas utilizando o mesmo local, porém em ocasiões temporais distintas (Chaves, 2010). Em

consonância com a estrutura do Índice de Sorensen, é preciso que haja a definição de um Efeito Fixo, e este, de acordo com as prerrogativas do experimento, foi determinado como sendo a proporcionalidade de cobertura vegetal encontrada nas localidades exploradas (60%, 70% e 90%). Por fim, para complementar os itens necessários para a condução do cálculo, os meses dos anos de coleta foram incorporados como Efeitos Randômicos.

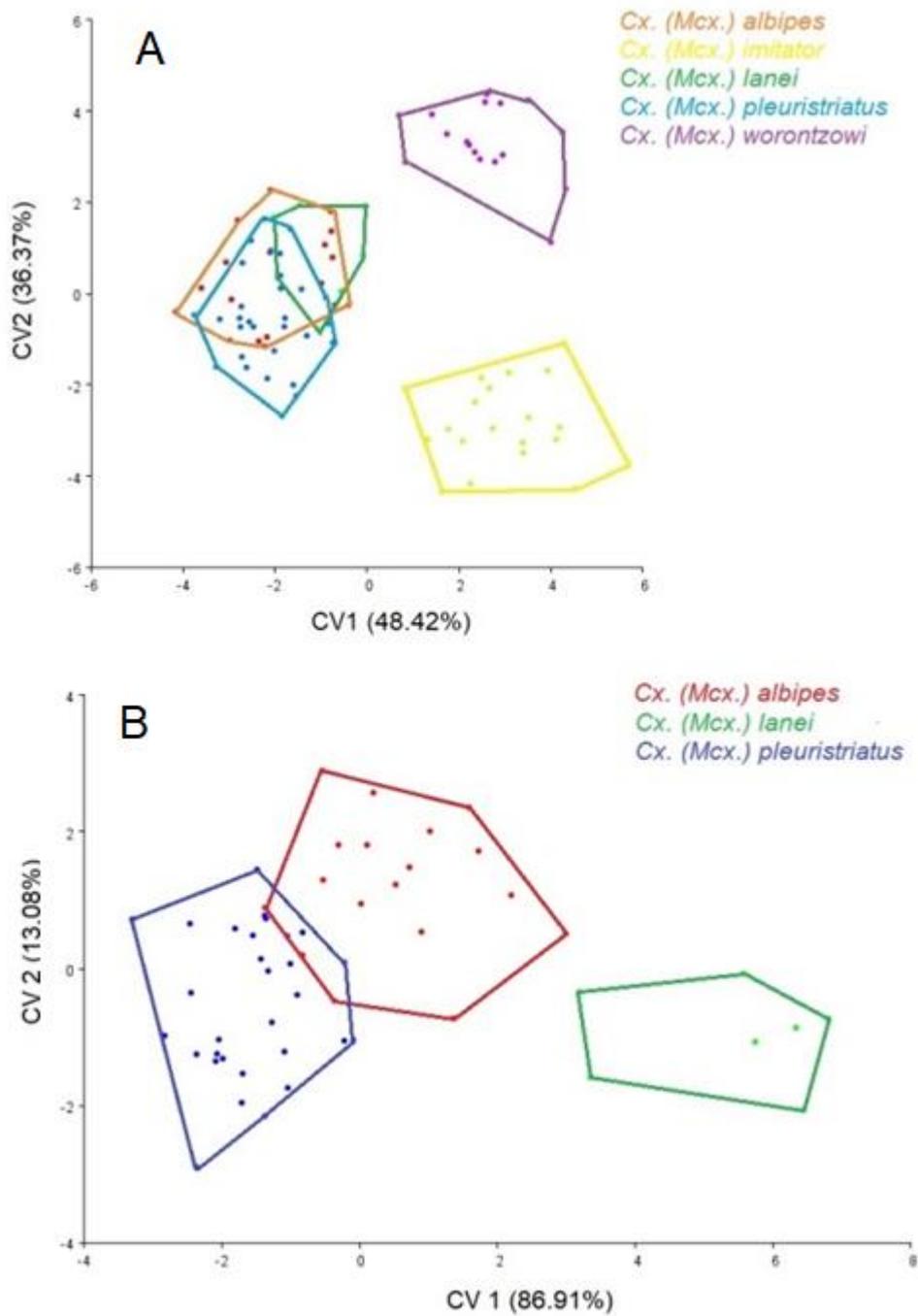
Baseado na definição de que os resultados oriundos fazem menção a registros de abundância, a opção do uso de erros de Poisson foi baseada na verificada pela independência residual, ausência de dispersão e a presença de amostras negativas (Dupuy, 2018). Após todos os passos de verificação acerca da normalidade dos parâmetros empregados, foi constatado que todos os apresentavam comportamento adequado. A totalidade das análises foi conduzida em ambiente computacional R (R Development Core Team, 2018) com emprego dos pacotes lme4 (Bates et al, 2016) e DHARMA (Hartig, 2018).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Morfometria geométrica alar

A análise do Tamanho do Centróide revelou valores estatisticamente significantes entre as espécies estudadas (ANOVA:  $F(18.87)$ ,  $p < 0,01$ ). Mesmo após a exclusão do efeito alométrico (4,91%,  $p < 0,001$ ) os valores continuaram a ser significantes. Este resultado trás a evidência de que no que concerne aos representantes de *Microculex* aqui investigados, o Tamanho do Centróide tem relevante importância na determinação da espécie de forma correta.

A investigação acerca da conformação morfológica das asas no espectro das Variáveis Canônicas revelou a alocação dos indivíduos em três grupos distintos no morfoespaço (**Figura 5a**). É possível observar a completa singularidade em termos morfológicos das asas a respeito dos representantes das espécies: *Cx. (Mcx.) imitator* e *Cx. (Mcx.) worontzowi*. Esse resultado aponta que baseado unicamente no formato das asas, estas espécies podem ser, acertadamente discernidas. No entanto, o mesmo não pode ser observado no que tange as espécies que compõem o Grupo Pleuristriatus (*Cx. (Mcx.) pleuristriatus*; *Cx. (Mcx.) albipes*; *Cx. (Mcx.) lanei*), onde nesse caso foi constituído único grupo observável dotado de completa sobreposição entre as espécies. Porém, para melhor quantificar as reais discrepâncias entre as espécies do Grupo Pleuristriatus, foi conduzida outra análise de Variáveis Canônicas, nesta ocasião desprovida da presença de *Cx. (Mcx.) imitator* e *Cx. (Mcx.) worontzowi*. A **Figura 5b** mostra a conformação das espécies do Grupo Pleuristriatus de forma isolada. Neste panorama, é possível determinar a singularidade alar da espécie *Cx. (Mcx.) lanei*. Apesar de revelar ainda algum grau de sobreposição, a conformação vista no morfoespaço, mostra que, com relativa segurança, é possível fixar a diferença morfológica entre as espécies *Cx. (Mcx.) pleuristriatus* e *Cx. (Mcx.) albipes*. Em consonância com os resultados apresentados nas figuras referentes às Variáveis Canônicas, a análise das Distâncias de Mahalanobis entre as espécies de *Microculex* revelaram importante intervalo (2.4004-6.3171), tendo sido estatisticamente significativa em sua totalidade ( $p < 0,001$ ) (Tabela 4).



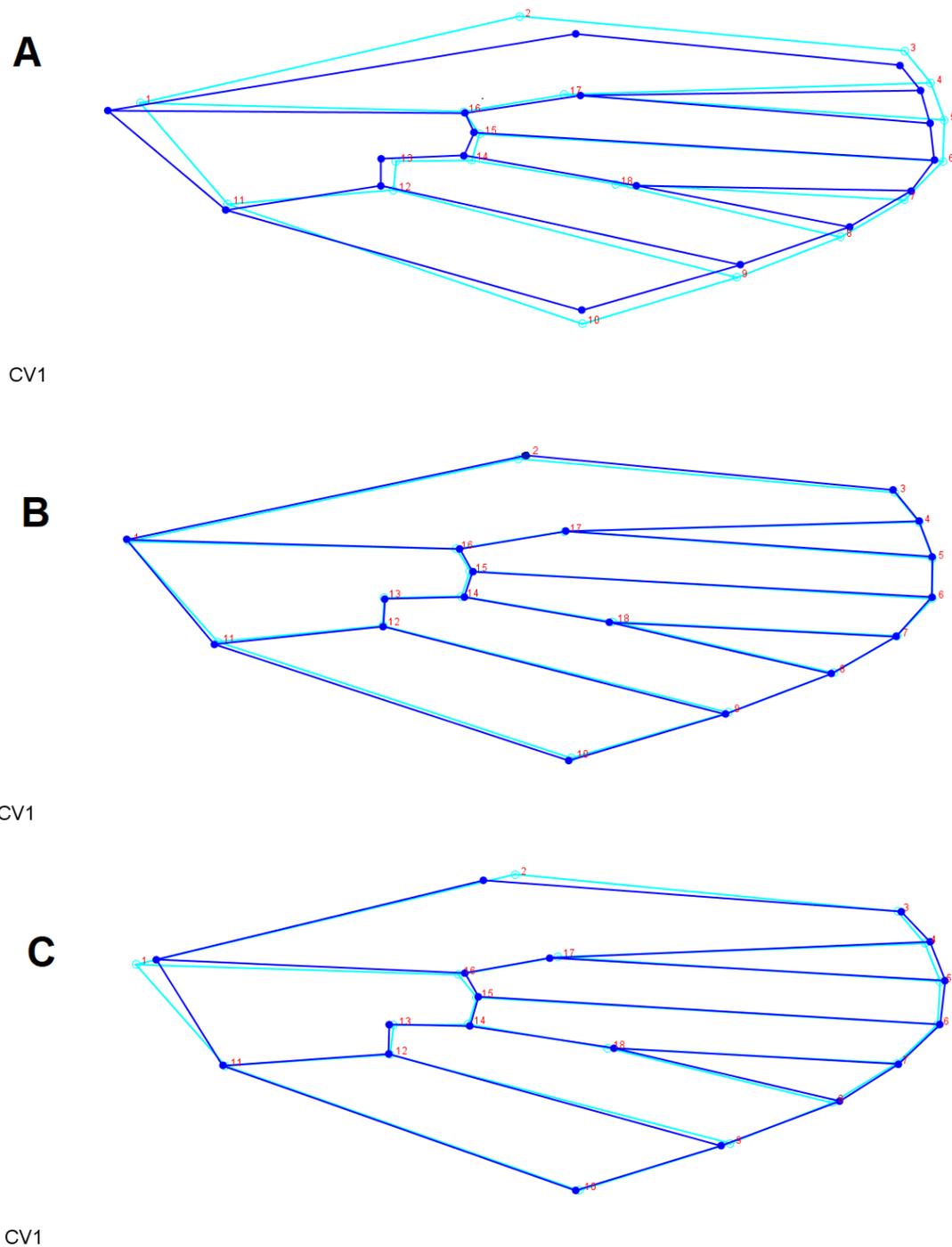
**Figura 5:** Representação do morfoespaço produzida pelas Variáveis Canônicas encontradas no formato alar das espécies de *Microculex*. **A)** Comparação entre as CVA das cinco espécies do Subgênero *Microculex*. **B)** Comparação das CVA das três espécies pertencentes ao Grupo *Pleuristriatus*.

**Tabela 4:** Valores e significância estatística das Distâncias de Mahalanobis.

	<i>Cx. (Mcx.) albipes</i>	<i>Cx. (Mcx.) imitator</i>	<i>Cx. (Mcx.) lanei</i>	<i>Cx. (Mcx.) pleuristriatus</i>	<i>Cx. (Mcx.) worontzowi</i>
<i>Cx. (Mcx.) albipes</i>	X	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
<i>Cx. (Mcx.) imitator</i>	6,0414	X	<.0001	<.0001	<.0001
<i>Cx. (Mcx.) lanei</i>	3,7536	6,5162	X	<.0001	<.0001
<i>Cx. (Mcx.) pleuristriatus</i>	2,4004	5,7877	4,8108	X	<.0001
<i>Cx. (Mcx.) worontzowi</i>	5,7488	6,3171	6,0235	6,1475	X

A conformação visual trazida pelo Gráfico de Deformação (Wireframe), concebido com fator de escala 10.0 tornou possível a observação da variação existente em todos os pontos anatômicos analisados. No entanto, quando investigados de maneira mais criteriosa, a heterogeneidade vista nos pontos anatômico 1 e 2 são nitidamente mais acentuados. Porém, de maneira geral, tanto os pontos localizados internamente à asa (12,13,14,15) quanto aqueles que constituem a chamada borda alar (3,4,5,6,7,8,9,10) revelam considerável variação (**Figura 6a**). Para realizar o intuito de tornar melhor observável o grau de variação anatômica, *Cx. (Mcx.) imitator* foi comparado diretamente com *Cx. (Mcx.) worontzowi*, em um wireframe (**Figure 6b**) enquanto as espécies pertinentes ao Grupo Pleuristriatus: *Cx. (Mcx.) pleuristriatus*, *Cx. (Mcx.) albipes* e *Cx. (Mcx.) lanei*, devido ao grau de similaridade intrínseco, relevado pela análise de CVA, foram comparadas isoladamente (**Figure 6c**).

No que se refere ao grau de variação entre *Cx. (Mcx.) imitator* e *Cx. (Mcx.) worontzowi*, é nítida a variação mais acentuada nos pontos 1, 9, 10 e 11, sendo menos evidente nos demais. A respeito do Wireframe conduzido para a observância das espécies do Grupo Pleuristriatus, foi possível observar a grande variação na maior parte dos pontos anatômicos, em particular dos pontos 1, 2, 9, 16, 17 e 18. No entanto, é importante mencionar que baseado neste experimento conduzido, não houve a detecção nos pontos 11 e 12 entre as espécies do Grupo Pleuristriatus.



**Figura 6: Wireframe baseado na sobreposição da Variável Canônica 1.** Linha Azul: Representa a média das variações encontradas nas espécies. Linha Azul Escuro: Representação da variação encontrada na CV1. **A)** *Cx. (Mcx.) imitator*, *Cx. (Mcx.) worontzowi*, *Cx. (Mcx.) pleuristriatus*, *Cx. (Mcx.) albipes* e *Cx. (Mcx.) lanei*. **B)** *Cx. (Mcx.) imitator*, *Cx. (Mcx.) worontzowi*. **C)** *Cx. (Mcx.) pleuristriatus*, *Cx. (Mcx.) albipes* e *Cx. (Mcx.) lanei*.

O Teste de Reclassificação mostrou de uma forma geral, que as espécies de *Microculex* estudadas podem ser corretamente identificadas com relativa segurança. Inicialmente foram conduzidas cinco comparações diretas. Nesta comparação, o Grupo 1 é composto pelas espécies alocadas nas respectivas linhas, e comparadas com as espécies alocadas nas colunas, que representam o Grupo 2 (**Tabela 5**). Nesta análise, em cinco comparações a taxa de acerto foi superior a 75%, e em um caso (*Cx. (Mcx.) imitator* X *Cx. (Mcx.) worontzowi*), a eficácia na determinação das espécies foi de 100%. Quando realizado o teste do Grupo 2 com o Grupo 1, seis comparações obtiveram mais que 75% de taxa de acerto, novamente *Cx. (Mcx.) worontzowi* X *Cx. (Mcx.) imitator* atingiu o maior valor de acurácia na determinação correta das espécies, que foi de 94%. Se faz necessário apontar que algumas comparações obtiveram níveis baixos de assertividade, como *Cx. (Mcx.) worontzowi* X *Cx. (Mcx.) lanei*, que atingiu o valor de 44%.

**Tabela 5:** Valores (%) referentes a Validação Cruzada das cinco espécies de *Microculex*.

	<i>Cx.(Mcx.) imitator</i>	<i>Cx.(Mcx.) worontzowi</i>	<i>Cx.(Mcx.) pleuristriatus</i>	<i>Cx.(Mcx.) albipes</i>	<i>Cx.(Mcx.) lanei</i>
<i>Cx.(Mcx.) imitator</i>	X	94%	80%	75%	71%
<i>Cx.(Mcx.) worontzowi</i>	100%	X	83%	55%	44%
<i>Cx.(Mcx.) pleuristriatus</i>	90%	83%	X	60%	86%
<i>Cx.(Mcx.) albipes</i>	55%	55%	72%	X	85%
<i>Cx.(Mcx.) lanei</i>	90%	71%	85%	70%	X

#### 4.2 Distribuição de *Microculex* na Cobertura Vegetal.

Ao longo do período destinado as atividades de campo, 14 espécies de *Culex* (*Microculex*) foram documentadas, somando os registros de todos os locais investigados. Do total de 1.028 espécimes coletados, as espécies que apresentaram a maior abundância foram *Cx. (Mcx.) pleuristriatus* e *Cx. (Mcx.) imitator*, representando 39,54% e 19,86%, respectivamente (**Tabela 6**). Em termos de abundância, é notória a frequência de *Cx. (Mcx.) albipes* e *Cx.(Mcx.) neglectus* em todos os ambientes mensurados, sendo, como no caso do Local 3 (Cachoeira) mais abundantes que *Cx. (Mcx.) imitator*.

Cada um dos três ambientes apresentou o mesmo número de espécies amostradas: 11. A diferença na composição destas foi discreto. Tendo o Índice de Sorensen como parâmetro de similaridade, o Local 1 e Local 2, respectivamente apresentando 60% e 70% de cobertura vegetal, revelaram-se os mais similares em termos de composição de espécies. (**Tabela 7**)

Ao que se refere aos registros em criadouros artificiais, é válido salientar que apenas as espécies pertencentes a Série Pleuristriatus foram encontradas no interior destes. 8 indivíduos de *Cx. (Mcx.) albipes* fora encontrados e recipientes plásticos; 9 indivíduos de *Cx. (Mcx.) aureus* foram reportados em encerado de caminhão. No entanto, o maior registro dessa natureza ficou por conta da espécie *Cx. (Mcx.) pleuristriatus*, onde 81 espécimes foram coletados em pneus abandonados. Apesar destes encontros em criadouros artificiais, *Mc. (Mcx.) albipes* e *Cx. (Mcx.) pleuristriatus* também foram documentados no interior de bromélias. Fato este que não pode ser documentado ao que se refere a *Cx. (Mcx.) aureus*, que sob o jugo deste trabalho, foi documentado apenas em criadouros artificiais, e factualmente, restrito ao Local 3 (Cachoeira).

Ao se mapear de maneira ainda mais detalhada os registros de espécies, é possível notar que algumas tiveram seus registros restritos a determinadas localidades, como o já citado caso de *Cx. (Mcx.) aureus*. A saber, *Cx. (Mcx.) aphyllactus* foi documentado apenas no Local 1 (Cachoeira); o mesmo sendo observado para *Cx. (Mcx.) davisii*; *Cx. (Mcx.) lanei* teve seu encontro registrado unicamente no Local 2 (Área de Transição). De acordo com proporcionalidade do registro das espécies, algumas revelaram raras no ambiente, perfazendo, cada uma, menos de 1% do volume total. São elas: *Cx. (Mcx.) aphyllactus*, *Cx. (Mcx.) aureus*, *Cx. (Mcx.) daumasturus*, *Cx. (Mcx.) inimitabilis*, *Cx. (Mcx.) davisii*, e *Cx.(Mcx.) lanei*

A título da investigação pertinente a questão da proporção da cobertura vegetal e sua influência sob a densidade larvária e posterior abundância de mosquitos do subgênero *Microculex*, os modelos de Efeito-Misto utilizados revelaram que existe uma dependência de resposta, que leva em consideração à espécie e qual tipo de variável a ser considerada. Este dado é exposto na **Tabela 8**.

**Tabela 6:** Espécies de *Culex (Microculex)* coletados entre Março/2015 – Abril/2017, de acordo com a localidade e o criadouro documentado.

<b>Espécie</b>	<b>Local 1</b>	<b>Local 2</b>	<b>Local 3</b>	<b>Total</b>
<b><i>Cx. (Mcx.) albipes</i></b>	<b>60</b>	<b>40</b>	<b>33</b>	<b>133</b>
Criadouro artificial	8			8
Bromélia Epífita	17	40	33	90
Bromélia de Solo	35			35
<b><i>Cx. (Mcx.) aphyllactus</i></b>	<b>3</b>			<b>3</b>
Bromélia de Solo	3			3
<b><i>Cx. (Mcx.) aureus</i></b>			<b>9</b>	<b>9</b>
Criadouro Artificial			9	9
<b><i>Cx. (Mcx.) daumasturus</i></b>	<b>4</b>	<b>2</b>		<b>6</b>
Bromélia Epífita	4	2		6
<b><i>Cx. (Mcx.) davisi</i></b>			<b>2</b>	<b>2</b>
Bromélia Epífita			2	2
<b><i>Cx. (Mcx.) dubitans</i></b>	<b>19</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>44</b>
Bromélia Epífita	13	10	15	38
Bromélia de Solo	6			6
<b><i>Cx. (Mcx.) fuscatus</i></b>	<b>8</b>	<b>11</b>	<b>3</b>	<b>22</b>
Bromélia Epífita	7	11	3	21
Bromélia de Solo	1			1
<b><i>Cx. (Mcx.) gr.imitator</i></b>	<b>28</b>	<b>20</b>	<b>26</b>	<b>74</b>
Bromélia Epífita	20	20	26	66
Bromélia de Solo	8			8
<b><i>Cx. (Mcx.) imitator</i></b>	<b>84</b>	<b>26</b>	<b>100</b>	<b>210</b>
Bromélia Epífita	54	26	100	180
Bromélia de Solo	30			30
<b><i>Cx. (Mcx.) inimitabilis</i></b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>7</b>
Bromélia Epífita		4	1	5
Bromélia de Solo	2			2
<b><i>Cx. (Mcx.) lanei</i></b>		<b>2</b>		<b>2</b>
Bromélia Epífita		2		2
<b><i>Cx. (Mcx.) neglectus</i></b>	<b>19</b>	<b>13</b>	<b>17</b>	<b>49</b>
Bromélia Epífita	14	13	17	44
Bromélia de Solo	5			5
<b><i>Cx. (Mcx.) pleuristriatus</i></b>	<b>322</b>	<b>51</b>	<b>37</b>	<b>410</b>
Criadouro Artificial	78	3		81
Bromélia Epífita	75	36	37	148
Bromélia de Solo	169	12		181
<b><i>Cx. (Mcx.) worontzowi</i></b>	<b>8</b>	<b>20</b>	<b>29</b>	<b>57</b>
Bromélia Epífita	8	20	29	57
<b>Total</b>	<b>557</b>	<b>199</b>	<b>272</b>	<b>1.028</b>

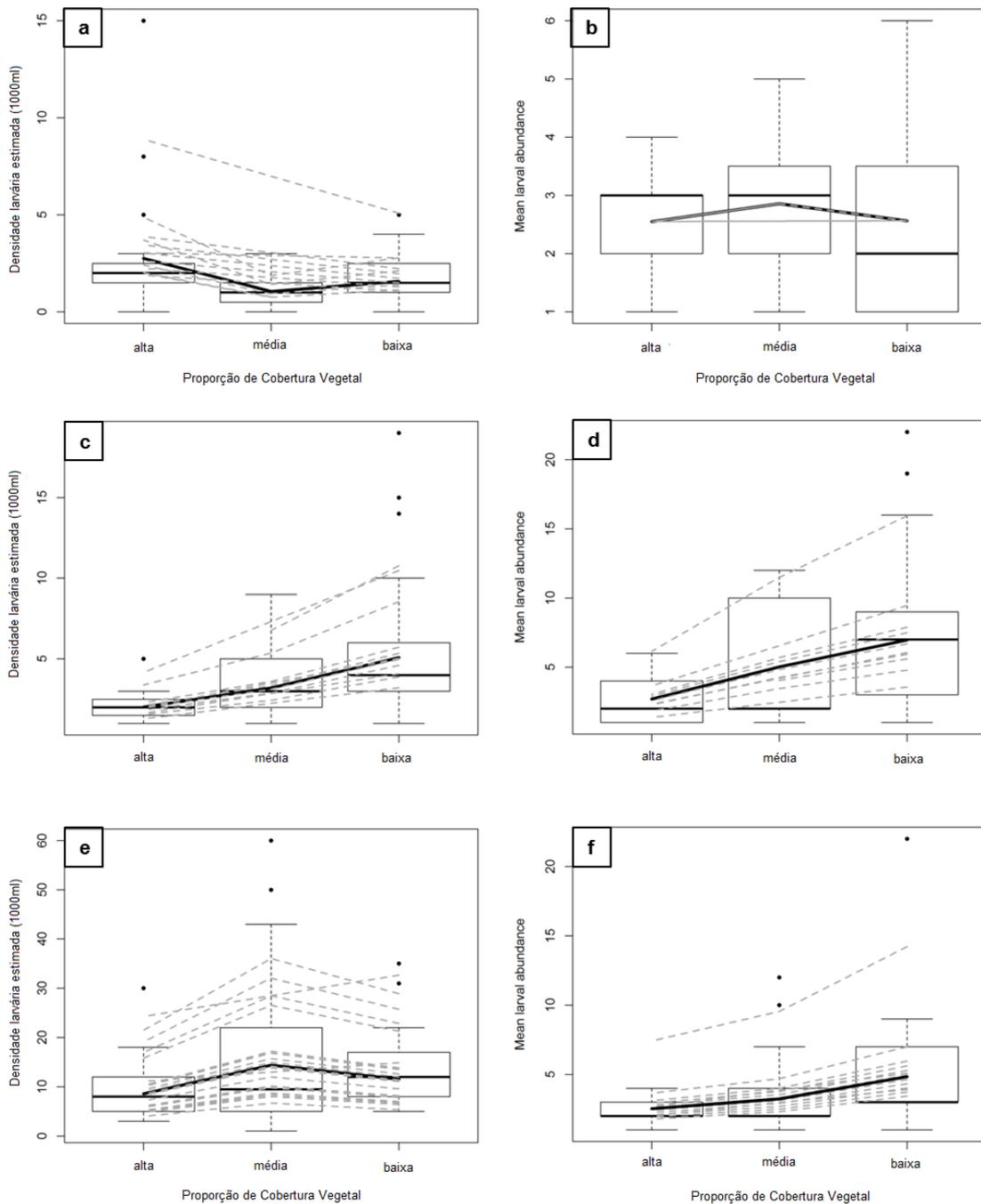
**Tabela 7.** Índice de Similaridade de Sorensen esboçando a similaridade de espécies entre os locais investigados.

<b>Índice de Similaridade de Sorensen</b>		
	Cachoeira	Zona de Transição
Marsilac	0.81818	0.90909
Cachoeira		0.81818

Quanto à espécie *Cx. (Mcx.) imitator*, foi evidente a sua maior abundância em ambientes onde a cobertura vegetal apresenta configuração relativamente preservada, a exemplo da localidade “Cachoeira”, que apresenta 90% de cobertura vegetal. Por outro lado, a ocorrência desta espécie em ambientes com notória atividade humana, mostrou menos frequência, a exemplo do local “Marsilac”, cujo ponto de coleta selecionado possui 60% de cobertura vegetal. Porém, os resultados mostram que ao que tange a densidade larvária por criadouro, não foi observada importante variação entre os locais investigados. Esse achado é exposto na **Tabela 8 e Figuras 7a e 7b**. No entanto, estes apontamentos são diretamente contrariados quando levados em consideração os resultados obtidos para *Cx. (Mcx.) pleuristriatus*. Esta espécie mostrou evidente tendência de maior abundância conforme a proporção de cobertura vegetal tende a diminuir. Do total de 410 larvas, 322 foram encontrados no local “Marsilac”, ambiente com 60% de cobertura vegetal, enquanto o restante foi dividido entre os locais restantes, com o menor número de espécimes (37) tendo sido relatados no local “Cachoeira”, provido de 90% de cobertura vegetal. Ao que se refere a densidade larvária por criadouro, algo similar também pode ser observado. Conforme a cobertura vegetal tende a mostrar diminuição sem sua taxa (60% e 70%), a abundância larvária desta espécie tende a aumentar, sendo evidentemente menos abundante nos locais mais preservados (cobertura vegetal de 90%). Este resultado é observado na **Tabela 8 e Figuras 7c e 7d**. Quando avaliadas todas as espécies de maneira única, é possível de terminar que o subgênero como um todo tende a apresentar maior grau de abundância de larvária conforme a gradiente de cobertura vegetal apresenta diminuição, como mostrado na **Tabela 8 e Figuras 7e e 7f**.

**Tabela 8:** Valores dos parâmetros usados nos Modelos de Efeito Misto para investigar a densidade e abundância larvária do subgênero *Microculex* em relação a variação na proporção de cobertura vegetal. Os valores de P indicam a significância entre os ambientes com “baixa”, “moderada” e “alta” cobertura vegetal. O desvio-padrão estimado é exposto entre parênteses.

Variáveis Resposta	Espécies	Variáveis Exploratórias			Variação entre os gradientes (meses)
		Efeito Fixo			
		Alta cobertura vegetal	Moderada cobertura vegetal	Baixa cobertura vegetal	
Densidade larvária estimada (1000ml)	<i>Cx. (Mcx.) imitator</i>	1.011 (0.197)	-0.957 (0.407) <b>p=0.018</b>	-0.559 (0.229) <b>p=0.015</b>	0.621
	<i>Cx. (Mcx.) pleuristriatus</i>	0.703 (0.246)	0.459 (0.278) <b>p=0.098</b>	0.922 (0.231) <b>p&lt;0.001</b>	0.553
	Total <i>Culex (Microculex)</i>	2.149 (0.119)	0.516 (0.085) <b>p&lt;0.001</b>	0.296 (0.084) <b>p&lt;0.001</b>	0.507
Abundância larvária média (1000ml)	<i>Cx. (Mcx.) imitator</i>	0.936 (0.140)	0.113 (0.263) <b>p=0.665</b>	0.004 (0.209) <b>p=0.981</b>	0
	<i>Cx. (Mcx.) pleuristriatus</i>	0.988 (0.227)	0.624 (0.237) <b>p=0.008</b>	0.952 (0.205) <b>p&lt;0.001</b>	0.586
	Total <i>Culex (Microculex)</i>	0.926 (0.154)	0.251 (0.167) <b>p=0.134</b>	0.650 (0.151) <b>p&lt;0.001</b>	0.473



**Figure 7:** Gráfico expando a variação no índice de densidade larvária (a, c, e) como também a abundância larvária (b,d, f) das espécies do subgênero *Microculex* em relação a proporção de cobertura vegetal. As linhas escuras representam a média prevista; linhas acidentadas representam a variação esperada, em relação aos meses do ano. Predições referentes a *Cx. (Mcx.) imitator* são mostradas em a e b; predições para *Cx. (Mcx.) pleuristriatus* são exibidas em c e d; predições que envolvem todo o subgênero são expostas em e e f.

### 4.3 Taxonomia das genitálias masculinas.

Ao longo de **25 coletas de campo**, sendo 21 realizadas na região da APA Capivari-Monos; uma em Ubatuba; uma em Santo Aleixo, Magé/RJ; Duas no Distrito de Guarujá/SP. A data referente a cada um dos eventos de coleta é relacionado na **Tabela 9**. A seleção dos locais de investigação de campo obedeceu a premissa de presença de vegetais Bromeliacea, histórico de ocorrência de espécies de *Microculex* e própria investigação acerca da presença destes culicídeos nas localidades pouco investigadas de Mata Atlântica.

**Tabela 9:** Identificação, período, local e município de realização das coletas de campo.

<b>Identificação das amostras</b>	<b>Período</b>	<b>Local</b>	<b>Município</b>
SP-J/APA	jul/17	Sítio Eucaliptus	São Paulo
SP-VL/APA	nov/17	Condomínio Vale das Fontes	São Paulo
SP-PR	dez/17	Estrada Pedro Rocha	São Paulo
SP-BG	jan/18	Estrada da Barragem	São Paulo
SP-CANT 1	set/18	Trilha do Pinheirinho	São Paulo
SP-CANT 1	out/18	Trilha do Pinheirinho	São Paulo
SP-UBA	nov/18	Praia da Fazenda	Ubatuba
SP-VL/APA	nov/18	Condomínio Vale das Fontes	Embu-Guaçu
SP-PR	fev/19	Estrada Pedro Rocha	São Paulo
SP-EC	abr/19	Estrada da Colônia	São Paulo
SP-EC	set/19	Estrada da Colônia	São Paulo
SP-CP	set/19	Condomínio Pernambuco 2	Guarujá
SP-VL/APA	out/19	Condomínio Vale das Fontes	Embu-Guaçu
RJ-STA	out/19	Sítio Pau Oco	Magé/RJ
SP-VL/APA	out/20	Condomínio Pernambuco 2	Guarujá
SP-CHE	out/20	Estrada da cachoeira	São Paulo
SP-MRC	nov/20	Estrada do Marsilac	São Paulo
SP-CAC	dez/20	Cachoeira das Antas	São Paulo
SP-CSH	jan/21	Condomínio Santo humbertus	São Paulo
SP-PDR	jan/21	Estrada Pedrinho Roschel	São Paulo
SP-SC	jan/21	Sítio Caetano	São Paulo
SP-EJ	fev/21	Estrada Jaceguava	São Paulo
SP-CH	fev/21	Estrada do Chinês	São Paulo
SP-SM	fev/21	Sítio Miralva	São Paulo
SP-STs	mar/21	Sítio Silcol	São Paulo

As contínuas incursões em determinadas localidades foram motivadas primariamente pelo fácil acesso aos pontos de coletas localizados no interior da APA Capivari-Monos e por esta, no momento de crise sanitária que perdurou até os momentos de concepção do presente documento, ser o local que apresentava as condições mínimas de segurança para a realização dos procedimentos de campo. No mais, as localidades situadas fora dos domínios da APA foram visitadas antes da instauração dos protocolos de segurança que visavam conter os avanços da Covid-19. Exceção ao procedimento de coleta realizado no distrito de Guarujá em. No que concerne a espécies cuja distribuição reside fora os domínios de Mata Atlântica, material referente a outros procedimentos de coleta foram cedidos por pesquisadores.

#### **4.4 Estudo morfológico**

Apesar da reconhecida validade do estudo morfológico tendo como referência a consulta ao material tipo, no presente estudo, esse procedimento, em razão das medidas de restrição sanitárias, não pode ser executado. No entanto, o estudo comparativo foi realizado por meio das descrições originais das espécies em questão. Desta forma, foi possível consolidar a presença de **20** espécies no estudo, sendo destas, **15** de espécies válidas, das quais todas tiveram suas genitálias redescritas. De acordo com os exemplares investigados, foi possível inquirir a respeito de 5 espécies não-descritas. Porém ainda que com a evidência por parte das estruturas que concernem à genitália masculina, para tal determinação de cunho taxonômico, se faz imprescindível a investigação acerca da exúvia da larva, pupa e indivíduo adulto (macho e fêmea). Por este ser um panorama que se estende além dos objetivos do documento, este, se vale por apresentar nova e revisada chave dicotômica para identificação dos exemplares machos.

#### **4.5 Redescrição das genitálias masculinas das espécies do Subgênero *Microculex*.**

O detalhado estudo das características das estruturas das genitálias masculinas possibilitou a investigação e estudo comparativo de variações mencionadas em estudos anteriores, porém, da mesma forma, objetivou-se a sumarização de variações pouco, ou mesmo não investigadas por estudos de referência. As características utilizadas como diagnósticos das espécies foram: presença e aspecto do lobo subapical do gonocoxito (Gc); aspecto do processo colunar do gonocoxito; formato e aspecto do IX-Tergito (IX-TL); formato e aspecto do gonóstilo (Gs); formato e aspecto da garra do gonóstilo (GC);

formato e aspecto do Proctiger (Placa Basal e X-Tergito); formato e aspecto do Falósoma (Placa Lateral e Esclerito do Edeago).

Importante esclarecer que embora o estudo comparativo das larvas e pupas não são objeto final deste documento, quando possível, suas estruturas foram utilizadas para a determinação de espécies, tornando assim, o diagnóstico correto das genitálias assegurado.

A seguir são mostradas as redescrições das genitálias de 22 espécies *Microculex*. Estruturas cujo valor taxonômico possua maior relevância, sua apresentação exigiu o uso de maior aumento, a fim de tornar sua visualização menos problemática por parte do leitor.

### ***Culex (Microculex) imitator* Theobald, 1903**

*Culex imitator* Theobald, 1903a:175 (♂). Localidade tipo: São Paulo, Brazil.

(Tipo depositado no NHM); Kumm, 1933:564 (♂, ♀, Le); Senevet & Abonnenc 1939a: 115 (Le); Rozeboom & Komp, 1950b: 155 (♂G); Belkin et al, 1971: 26 (tipos-localização geográfica, info, taxonomia); Rossi & Martinez, 2003: 472 (Uruguay)

#### **Sinônimos:**

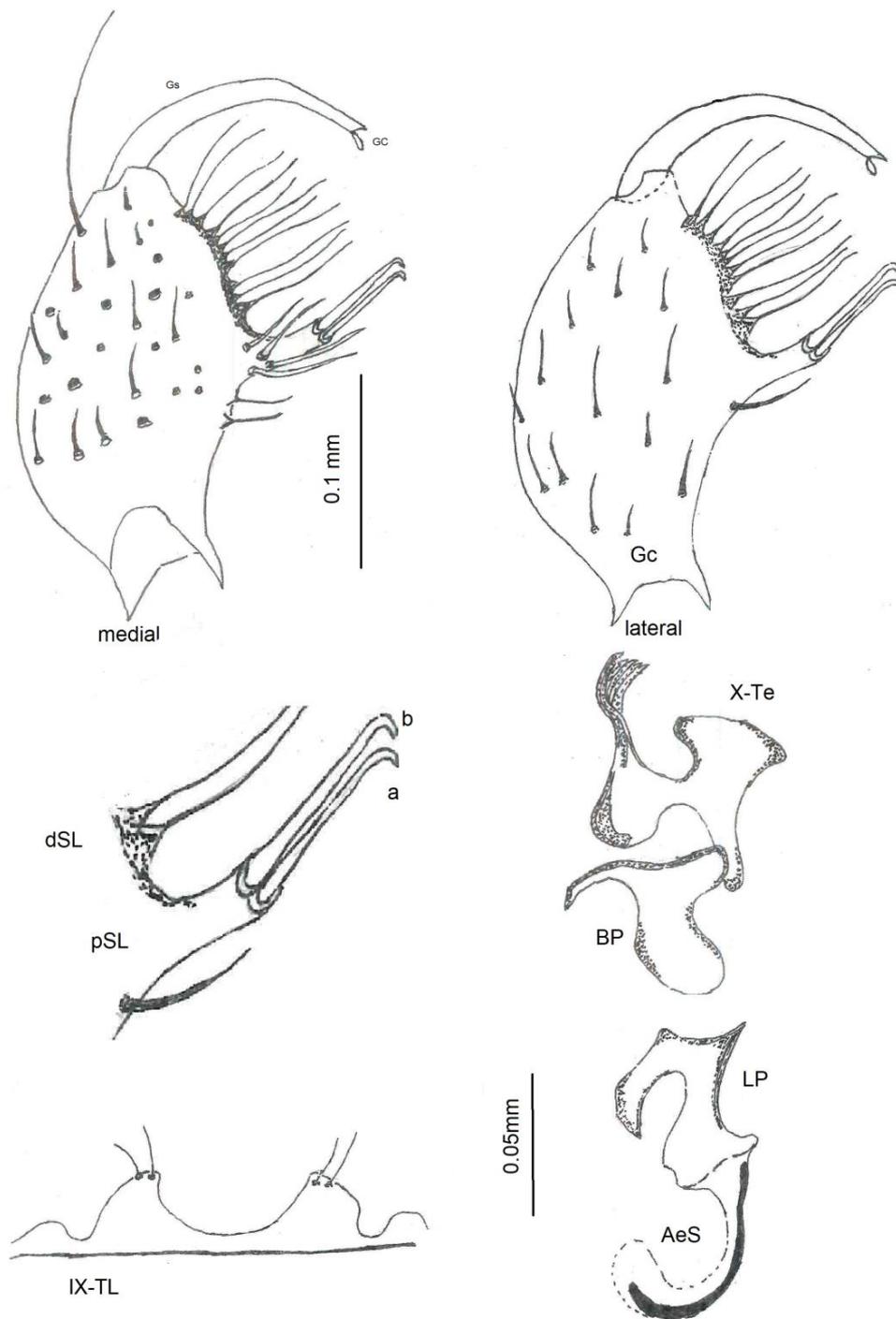
*Culex (Microculex) argenteoumbrosus* Theobald, 1907:461 (♂,♀). Localidade-Tipo: Rio de Janeiro, Guanabara, Brasil (NHM)

*Culex daumasturus* Dyar & Knab, 1906: 220(Le).Localidade-Tipo: La Brea. Trinidad. (USNM)

*Culex vector* Dyar & Knab Dyar & Knab, 1906: 220 (Le). Localidade-Tipo (USNM)

**Genitália Masculina: (Figura 8) Tergito-IX:** Lobos de aspecto semicircular, com margem interna acentuadamente ovalada. Margem externa também ovalada. Na região apical situam-se de 2 a 4 cerdas simples e retas. Notável presença de protuberância externa aos lobos, com cerca de ¼ do tamanho destes, desprovidos de cerdas. Região medial e basal glabras. Distância entre os lobos é equivalente a largura basal destes. Gonocoxitos: formato oblongo. Divisão distal do lobo subapical com evidente conjunto de cerdas simples, longas e retas que percorrem o lobo subapical chegando até a base do

processo colunar, no entanto, sem atravessar sua base. Processo Colunar: 2 fortes localizadas no ápice (cerdas *a* e *b*) sendo *a* implantada inferiormente à *b*. Ambas sem sinuosidades e apresentam curvatura no ápice. Gonóstilo: afilado, razoavelmente curvo em seu terço final. Garra do gonóstilo em formato de folha, localizada no ápice da superfície ventral. Falósoma: placa lateral e esclerito do edeago com altura e largura equivalentes. Processo ventral na placa lateral fortemente desenvolvido e esclerotizado, apresenta notável formação pontiaguda com na porção ventral. Esclerito do edeago em forma de gancho quando em vista lateral. Apresenta na porção distal pouca esclerotização. Proctiger: Paraprocto curto, com pequena porção medial afilada; base dilatada. X-Tergito aparenta fusão ao paraprocto. Aspecto ovalado no ápice e evidente afunilamento na direção basal. Coroa do paraprocto com 4 a 6 dentes levemente curvos. Placa basal de ápice largo. Região medial mais estreita.



**Figura 8:** Genitália masculina de *Culex (Microculex) imitator*. Gc - gonocoxito, Gs - gonóstilo, dSL - divisão distal do lobo subapical, pSL - divisão proximal do lobo subapical. GC - garra do gonóstilo. Lateral - vista lateral, Medial - vista medial. X-TL - lobos IX tergito. Falósoma: AeS - esclerito do edeago, LP - placa lateral. Proctíger: BP - placa basal. X-Te - X tergito.

**Material examinado:** 37 Lâminas. 37G♂. SP-VL/APA15; SP-VL/APA17; RJ-STA49; SP-EC108; SP-EC92; SP-PR74; SP-PR76; SP-PR48; SP-PR52; SP-PR61; SP-PR38; SP-VL/APA33; SP-PR19; SP-CANT7; SP-J/APA1; SP-PR69; SP-CP115; SP-CAC32; SP-CP136; SP-CP30; SP-CP131; RJ-STA194; SP-PR67; SP-J/APA129; SP-EC103; SP-PR64; SP-PR68; SP-CANT25; SP-J/APA12; SP-SC34; RJ-STA139; SP-PR78; SP-CANT33; FSP-E8684; FSP-CJ03-106; FSP-SPC1(2)-3.

**Distribuição:** De acordo com a literatura, a ocorrência de *Cx. imitator* concerne á Argentina, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana, México, Trinidad e Venezuela.

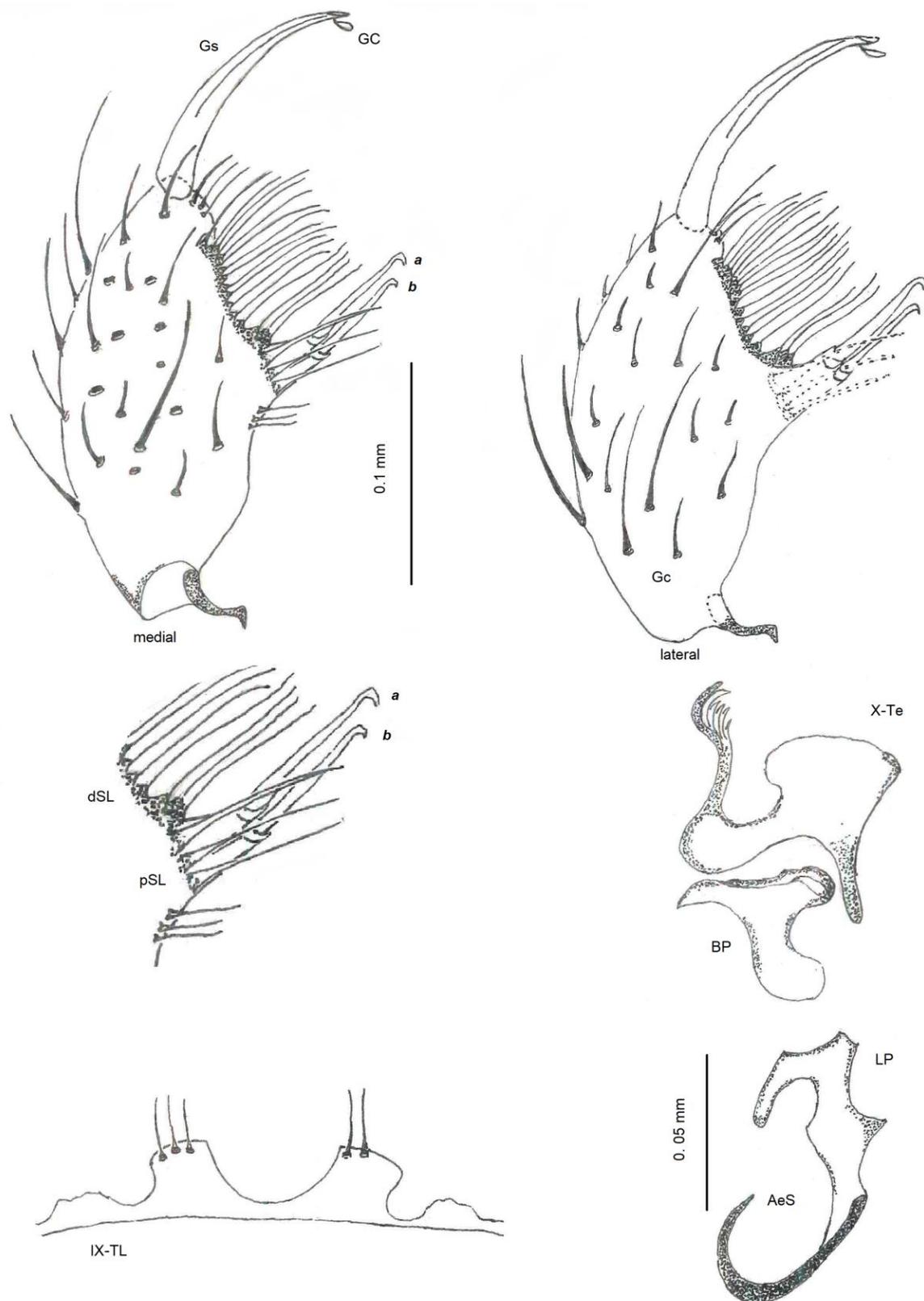
**Diagnose:** Conjunto de cerdas retas e finas em toda extensão do lobo subpical, chegando à base do processo colunar. Placa lateral com pronunciado processo ventral. Este com porção em forma de seta, pouco recurvado para o ângulo interno. Esclerito do edeago, pouco esclerotizado em sua porção distal.

### ***Culex (Microculex) imitator retrosus* Lane & Whitman, 1951**

*Culex (Microculex) imitator retrosus* Lane & Whitman, 1951: 356 (♂, ♀, Pe, Le).  
Localidade-Tipo: Rio de Janeiro, Guanabara, Brasil (INER) “Museu Nacional”  
Belkin, Schick & Heinemann, 1971:26 (Distribuição geográfica. Info); Xavier, 1973 (Info.)

**Genitália Masculina: (Figura 9) IX- Tergito:** Aspecto dos lobos e distância entre eles como em *Cx. imitator*, porém, apresenta variações que podem ir deste padrão até conformação semelhante a “platô”. Região apicular com 3 -5 cerdas finas. Espaço entre os lobos em forma de vale, equivalente a mesma largura basal destes. Gonocoxito: Guarda estreita semelhança com *Cx. imitator*. Formato oblongo. Divisão distal do lobo subapical apresenta conjunto contínuo de cerdas de dimensões semelhantes. Estas recobrem em absoluto a porção ventromesal, percorrendo inclusive a base do processo colunar, localizado na divisão proximal. Processo colunar: Evidente com 2 cerdas desenvolvidas localizadas na região apical (Cerdas *a* e *b*), sendo *a* implantada mais basal em relação à *b*. Ambas delgadas, retas, com curvatura na região terminal.

Gonóstilo: Estreito, alongado e pouco curvo. Região apical afunilada. Garra do gonóstilo em forma de folha, localizada na região apical da superfície ventral. Falósoma: Placa lateral e esclerito do edeago com comprimentos equivalentes. Processo ventral da placa lateral com evidente formato de garra, fortemente esclerotizado. Processo lateral pontiagudo. Esclerito do edeago em forma de gancho quando em vista lateral. Ângulo de curvatura torna-se abrupto e volta-se para dentro a partir do 1/3 terminal. Proctiger: Paraprocto estreito com base dilatada. Coroa do paraprocto com 8 dentes pontiagudos e curvos. X-Tergito aparentemente fusionado ao paraprocto, semelhante conformação indicada para *Cx. imitator*. Placa basal apresenta inequívoca similitude ao documentado para *Cx. imitator*.



**Figura 9:** Genitália masculina de *Culex (Microculex) imitator retrosus* Gc - gonocoxito, Gs - gonóstilo, dSL - divisão distal do lobo subapical, pSL - divisão proximal do lobo subapical. GC - garra do gonóstilo. Lateral - vista lateral, Medial - vista medial. X-TL - lobos IX tergito. Falósoma: AeS- esclerito do edeago, LP - placa lateral. Proctiger: BP - placa basal. X-Te - X tergito.

**Material examinado:** 23 Lâminas. 23G G♂ Número de Lâminas e procedência destas.SP-PR66; SP-PR65; RJ-STA27; RJ-STA135; SP-BG101; SP-PR-110; RJ-STA39; SP-EC89; SP-EC84; SP-PR57; SP-PR72; SP-PR76; SP-MRC28; SP-VL/APA27; SP-PR80; SP-PR77; SP-EC118;SP-PR81; SP-CANT41; SP-EC117; SP-PR54; SP-J/5; SP-PR46.

**Distribuição.** De acordo com a literatura, a presença de *Cx. retrosus* é relativa apenas ao território brasileiro.

**Diagnose:** Presença de conjunto massivo de cerdas em toda porção do lobo subapical, indo desde o ápice deste percorrendo toda a extensão da base do processo colunar. Esclerito do edeago em forma de gancho, desprovido de formações hialinas em sua estrutura. Presença de 3-5 cerdas finas retas no ápice dos lobos do IX-Tergito.

### ***Culex (Microculex) dubitans* Lane & Whitman, 1951**

*Culex (Microculex) dubitans* Lane & Whitman, 1951: 357 (♂G, ♀, Pe, Le).

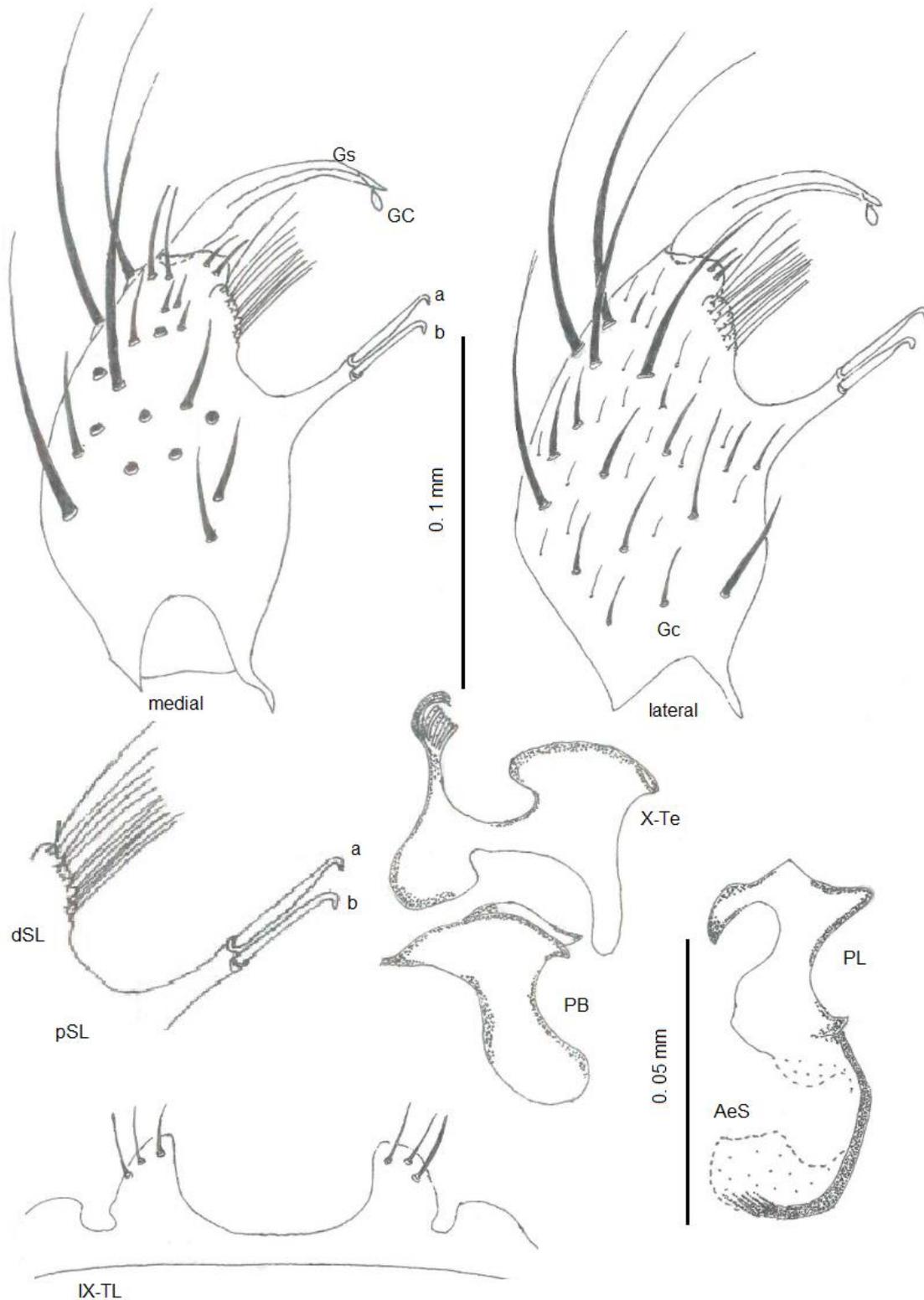
Localidade-Tipo: Guanabara, Rio de Janeiro, Brasil (Tipo depositado no INER)

Belkin, Schick & Heinemann, 1971: Z6 ('Localização do tipo. Info);

Xavier, 1973: 159 (Info. tipo)

**Genitália Masculina: (Figura 10).** IX-Tergito: Lobos de aspecto monticular. Margem externa arredondada, margem interna convexa. Espaço entre os lobos de cerca de 1x a largura basal destes. Região apical dos lobos com de 3–7 cerdas finas e retas. Externamente aos lobos é possível observar formações de aspecto monticular, com cerca de 1/3 do volume dos lobos, desprovidos de cerdas. Gonocoxito: Mostra-se com formato oblongo. Lobo subapical da Divisão distal com evidente conjunto de cerdas finas e retas situadas na porção mais apical. Região basal do lobo subapical glabra. Processo Colunar: Relativamente longo com duas cerdas implantadas no ápice (cerdas *a* e *b*), onde *a* esta situada com implantação abaixo de *b*, sendo *a* de maior comprimento que *b*. Ambas sem sinuosidades. Apresentam curvatura no ápice. Base e extensão do

processo colunar glabro. Falósoma: Placa lateral e esclerito do edeago de comprimento equivalentes. Placa lateral com processo ventral, processo lateral e processo apical. Processo lateral fortemente esclerotizado e evidente formato de seta, com extremidade distal curva. Esclerito do edeago curvo em vista lateral, apresentando forma de gancho. Porção terminal pouco esclerotizada. Proctiger: Paraprocto alongado. Coroa do paraprocto com 9 dentes pouco recurvados. Gonóstilo: Afilado em toda extensão, com ângulo de curvatura harmônica. Garra do gonóstilo curta, em forma de folha, localizada na superfície ventral. X-Tergito: Aparentemente fundido ao paraprocto. Região apical ovalada com notável afunilamento do terço medial em direção à base. Placa Basal: Larga, região medial pouco mais estreita que a região basal.



**Figura 10.** Genitália masculina de *Culex (Microculex) dubitans* Gc - gonocoxito, Gs - gonóstilo, dSL - divisão distal do lobo subapical, pSL - divisão proximal do lobo subapical. GC - garra do gonóstilo. Lateral - vista lateral, Medial - vista medial. X-TL - lobos IX tergito. Falósoma: AeS- esclerito do eedeago, LP - placa lateral. Proctiger: BP - placa basal. X-Te - X tergito.

**Diagnose:** Lobo subapical com evidente conjunto de cerdas finas e retas localizadas na porção apical. Região basal do lobo subapical glabra. IX-Tergito de aspecto monticular, provido de 3-7 cerdas no apice. Esclerito do edeago com pouca esclerotização na porção terminal.

**Material examinado:** 6 Lâminas. 6G G♂. FSP-LESP-7175; SP-107EC; FSP-LESP-0815; FSP-LESP-71; FSP-LESP-7176; SP-VL/APA35.

**Distribuição.** De acordo com a literatura, esta espécie é relativa apenas ao território brasileiro.

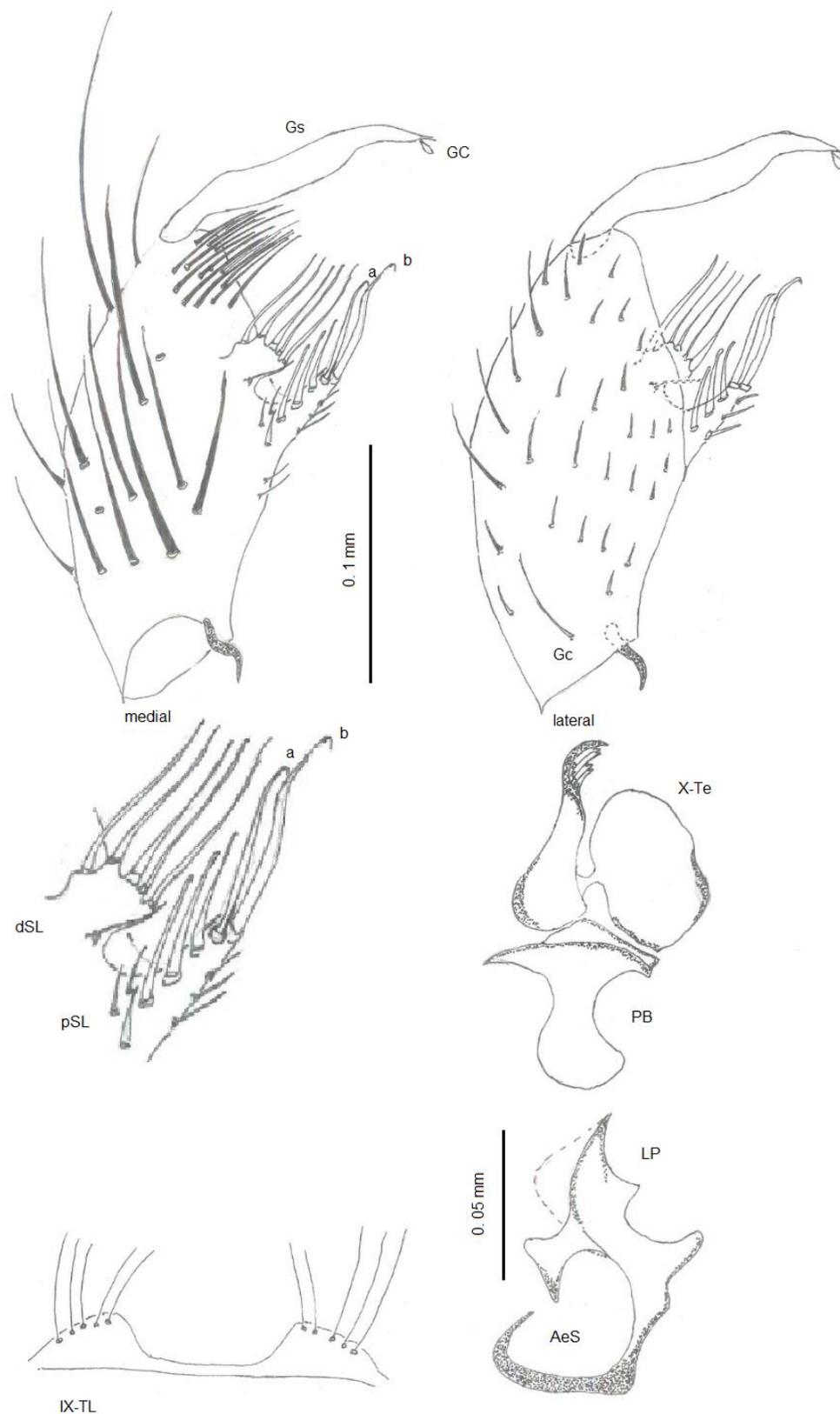
### ***Culex (Microculex) pleuristriatus* Theobald, 1903**

*Culex (Microculex) pleuristriatus* Theobald, 1903a: 177 (♀). Localidade-Tipo: São Paulo, Brasil.

Kumm, 1933: 563 (♂G, ♀, Le); Sevenet & Abonnenc, 1939a (♂, Le); Lane & Whitman, 1951: 347 (Pe; Le); Oliveira et al, 1962: 223 (♂G, Pe, Le); Belkin, 1968:19 (Desig.Lectótipo); Cotrim & Galati, 1977: 171 (♂G, ♀, Pe, Le)

**Genitália Masculina. (Figura 11).** IX-Tergito: Lobos de aspecto monticular, com discreta formação apicular próximo à margem interna. Distância entre os lobos de cerca de 1x a largura basal destes. Cada lobo com 5 cerdas simples e retas, dispostas na região apical. Margem externa levemente arredondada. Gonocoxito: Aspecto oblongo. Presença de conjunto de cerdas longas e afiladas, de tamanhos equivalentes na porção apical. Divisão distal do lobo subapical com 5 cerdas de tamanhos equivalentes, atingindo, no geral, o dobro do tamanho do processo colunar. Presença de 1 cerda implantada na base do lobo subapical; esta, de dimensão notavelmente inferior as demais. Processo Colunar: Presença de duas cerdas (cerdas *a* e *b*) no ápice, sendo *b* menor que *a*. Ambas sem sinuosidades e com curvatura apical. Localizadas na base do processo colunar, estão 4-5 cerdas, sendo 2 de aspecto mais robusto. Gonóstilo: Alongado, estreito, com ângulo de curvatura mais pronunciado na porção distal, região da superfície dorsal com aspecto de “platô”. Região distal rombosa, ocupando cerca de

2/3 da estrutura. Garra do gonóstilo curta, em forma de folha, localizada no ápice da superfície ventral. Falósoma: Placa lateral e esclerito do edeago com tamanhos singulares, sendo a placa lateral com maior comprimento. Placa lateral com processo ventral, processo apical e processo lateral. Processo ventral fortemente desenvolvido e esclerotizado; possui formato semitriangular, com evidente afunilamento na região ventral. Processo lateral de aspecto tuberoso. Esclerito do edeago curvo em vista lateral. Proctiger: Paraprocto alongado, com base mais larga que o ápice. Coroa do paraprocto com 7 dentes simples, levemente curvos. X-Tergito: Aspecto ovóide, de largura equivalente apresentada pela placa basal. Placa basal: região medial mais estreita que as regiões apical e basal.



**Figura 11.** Genitália masculina de *Culex (Microculex) pleuristriatus*. Gc - gonocoxito, Gs - gonóstilo, dSL - divisão distal do lobo subapical, pSL - divisão proximal do lobo subapical. GC - garra do gonóstilo. Lateral - vista lateral, Medial - vista medial. X-TL - lobos IX tergito. Falósoma: AeS- esclerito do edeago, LP - placa lateral. Proctiger: BP - placa basal. X-Te - X tergito.

**Distribuição:** Esta espécie pode ser encontrada na Bolívia, Brasil, Costa Rica, Equador, Guiana Francesa, Granada, Guiana, Suriname, Venezuela e Trinidad e Tobago.

**Material examinado:** 27 Lâminas. 24G G♂ 24 SP-CP140; SP-EC151; SP-EC154; RJ-STA174; RJ-STA187; SP-VL/APA25; SP-J/APA11; SP-UBA2; RJ-STA26; SP-UBA4; RJ-STA178; SP-J/APA13; SP-J/APA31; SP-PR50; SP-SM206; SP-STS205; SP-STS208; SP-STS210; RJ-STA1; RJ-STA19; SP-CH199; RJ-STA23; RJ-STA192; RJ-STA7; FSP-E5674; FSP-E5678; FSP-11934.

**Diagnose:** Lobos do IX-tergito com aspecto monticular, com discreta formação apicular. Divisão distal do lobo subapical do gonocoxito com 5 cerdas de tamanho igual tamanho. Gonóstilo com região em “platô” na superfície dorsal. Esclerito do edeago curvo em vista lateral.

### ***Culex (Microculex) albipes* Lutz, 1904**

*Culex (Microculex) albipes*, Lutz 1904. In Bourroul, 1904:6 (♀).

Localidade-Tipo: Itaparica, Bahia, Brasil (Tipo depositado em NE (?))

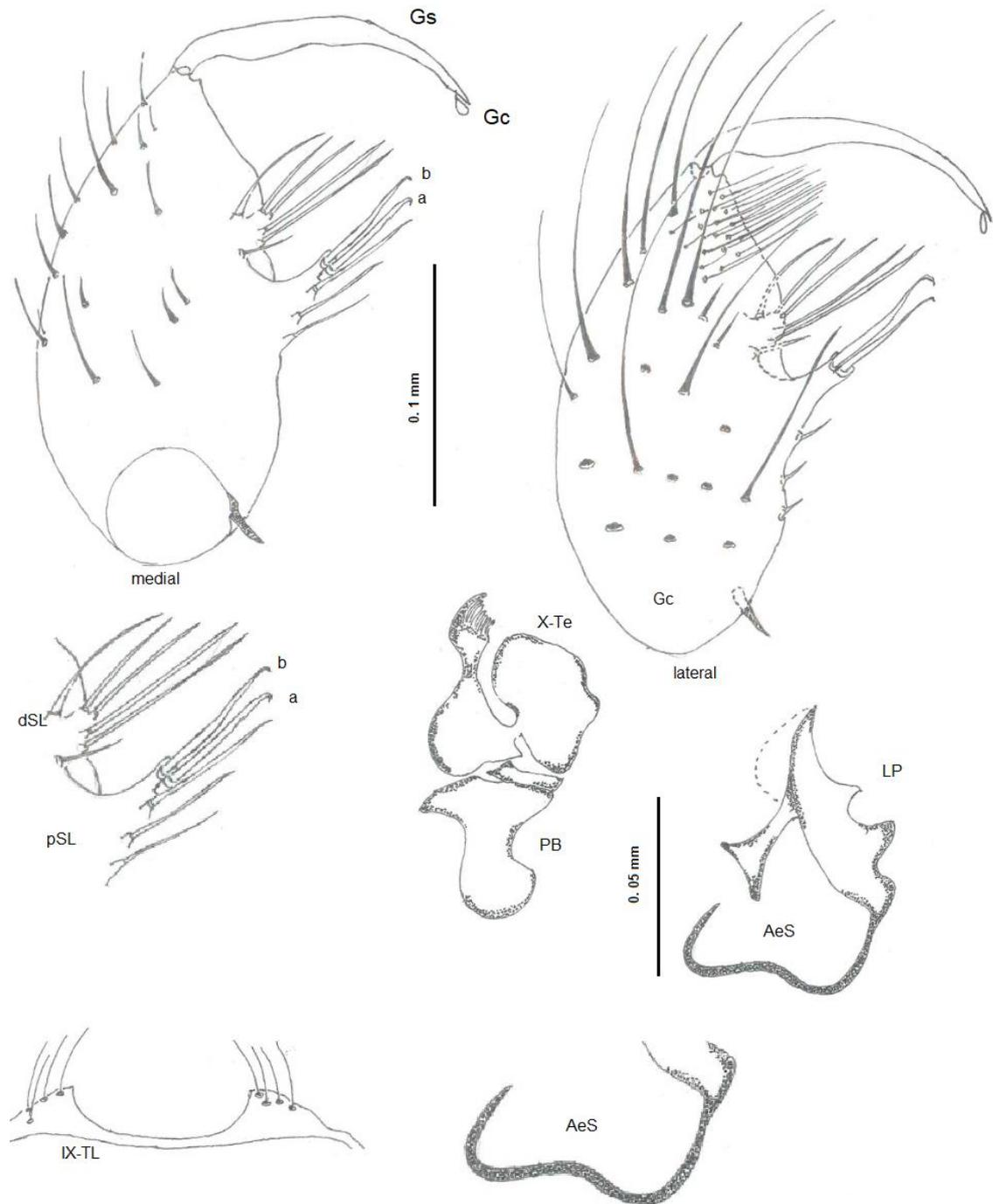
Kumm, 1933: 568 (♂G, ♀, Le); Rozeboom & Komp 1950b: 156 (♂G,

Taxonomia): Belkin, Schick & Heinemann, 1971:25 (Tipo. Info); Cotrim

& Galati, 1977:177 (♂G; Le)

**Genitalia Masculina. (Figura 12).** IX-Tergito: Lobos de aspecto monticular, com discreta formação apicular próximo à margem interna, como em *Cx. pleuristriatus*. Distância entre os lobos de cerca de 1x a largura basal destes. Cada lobo com 5 cerdas simples e retas, dispostas na região apical. Margens externas levemente arredondadas. Gonocoxito: Guarda profunda similaridade com *Cx.pleuristriatus*. Aspecto oblongo. Presença de conjunto de cerdas longas e afiladas, de tamanhos equivalentes na porção latero-apical. Lobo subapical com 5 cerdas de tamanhos equivalentes, atingindo, no geral, o dobro do tamanho do processo colunar. Presença de 1 cerda implantada na base do lobo subapical; esta, de dimensão notavelmente inferior as demais. Processo Colunar: *Como em Cx. pleuristriatus*. Presença de duas cerdas (cerdas *a* e *b*) no ápice,

sendo  $b$  menor que  $a$ . Ambas sem sinuosidades e com curvatura apical. Localizadas na base do processo colunar, estão 4-5 cerdas, sendo 2 de aspecto mais robusto. Gonóstilo: Alongado, estreito, com ângulo de curvatura mais pronunciado na porção distal, sem regiões com aspecto de platô ao longo de sua superfície dorsal. Região distal rombosa, ocupando cerca de  $2/3$  da estrutura. Garra do gonóstilo curta, no ápice da superfície ventral. Falósoma: similar à *Cx. pleuristriatus*. Placa lateral e esclerito do edeago com tamanhos singulares, sendo a placa lateral com maior comprimento. Placa lateral com processo ventral, processo apical e processo lateral. Processo ventral fortemente desenvolvido e esclerotizado; possui formato semitriangular, com evidente afunilamento na região ventral. Processo lateral de aspecto tuberoso. Esclerito do edeago curvo em vista lateral. Guarda grande similitude com *Cx. pleuristriatus*. Apresenta discreta sinuosidade na região basal, conferindo-lhe ângulo côncavo na superfície ventral e convexa na superfície dorsal. Proctiger: Paraprocto alongado, com base mais larga que o ápice. Coroa do paraprocto com 7 dentes simples, levemente curvos. X-Tergito: Aspecto ovóide, de largura equivalente apresentada pela placa basal. Placa basal: região medial mais estreita que a região apical e basal.



**Figura 12:** Genitália masculina de *Culex (Microculex) albipes*. Gc - gonocoxito, Gs – gonóstilo, dSL – divisão distal do lobo subapical, pSL – divisão proximal do lobo subapical. GC – garra do gonóstilo. Lateral – vista lateral, Medial – vista medial. X-TL – lobos IX tergito. Falósoma: AeS- esclerito do edeago, LP – placa lateral. Proctiger: BP – placa basal. X-Te – X tergito.

**Distribuição.** De acordo com a literatura, esta espécie é relativa apenas ao território brasileiro

**Material examinado:** 14 Lâminas. 14 G♂. SP-VL/APA19; SP-PR62; SP-EC105; SP-CP152; SP-UBA5; SP-CH203; SP-VL/APA14; SP-SM200; SP-STS207; RJ-STA22; RJ-STA14; SP-BG30; RJ-STA16; SP-SM197.

**Diagnose:** Lobo subapical com 5 cercas finas de tamanho equivalentes; Gonóstilo sem região com aspecto de “platô” ao longo da superfície dorsal; esclerito do edeago com região basal do esclerito do edeago com sinuosidade convexa na superfície ventral e côncava na superfície dorsal.

### ***Culex (Microculex) lanei* Coutinho & Forattini, 1962**

*Culex (Microculex) lanei*, 1962: 210(♂G, ♀, Pe, Le). Localidade-Tipo: Bertioga

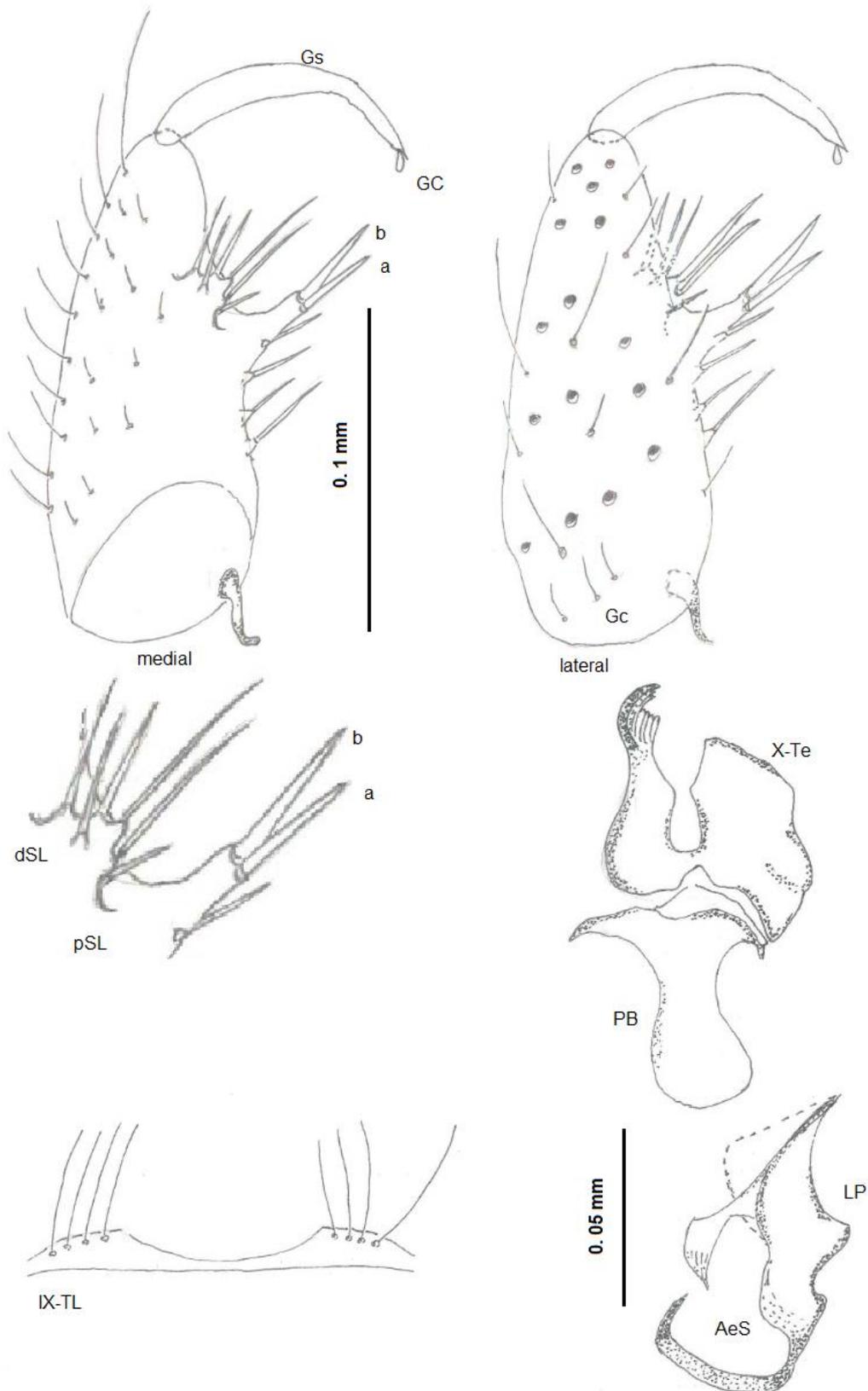
(Itaguapé), Santos, São Paulo, Brazil. (Material-Tipo depositado em FH)

Belkin, Schick & Heinemann, 1971: 26 (Localização do Tipo. Info)

Cotrim & Galatti, 1977: 192 (♂G, ♀, Pe, Le)

**Genitalia Masculina. (Figura 13).** IX-Tergito: Lobos de perfil pouco desenvolvidos; largura superior à altura. Número de cerdas em cada lobo pode variar de 4 a 12. Estas são simples e finas, de comprimento 3x superior à altura do lobo. Espaço entre os lobos em formato de vale; equivalente a 1,5x a largura basal destes. Gonocoxito: Oblongo, alongado, com claro afunilamento em direção ao ápice, onde existem 4 cerdas hialinas de pequenas dimensões. Divisão distal do lobo subapical aprenseta 5 cerdas simples, onde 2 diferenciam-se por serem claramente mais delgadas e de maior comprimento. Processo colunar avantajado, onde, na região apical há duas cerdas desenvolvidas (Cerdeira *a* e *b*), sem curvatura terminal. Cerdeira *a* implantada ao mesmo nível de *b*; sendo também de comprimento inferior. Base do processo colunar glabro na margem interna; apresenta na margem externa duas cerdas finas e retas; uma destas, na porção medial. Gonóstilo: Longo e estreito. Ângulo de curvatura harmônico nas superfícies ventral e dorsal, sem apresentar protuberâncias ou concavidades. Garra do gonóstilo em forma de folha, localizada no ápice da superfície ventral. Falósoma: Placa lateral e esclerito do edeago com comprimentos em vista lateral nitidamente singular. Placa lateral com

processo ventral, processo apical e lateral. Processo ventral desenvolvido e esclerotizado em forma de seta, pontiagudo ventralmente. Processo apical pontiagudo. Processo lateral em formação calosa. Esclerito do edeago curvo em vista lateral, esclerotizado. Ângulo de curvatura abrupto na porção terminal. Proctiger: Paraprocto delgado; região medial e basal sem discrepâncias acentuadas no que tange a largura. Leve concavidade na margem externa próxima ao ápice. Coroa do paraprocto com 7 dentes simples e pouco curvos. X-Tergito com contornos irregulares, porém, com tendência ovóide. Placa basal larga; região medial pouco mais estreita que a região basal.



**Figura 13.** Genitália masculina *Culex (Microculex) lanei*. Gc - gonocoxito, Gs – gonóstilo, dSL – divisão distal do lobo subapical, pSL – divisão proximal do lobo subapical. GC – garra do gonóstilo. Lateral – vista lateral, Medial – vista medial. X-TL – lobos IX tergito. Falósoma: AeS- esclerito do eedeago, LP – placa lateral. Proctiger: BP – placa basal. X-Te – X tergito.

**Distribuição:** Espécie relacionada ao território brasileiro.

**Material examinado:** 10 Lâminas. 9 G♂. SP-BG47; SP-UBA3; RJ-STA6; RJ-STA196; SP-PR202; FSP-LESP1444; RJ-STA177; RJ-STA51; RJ-STA53; FSP-E11933

**Diagnose:** Lobo subapical do gonocoxito com 5 cerdas finas e retas, sendo duas delas de comprimento superior as demais. Gonóstilo estreito, longo e curvo. Desprovido de protuberâncias e concavidades nas superfícies ventral e dorsal. Processo colunar tendo em seu ápice duas cerdas bem desenvolvidas, implantadas no mesmo nível. Ambas desprovidas de curvatura na porção apical. Eclerito do edeago em formato de gancho, com evidente ângulo abrupto na porção terminal.

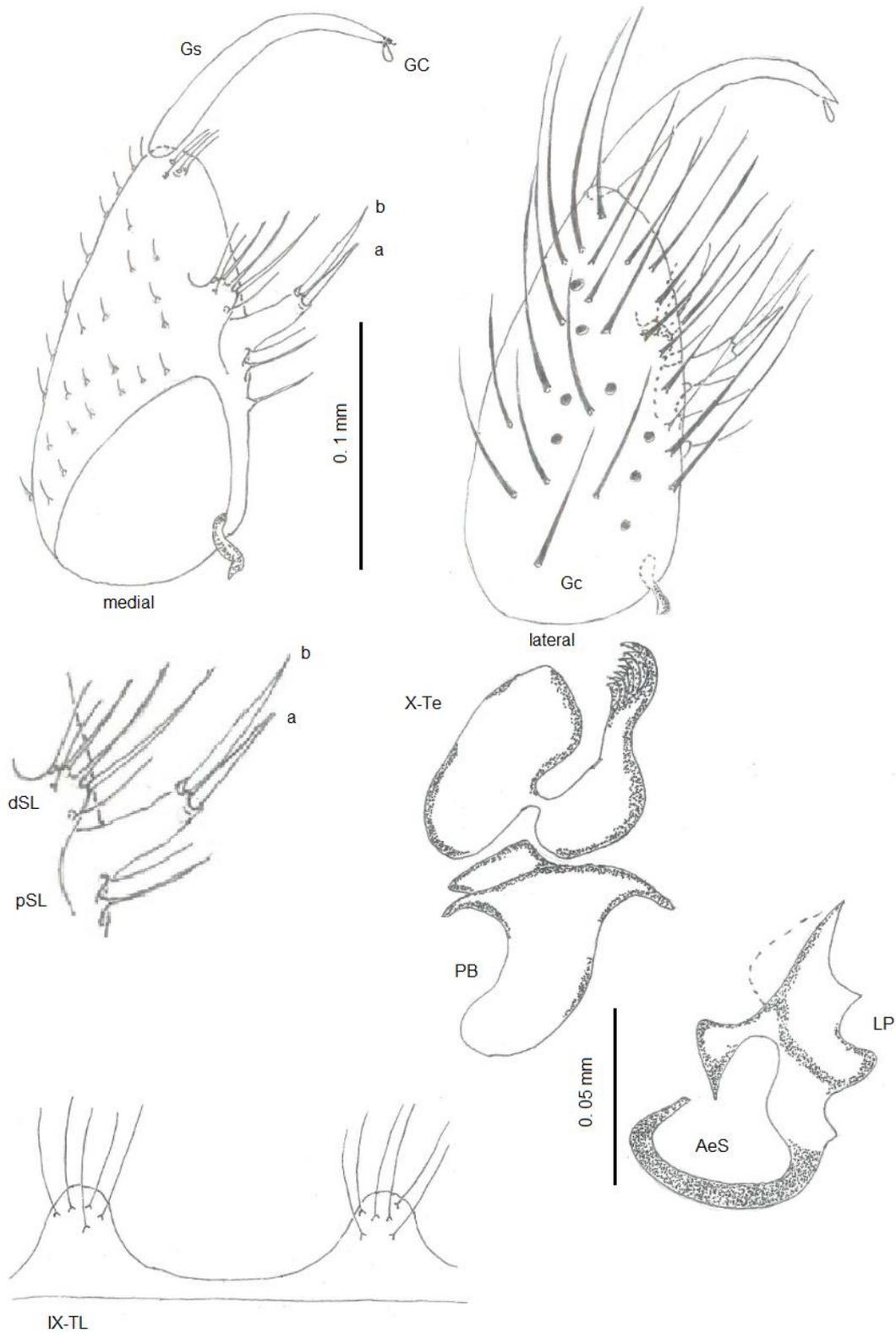
### ***Culex (Microculex) aureus* Lane & Whitman, 1951**

*Culex (Microculex) aureus*, 1959: 349 (♂G, ♀, Pe, Le). Localidade-Tipo: Guanabara, Rio de Janeiro, Brasil (Material-Tipo depositado no INER).

Belkin, Schick & Heinemann, 1971: 25 (Localização do Tipo. Info); Xavier, 1973: 159 (Info.); Cotrim & Galati, 1977: 177 (♂G, ♀, Pe, Le). Oliveira-Christe et al, 2019 (Info.)

**Genitalia Masculina: (Figura 14).** IX- Tergito: Lobos de aspecto monticular. Distância entre os lobos de cerdade 1x a largura basal destes. Número de cerdas podendo variar de 3-8, todas de conformação simples. Gonocoxito: Oblongo. Quando comparado com *Cx. pleuristriatus*, *Cx. albipes* e *Cx. lanei*, é claramente menos romboso. Lóbulo subapical menos pronunciado que em *Cx. pleuristriatus*, *Cx. albipes* e *Cx. lanei*. Presença de 5 cerdas no lóbulo subapical, sendo duas destas com maior comprimento que as demais. Localizada de maneira basal ao lóbulo subapical, existe uma cerda de tamanho reduzido. Processo Colunar: Apresenta duas cerdas desenvolvidas no ápice (cerdas *a* e *b*). Base do processo colunar com 3-4 finas e retas, sendo uma delas na porção medial. Gonóstilo: Afilado. Ângulo de curvatura suave em

toda sua extensão. Ausência de dilatação na superfície ventral da porção distal. Garra do gonóstilo se apresenta de forma curta na superfície ventral. Falósoma: Placa lateral mostra comprimento maior que o apresentado pelo esclerito do edeago. Placa lateral com processo ventral, processo apical e processo lateral. Processo ventral fortemente esclerotizado, de aspecto triangular com porção distal pronunciadamente pontiaguda. Processo lateral de aspecto monticular. Esclerito o edeago lateralmente curvo, fortemente esclerotizado, com dois ângulos de curvatura menos agudos quando comparados a *Cx. pleuristriatus*, *Cx. albipes* e *Cx. lanei*. Proctiger: Alongado. Região basal mostra-se rombosa em comparação com a região apical. X-Tergito de aparência ovóide. Placa basal com região medial notoriamente mais estreita em relação às porções apical e distal. Coroa do paraprocto apresenta de 6-8 dentes.



**Figura 14:** Genitália masculina de *Culex (Microculex) aureus*. Gc - gonocoxito, Gs – gonóstilo, dSL – divisão distal do lobo subapical, pSL – divisão proximal do lobo subapical. GC – garra do gonóstilo. Lateral – vista lateral, Medial – vista medial. X-TL – lobos IX tergito. Falósoma: AeS- esclerito do edeago, LP – placa lateral. Proctiger: BP – placa basal. X-Te – X tergito.

**Distribuição:** Os relatos presentes na literatura apontam que *Cx. aureus* seja uma espécie endêmica á fauna brasileira.

**Material examinado:** 7 Lâminas. 4♂G. SP-EC112; SP-SM204; FSP-LESP2; FSP-LESP224; FSP-E5680; FSP-E5681; FSP-E5679

**Diagnose:** Lóbulo subapical com 5 cerdas, sendo duas delas mais compridas que as demais. Processo colunar dotado com 3-4 cerdas finas, inequivodamente de aspecto mais discreto que aquelas implantadas no ápice do processo colunar (cerdas *a* e *b*). Esclerito do edeago de aspecto similar a um gancho, desprovido de ângulos de curvatura abruptos.

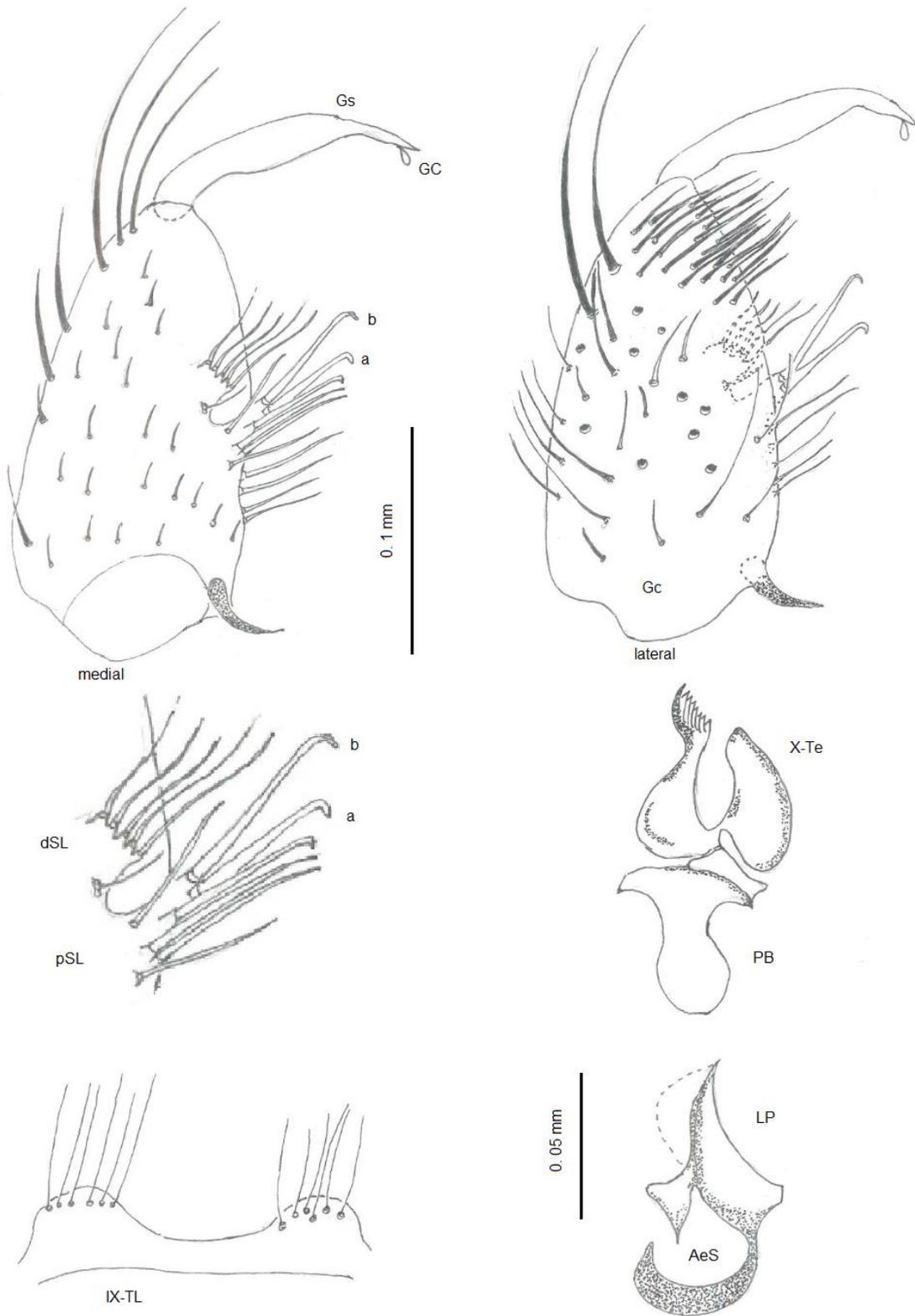
### ***Culex (Microculex) intermedius* Lane & Whitman, 1951**

*Culex (Microculex) intermedius*, 1951: 348 (♂G, ♀, Pe, Le). Localidade- Tipo: Guanabara, Rio de Janeiro, Brasil (INER)

Belkin, Schick & Heinemann, 1971: 26 (Localização do Tipo; Info.); Xavier, 1973: 159 (Info.); Cotrim & Galati, 1977: 188 (♂G, ♀, Pe, Le)

**Genitália Masculina. (Figura 15).** IX-Tergito: Lobos com forma monticular; apice arredondado; largura maior que a altura. Região apical com 6 cerdas finas de comprimento semelhante, equivalente a 2x a altura do lobo; retas. Espaço entre os lobos visivelmente côncavo, equivalente a largura do lobo. Gonocoxito: Oblongo. Divisão distal do lobo subapicaa possui 5 cerdas na região apical, onde 2 tem maior comprimento que as demais, que apresentam dimensões semelhantes. Estas cerdas revelam discretas sinuosidades. Porção basal do lobo subapical com 1 cerda menor, fina. Divisão proximal com processo colunar mediano. Ápice do processo colunar com 2 cerdas desenvolvidas (cerda *a* e *b*). Cerda *a* é implantada inferiormente em relação à *b*, que por sua vez, menor que *a*. Ambas são retas e possuem curvatura na região apical. Base do processo colunar com 4–5 cerdas, ambas desenvolvidas, semelhantes em comprimento e espessura. Região ventromesal com 4 cerdas similares às presentes na base do processo colunar. Gonóstilo: Longo e curvo. Superfície dorsal com ângulo de curvatura harmônico; superfície ventral com dilatação na região medial. Àpice

pontiagudo. Garra do gonóstlo em forma de folha, localizada no ápice da superfície ventral. Falósoma: Placa lateral discretamente maior que o esclerito do edeago. Placa lateral com processo ventral proeminente e esclerotizado, com região ventral recurvada em formato pontiagudo; processo lateral desenvolvido, com ápice em formato de platô. Esclerito do edeago em forma de gancho, em forma de meia-lua desprovida de nuances quando em vista lateral; fortemente esclerotizado; curto. Proctiger: X-Tergito com aspecto ovóide. Margem interna curva. Placa basal larga, com margem interna côncava e margem externa convexa. Paraprocto com base dilatada, mostrando claro ângulo de curvatura na direção do ápice, mais fino, via de regra. Coroa do paraprocto com 8 dentes simples, pouco curvos.



**Figura 15:** Genitália masculina de *Culex (Microculex) intermedius*. Gc - gonocoxito, Gs - gonóstilo, dSL - divisão distal do lobo subapical, pSL - divisão proximal do lobo subapical. GC - garra do gonóstilo. Lateral - vista lateral, Medial - vista medial. X-TL - lobos IX tergito. Falósoma: AeS- esclerito do eedeago, LP - placa lateral. Proctiger: BP - placa basal. X-Te - X tergito.

**Distribuição:** As informações reunidas na literatura apontam para a presença de *Cx. intermedius* unicamente ao território brasileiro.

**Material analisado:** 4 Lâminas. 4G♂. SP-VL/APA129; RJ-STA144; RJ-STA143; RJ-STA146;

**Diagnose:** Lobos do IX-Tergito em forma monticular; apice arredondado; largura maior que a altura. Presença de 5 cerdas no lobo subapical. Destas, 2 são maiores que as demais. Esclerito do edeago em forma de gancho quando em vista lateral.

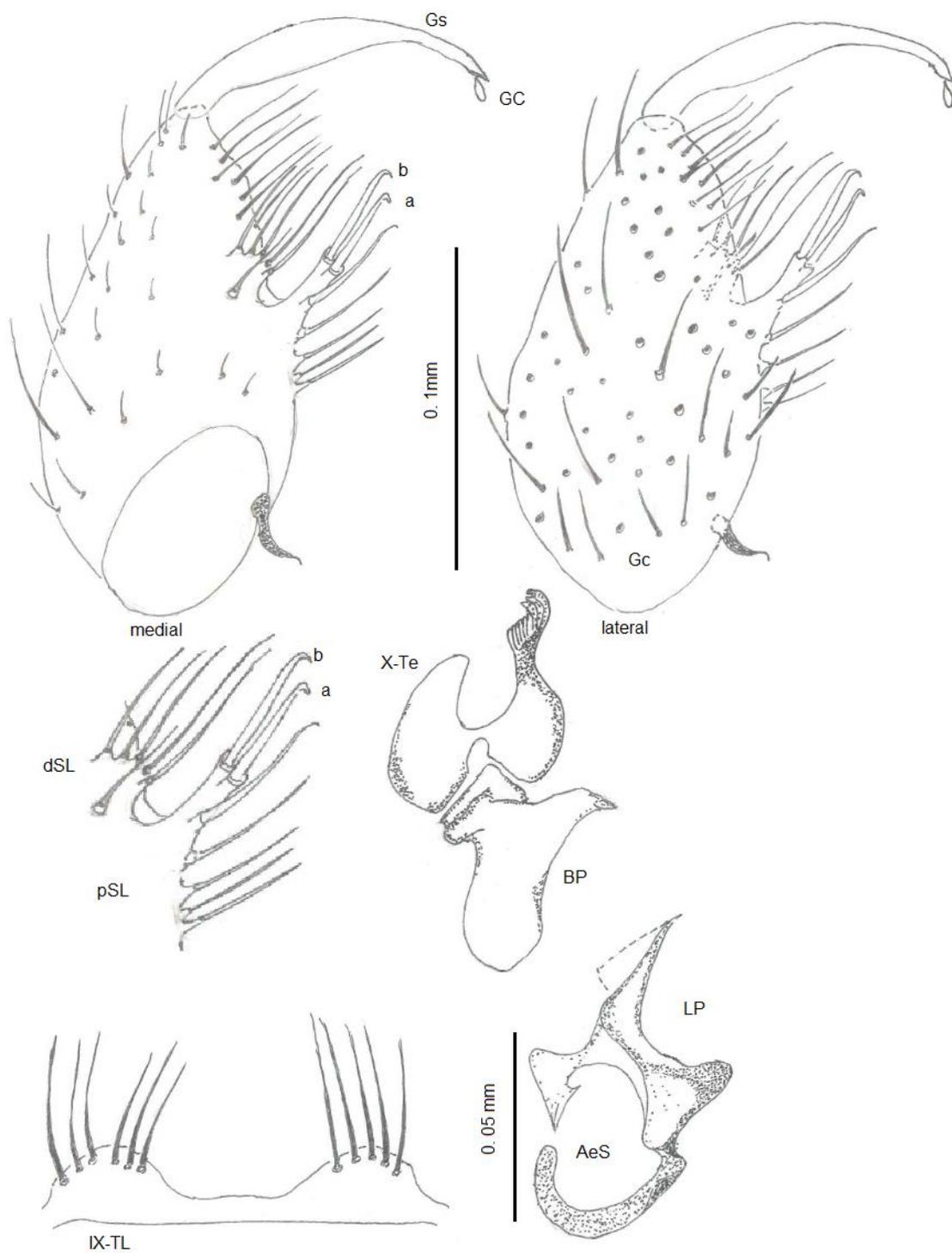
### ***Culex (Microculex) davisi* Kumm, 1933**

*Culex (Microculex) davisi*, 1933: 565 (♂G, ♀, Pe, Le). Localidade-Tipo: São Salvador, Bahia, Brasil. Material-Tipo depositado no BM

Lane, 1953: 528 (♂G, ♀, Pe, Le); Belkin, Schick & Heinemann, 1971: 26 (Loc. Tipo. Info.); Cotrim & Galati, 1977: 185 (♂G, Le); Townsend, 1990: 65 (Tipo. Info.)

**Genitália Masculina. (Figura 16).** IX- Tergito: Semelhante à *Cx. intermédius*. Lobos arredondados, de comprimento superior à altura. Região apical com 5 cerdas finas e retas, de comprimento equivalente ao dobro do lobo. Espaço entre os lobos equivalente à largura basal destes, sendo discretamente côncavo. Gonocoxito: Em aspectos gerais, assemelha-se com *Cx. intermédius*. Divisão distal do lobo subapical provido de 5 cerdas finas, simples com alguma sinuosidade. Destas, 2 possuem maior comprimento que as demais, que por sua vez, são semelhantes. Base do lobo subapical com cerda claramente menor, fina e pouco sinuosa. Divisão externa com processo colunar mediano, com 2 cerdas implantadas no ápice (cerdas *a* e *b*). Estas possuem semelhança em aspecto às presentes em *Cx. intermedius*, porém, de menor comprimento. Base do processo colunar com 3-4 cerdas desenvolvidas, semelhantes, no entanto, ao menos uma destas pode ser mais desenvolvida. Região ventromesal com 2 cerdas desenvolvidas e similares. Gonóstilo: Alongado e curvo. Ângulo de curvatura harmônico na superfície dorsal; superfície ventral com dilatação na região medial. Ápice afunilado e pontiagudo. Garra do gonóstilo em forma de folha, localizada no ápice da superfície ventral. Falósoma:

Placa lateral com dimensões superiores ao esclerito do edeago. Placa lateral com processo ventral, processo apical e processo lateral. Processo ventral desenvolvido, esclerotizado. Superfície dorsal côncava; região ventral pontiaguda; superfície ventral convexa. Processo lateral protuberante; ápice arredondado. Esclerito do edeago em forma de gancho em vista lateral. Esclerotizado; ângulo de curvatura menos harmônico que o visto em *Cx. intermedius*. A reunião destas características torna a distinção de *Cx. davisii* inequívoca. Proctiger: Paraprocto com base delgada; margem interna apresenta concavidade em direção ao ápice. X-Tergito em formato ovóide; Margem externa curva. Placa basal larga, com margem interna côncava e margem externa convexa. Coroa do paraprocto com 8 dentes simples e pouco recurvados.



**Figura 16:** Genitália masculina de *Culex (Microculex) davisi*. Gc - gonocoxito, Gs – gonóstilo, dSL – divisão distal do lobo subapical, pSL – divisão proximal do lobo subapical. GC – garra do gonóstilo. Lateral – vista lateral, Medial – vista medial. X-TL – lobos IX tergito. Falósoma: AeS- esclerito do edeago, LP – placa lateral. Proctíger: BP – placa basal. X-Te – X tergito.

**Distribuição:** Com base nos resultados de pesquisas anteriores, *Cx. davisi* é presente na Argentina, Brasil e Paraguai.

**Material analisado:** 8 Lâminas. 8G♂. SP-EC133; RJ-STA141; RJ-STA141; RJ-STA148; SP-EC127; RJ-STA21; RJ-STA17; SP-PDR145

**Diagnose:** Divisão distal com lobo subapical provido de 5 cerdas finas e simples com alguma sinuosidade. Destas, 2 possuem maior comprimento que as demais. Esclerito do edeago em forma de gancho em vista lateral. Lobos arredondados, de comprimento superior à altura, onde em cada um, existem 6 cerdas finais e retíneas.

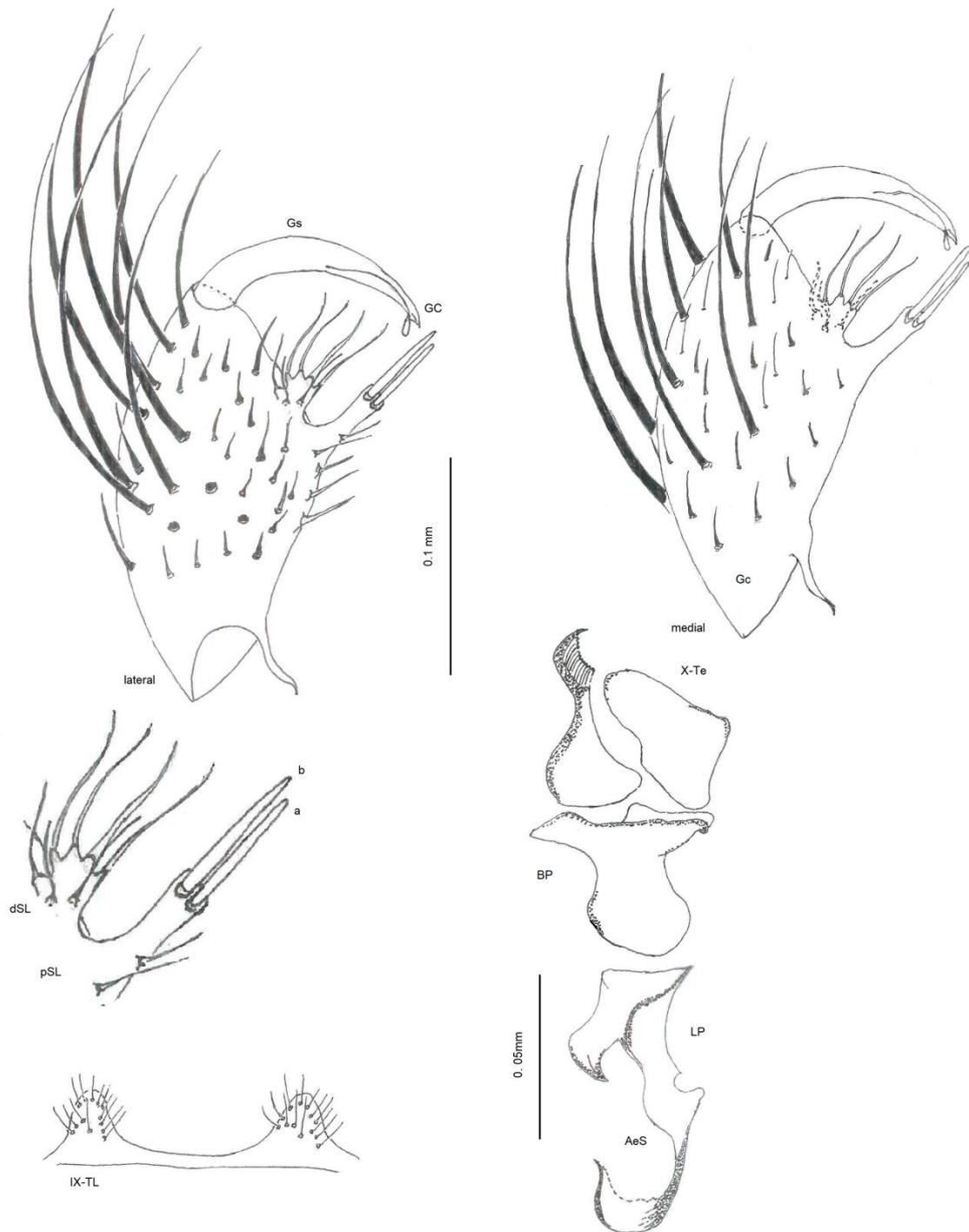
### ***Culex (Microculex) worontzowi* Pessoa & Galvão, 1936**

*Culex (Microculex) worontzowi*, 1936: 86 (♂G, ♀, Le). Localidade-Tipo: Tabatinguera, São Paulo, Brasil. Material-Tipo depositado FSP??;

Lane & Whitman, 1951: 353 (♂G, ♂, Pe, Le)

**Genitália Masculina (Figura 17) IX-Tergito:** Lobos de aspecto monticular, com ápice evidente. Espaço entre os lobos de aproximadamente 2x a largura basal destes. Cada lobo apresenta de 12-15 cerdas, todas simples e retas, presentes de forma heterogênea nas superfícies medial, apical e margem externa. Margem interna com área glabra na porção baso-lateral. **Gonocoxito:** Aspecto oblongo. Divisão distal do lobo subapical do gonocoxito com 7 cerdas, sendo 4 mais desenvolvidas, localizadas na porção apical, implantadas na região basal existem 3 cerdas menos desenvolvidas. **Processo colunar** possui 3-4 cerdas finas localizadas na base, que no geral, denota evidente aspecto glabro. Duas cerdas desenvolvidas implantadas no ápice do processo colunar (cerdas *a* e *b*). Cerdas *a* implantada inferiormente em relação à cerda *a*. Ambas não apresentam sinuosidades e curvatura no ápice. **Gonóstilo:** Estrutura de espessura e continuidade das superfícies ventral e dorsal harmoniosa. Apresenta afunilamento abrupto na porção terminal. Garra do gonóstilo em forma de folha na superfície ventral. **Falóssoma:** Placa lateral e esclerito do edeago com comprimentos semelhantes. Placa lateral com processo ventral, processo apical e processo lateral. Processo ventral guarda semelhanças com a mesma estrutura presente nas espécies da Série Pleuristriatus, porém, singularmente,

implanta-se próximo à região subapical. Mostra nitido desenvolvimento e forte esclerotização; aspecto de gancho; latero-ventralmente afunilado, o que resulta em semelhança com uma seta. Esclerito do edeago: Formato de ferradura em vista lateral. Região côncava na superfície dorsal; aspecto hialino, pouco esclerotizado, em contraste com a região de implantação e região terminal. Proctiger: Paraprocto alongado; base rombosa. Apresenta sinuosidade côncava na margem interna próxima a coroa do paraprocto. X-Tergito: Apresenta aspecto ovóide com notável dilatação presente na margem externa. Placa basal com região medial mais estreita que a região apical e medial. Coroa do paraprocto com 11 dentes levemente curvos.



**Figura 17:** Genitália masculina de *Culex (Microculex) worontzowi*. Gc - gonocoxito, Gs - gonóstilo, dSL - divisão distal do lobo subapical, pSL - divisão proximal do lobo subapical. GC - garra do gonóstilo. Lateral - vista lateral, Medial - vista medial. X-TL - lobos IX tergito. Falósoma: AeS- esclerito do eedeago, LP - placa lateral. Proctiger: BP - placa basal. X-Te - X tergito.

**Distribuição:** Relata-se *Cx. worontzowi* relacionado ao território brasileiro.

**Material analisado:** 4 Lâminas. 4G♂. SP-VL/18; SP-EC87; SP-VL/20; SP-PR86.

**Diagnose:** Lobos de aspecto monticular do IX-tergito com ápice evidente. Cada lobo apresenta de 12-15 cerdas, todas simples e retas, presentes de forma heterogênea nas superfícies medial, apical e margem externa. Lobo subapical com 7 cerdas, sendo 4 mais desenvolvidas, localizadas na porção apical, implantadas na região basal existem 3 cerdas menos desenvolvidas. Esclerito do edeago com formato de ferradura em vista lateral. Região côncava na superfície dorsal de aspecto hialino, pouco esclerotizado.

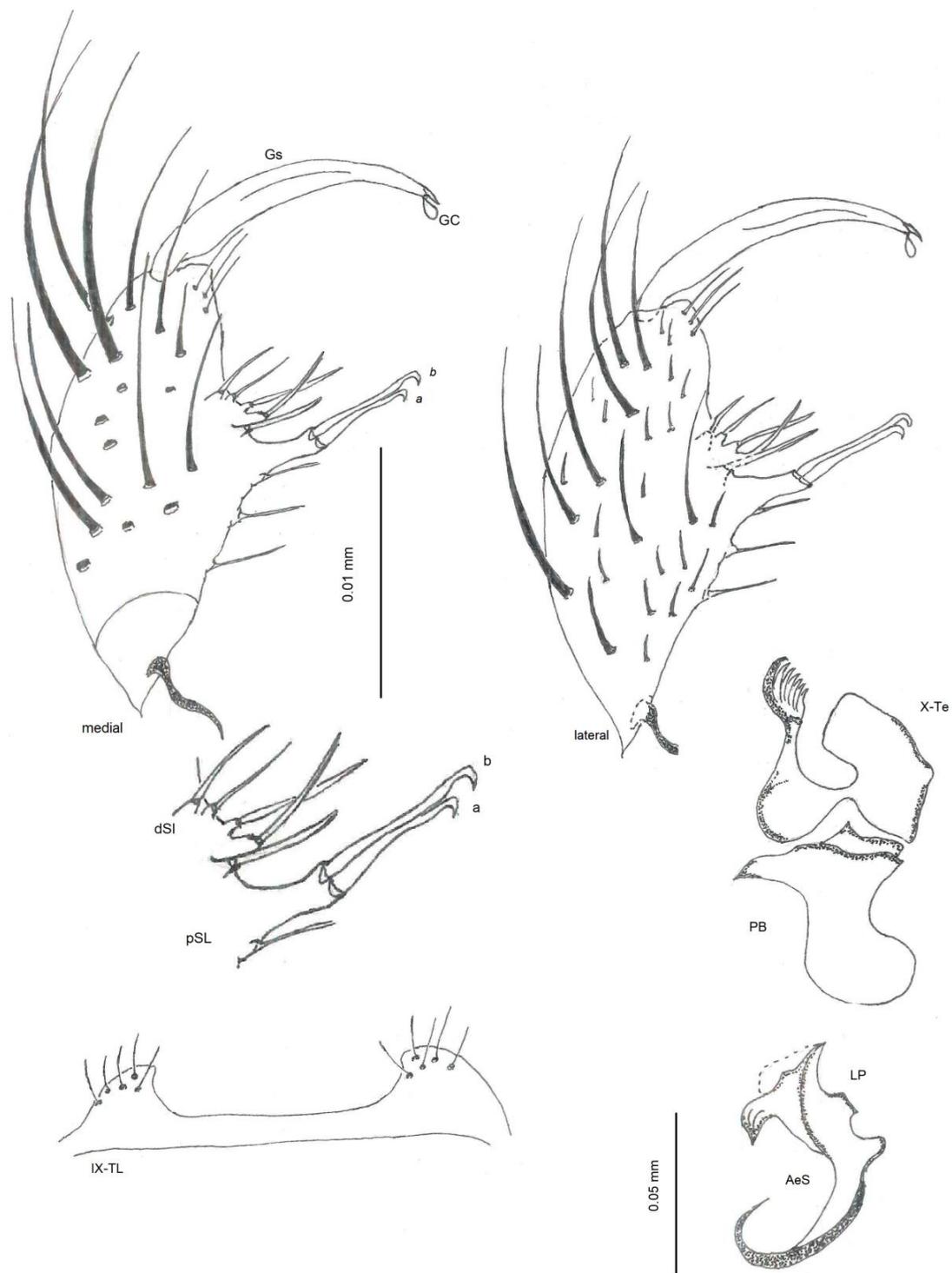
### ***Culex (Microculex) reducens* Lane & Whitman, 1951**

*Culex (Microculex) reducens*, 1951: 354 (♂G, ♀, Pe, Le). Localidade-Tipo: Guanabara, Rio de Janeiro, Brasil (INER).

Belkin, Schick & Heinemann, 1971: 26. (Tipo.Loc. Info.); Xavier, 1973: 159 (Info. Tipo)

**Genitália Masculina: (Figura 18).** IX-Tergito: Lobos com aspecto de montículo, podendo apresentar discreta formação apicular na junção da margem interna com superfície dorsal. Espaço entre os lobos de cerda de 2x a largura basal destes. Em cada lobo há presença de 5 cerdas finas e retas dispostas de maneira homegênea nas regiões apical e subapical. Gonocoxito: Oblongo. Divisão distal do lobo subapical com 5 cerdas simples, sendo três delas mais desenvolvidas e duas de evidente menor dimensão. Processo colunar Glabro. 2 cerdas desenvolvidas dispostas no ápice (cerdas *a* e *b*), sendo *a* de menor comprimento que *b*. Ambas implantadas no mesmo nível, desprovidas de sinuosidades e dotadas de curvatura evidente na região apicular. Falósoma: Placa lateral e esclerito do edeago de comprimento equivalentes. Placa lateral com processo ventral, processo apical e processo lateral. Processo ventral em situação posicional semelhante á *Cx. worontzowi*, porém, a estrutura mostra, no geral, dimensões inferiores. Esclerito do edeago com evidente similitude a um gancho, com profunda curvatura da porção terminal no sentido ventral. Na extensão geral revela forte

esclerotização, sem aparente porção hialina, ao contrário de *Cx. worontzowi*. Proctiger:  
Guarda inequívocas semelhanças com *Cx. worontzowi*. O mesmo sendo válido ao que  
tange ao X-Tergito e placa basal. Coroa do paraprocto apresenta 7 dentes levemente  
curvados.



**Figura 18:** Genitália masculina de *Culex (Microculex) reducens*. Gc - gonocoxito, Gs - gonóstilo, dSL - divisão distal do lobo subapical, pSL - divisão proximal do lobo subapical. GC - garra do gonóstilo. Lateral - vista lateral, Medial - vista medial. X-TL - lobos IX tergito. Falósoma: AeS- esclerito do edeago, LP - placa lateral. Proctiger: BP - placa basal. X-Te - X tergito.

**Distribuição:** *Cx. reducens* é uma espécie cujos registros limitam-se ao território brasileiro.

**Material Examinado:** 16 Lâminas. 16 G♂. SP-VL/APA16; RJ-STA132; SP-EC102; SP-EC96; SP-EC100; SP-CANT28; SP-CP124; SP-EC104; SP-CP124; SP-CANT123; SP-EC155; RJ-STA138; SP-VL/APA157; RJ-STA168; SP-EC134; SP-PR90.

**Diagnose:** Lobos do IX-Tergito com aspecto de montículo. Em cada lobo há presença de 5 cerdas finas e retas. Lobo subapical com 5 cerdas simples, sendo três delas mais desenvolvidas e duas de evidente menor dimensão. Esclerito do edeago com evidente similitude a um gancho, com profunda curvatura da porção terminal no sentido ventral. Na extensão geral revela forte esclerotização, sem aparentes porções hialinas.

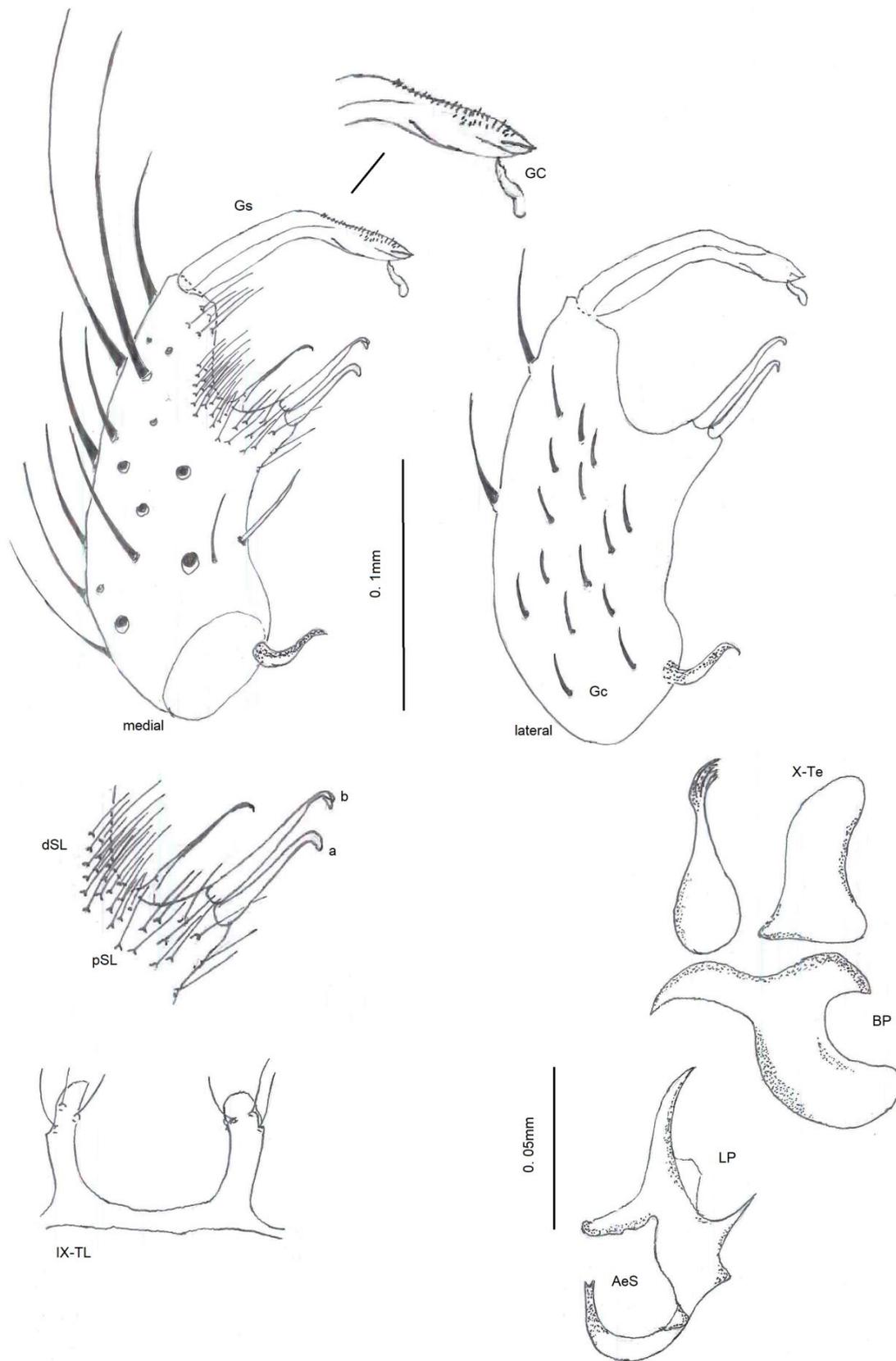
### ***Culex (Microculex) hedys* Root, 1927**

*Culex (Microculex) hedys*, 1927c: 584 (♂G). Localidade-Tipo: Angra dos Reis, Rio de Janeiro, Brasil (Material-Tipo depositado no USNM)

Pessoa & Galvão, 1936: 84 (♂, Le); Rozeboom & Komp, 1950b: 151 (♂G; Taxonomia); Belkin, Schick & Heinemann, 1971: 26 (Localização do Tipo. Info).

**Genitalia Masculina. (Figura 19).** IX-Tergito: Lobos com pronunciado desenvolvimento em comprimento, sendo de 5-6x o equivalente a largura basal, encimados por 3 cerdas de reduzidas dimensões, simples e retas, sempre na porção apical e subapical. Distância entre os lobos de cerda de 5-6x a largura basal destes. Espaço interlobular com discreta aparência côncava. Gonocoxito: Oblongo. Divisão distal do lobo subapical do gonocoxito dotado com cerdas retas, de comprimento moderado. Próximo a base processo colunar existe uma cerda isolada e mais desenvolvida. Processo colunar: Possui de 6-8 cerdas de dimensões discretas e finas, heterogêneamente difundidas pela citada área. Quando comparado a outros representantes do mesmo subgênero, nesta espécie, o processo colunar apresenta menor comprimento. No ápice existem duas cerdas desenvolvidas (cerdas *a* e *b*) implantadas de forma que não é possível determinar desnível de implantação entre elas, embora *b*

seja claramente de maior comprimento que *a*. Ambas as cerdas não mostram sinuosidades e apresentam ápice curvo. Gonóstilo: Longo, com afunilamento no sentido apical. Ângulo de curvatura tornando-se abruptamente curvo a partir do terço final. Superfície dorsal com denticulos na região apical. Falósoma: Placa lateral provida de comprimento superior ao apresentado pelo esclerito do edeago. Placa lateral apresenta processo ventral, processo apical e processo lateral. Processo ventral protuberante, evidente, fortemente esclerotizado e desenvolvido. Mostra-se perpendicular à placa lateral, implantada aproximadamente no que concerne a região medial desta. Processo apical com formação pontiaguda pronunciada, com curvatura discreta no sentido dorso lateral. Processo lateral com região pontiaguda. Esclerito do edeago com aspecto de ganho quando em vista lateral, com forte curvatura, o que lhe confere similitude a uma ferradura, tendo na região terminal discreta bifurcação. Proctiger: Paraprocto longo e afunilado com base mais dilatada que a região apical. Coroa do paraprocto apresenta 4 dentes desenvolvidos e levemente curvos dorso lateralmente. X-Tergito apresenta aspecto semitriangular. Região apical mais estreita que a região basal.



**Figura 19:** Genitália masculina de *Culex (Microculex) hedys*. Gc - gonocoxito, Gs – gonóstilo, dSL – divisão distal do lobo subapical, pSL – divisão proximal do lobo subapical. GC – garra do gonóstilo. Lateral – vista lateral, Medial – vista medial. X-TL – lobos IX tergito. Falósoma: AeS- esclerito do eedeago, LP – placa lateral. Proctiger: BP – placa basal. X-Te – X tergito.

**Distribuição:** Baseado na literatura existente, a presença de *Cx. hedys* é assinalada ao território brasileiro e colombiano.

**Material examinado:** 2 Lâminas, 2 G♂; Brasil. Ilha comprida, sem designação de coletor e identificador; STA-171.

**Diagnose:** IX- Tergito apresenta lóbulos de pronunciado comprimento, com 3 cerdas implantadas nas regiões apical e subapical. Divisão distal na porção apical com conjunto de cerdas semelhantes. Superfície dorsal do gonóstilo com denticulos na região apical. Processo colunar com duas cerdas (cerdas *a* e *b*) implantadas no mesmo nível, sendo *a* menor que *b*. Placa lateral apresenta processo ventral desenvolvido, perpendicular e implantada na região medial. Esclerito o edeago similar a uma ferradura, fortemente esclerotizado.

### ***Culex (Microculex) aphyllactus* Root, 1927**

*Culex (Microculex) aphyllactus*, 1927c: 584 (♂G). Localidade-Tipo: Rio Soberbo, Rio de Janeiro, Brasil. Material-Tipo depositado no USNM.

Rozeboom & Komp, 1950b: 156 (♂G); Lane & Whitman, 1951: 363 (♂G, ♀, Pe, Le); Belkin, Schick & Heinemann, 1971: 25 (Loc. Tipo. Info)

**Genitália Masculina. (Figura 20).** IX-Tergito: Lobos digitiformes. Alongados com discreta inclinação na margem interna. Comprimento equivalente a mais de 3x a largura basal. Espaço entre os lobos se mostra de maneira linear; equivalen a não menos que 4x a largura basal destes. Na região apical há presença de 3 cerdas simples, retas e curtas; pode haver concomitantemente a estas, outra pequena cerda, de dimensões semelhantes, na margem externa, em situação mais basal. Gonocoxito: Oblongo, com região medial mais larga que o restante da estrutura. Divisão distal do lobo subapical apresenta conjunto de cerdas, onde uma delas possui conformação foliar. Ao lado desta, existem 2 cerdas delgadas. Mesoventralmente existem 2 cerdas robustas, delgadas, levemente

sinuosas, onde a mais próxima do processo colunar da divisão proximal se mostra maior. Processo colunar evidente, de formato protuberante, onde a região basal é claramente mais larga que o ápice. No ápice existem 2 cerdas desenvolvidas (cerda *a* e *b*). Estas são de tamanho médio, implantadas no mesmo nível, sendo *a* pouco menor que *b*. Base do processo colunar permeado por cerdas de menor dimensão, de comprimento reduzido. Posicionadas na margem externa, existem 4 cerdas de comprimento similar ou mesmo superior à *a* e *b*, porém menos delgadas. Gonóstilo: Estreito e alongado. Ângulo de curvatura harmônico, sem discrepâncias acentuadas. Superfície ventral e dorsal sem presença de protuberâncias e concavidades. Região apical pontiaguda. Garra do gonóstilo em forma de folha, localizada no ápice da superfície ventral. Falósoma: Placa lateral e esclerito do edeago com comprimentos similares. Placa lateral apresenta processo ventral, processo apical e processo lateral. Processo ventral desenvolvido esclerotizado em forma de garra; região ventral pontiaguda. Processo apical pontiagudo. Processo lateral em conformação calosa. Esclerito do edeago em forma de gancho quando em posição lateral. Fortemente esclerotizado e desprovido de regiões hialinas. Porção terminal pontiaguda. Proctiger: Paraprocto estreito na porção medial e dilatado na porção basal. Evidente concavidade na junção destas regiões. Coroa do paraprocto com dentes curvos. X-tergito aparentemente fundido ao paraprocto. Aparência irregular. Margem externa apresenta concavidade. Placa basal larga. Margem externa convexa. Margem interna côncava. Região medial e basal com larguras semelhantes. Estrutura apresenta curvatura.



**Figura 20:** Genitália masculina de *Culex (Microculex) aphyllactus*. Gc - gonocoxito, Gs - gonóstilo, dSL - divisão distal do lobo subapical, pSL - divisão proximal do lobo subapical. GC - garra do gonóstilo. Lateral - vista lateral, Medial - vista medial. X-TL - lobos IX tergite. Falósoma: AeS- esclerito do edeago, LP - placa lateral. Proctiger: BP - placa basal. X-Te - X tergite.

**Distribuição:** Com base em publicações a respeito, *Cx. worontzowi* é registrado apenas em território brasileiro.

**Material analisado:** 09 lâminas, 9 G♂. FSP-212; FSP-213; FSP-214; FSP-215; FSP-216; FSP-217; FSP-22.04.1992; FSP-02.04.1992; APA-11.03.2015

**Diagnose:** Divisão distal do lobo subapical apresenta uma cerda de formato foliar. Ao lado desta, existem 2 cerdas delgadas. Na porção mesoventral nota-se 2 cerdas robustas, delgadas, pouco sinuosas. Destas, a mais próxima do processo colunar da divisão proximal é maior. Lobos do IX-tergito digitiformes. Alongados com discreta inclinação na margem interna. Comprimento equivalente a mais de 3x a largura basal. Espaço entre os lobos se mostra de maneira linear; equivalem a não menos que 4x a largura basal destes. Na região apical há presença de 3 cerdas simples, retas e curtas. Esclerito do edeago em forma de gancho quando em posição lateral. Fortemente esclerotizado e desprovido de regiões hialinas. Porção terminal pontiaguda.

### ***Culex (Microculex) inimitabilis* Dyar & Knab, 1906**

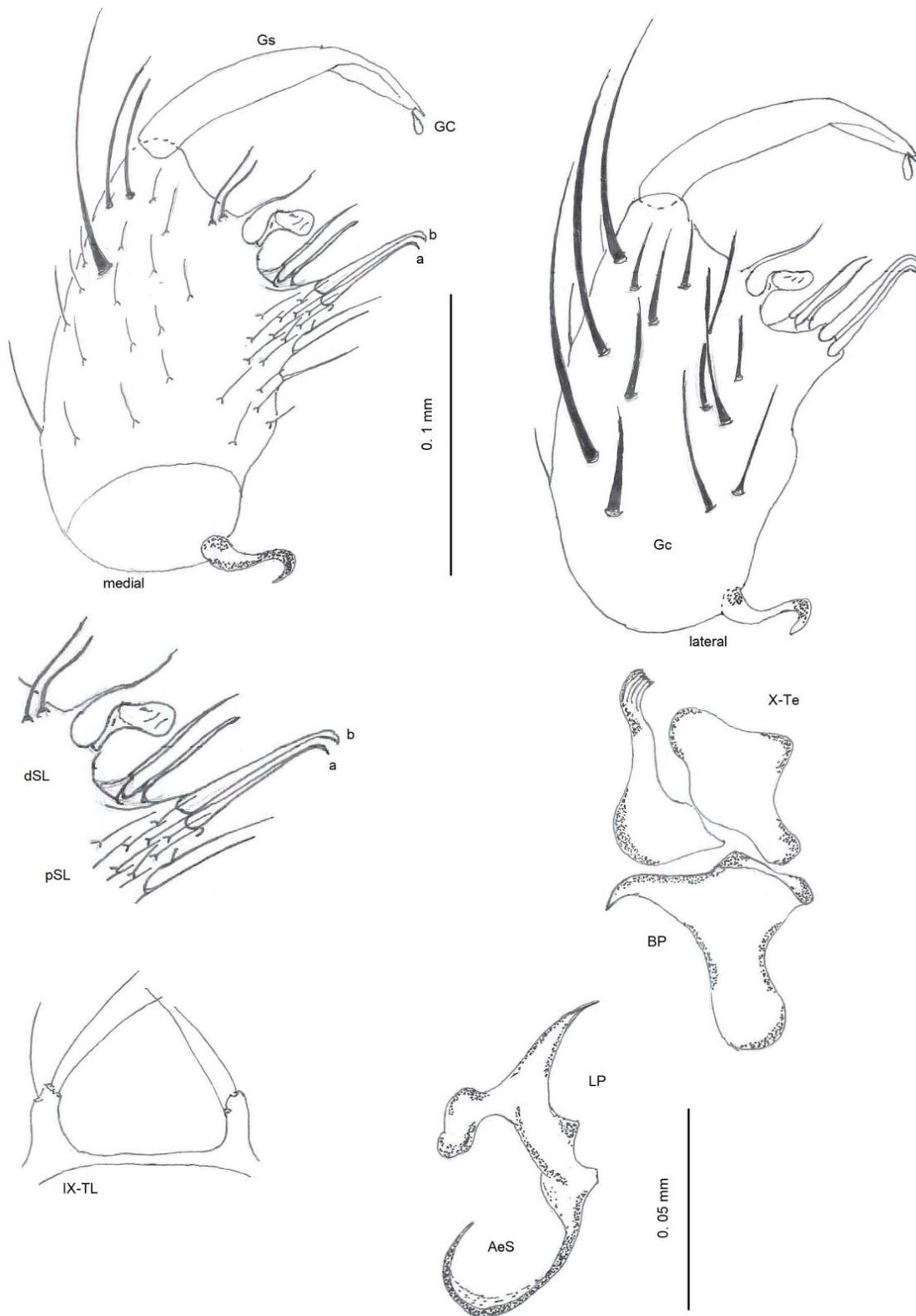
*Culex (Microculex) inimitabilis*, 1926d: 221 (Le). Localidade-Tipo: Trindade. Material-Tipo depositado no NE.

Pessoa & Galvão, 1936: 86 (Le); Lane, 1953 (♂G, ♀, Pe, Le); Stone & Knight, 1957: 51 (Tipo. Info); Belkin & Heinemann, 1976c: 272 (Granada)

**Genitália Masculina. (Figura 21).** IX-Tergito: Lobos digitiformes, sendo mais altos que largos. Comprimento equivale a no máximo 2x ao que é observado no comprimento. Região apical arredondada, onde podem ser notadas 2 à 3 cerdas finas, retas e longas, no geral, podendo alcançar o dobro do comprimento dos lobos. Espaço entre os lobos equivale à 4x a largura basal destes. Gonocoxito: Oblongo. Lóbulo subapical dividido em divisão distal e divisão proximal. Divisão distal apresenta 1 cerda modificada em formato de folha, localizada de maneira basal à 1 cerda de comprimento maior, de aspecto afunilado e levemente sinuosa. Ao lado destas, existem 2 cerdas semelhantes em conformação. De maneira basal em relação à cerda foliar, é presente 1 cerda de comprimento superior, retilínea e simples. Divisão proximal com processo

colunar desenvolvimento em forma monticular, sendo a largura maior que a altura, com perceptível, porém discreto afunilamento em direção ao ápice. Região apical com duas cerdas desenvolvidas (Cerdas *a* e *b*). Estas estão inseridas no mesmo nível. Apresentam aspecto delgado e região apical curva; cerda *a* de comprimento inferior à cerda *b*. Base do processo colunar permeado por agrupamento de cerdas hialinas de comprimento semelhante; podem mostrar-se presente até a região mesoventral. Margem externa do processo colunar com 3 cerdas desenvolvidas, porém, menos delgadas que *a* e *b*. Destas, a localizada na região basal é de menor comprimento. Gonóstilo: Curvo, aspecto levemente delgado. Superfície ventral e dorsal desprovida de protuberâncias ou concavidades. Região apical pontiaguda. Garra do gonóstilo em formato de folha, localizada no ápice da superfície ventral. Falósoma: Placa lateral e esclerito do edeago apresentam comprimentos equivalentes. Placa lateral com processo ventral, processo apical e processo lateral. Processo ventral desenvolvido em forma de gancho. Formação calosa presente em sua superfície dorsal. Processo apical pontiagudo. Processo lateral de perfil baixo e pontiagudo. Esclerito do edeago em forma de gancho quando em vista lateral. Estreito e esclerotizado em toda extensão; exceção feita à pequena porção hialina presente em uma pequena porção a superfície dorsal. Proctiger: Paraprocto alongado. Região basal dilatada. Margem externa discretamente côncava. Coroa do paraprocto com 5 dentes curvos. X-tergito com contornos irregulares. Placa basal larga. Margem interna apresenta ângulo côncavo e margem externa apresenta ângulo convexo. Região medial e região basal sem evidente discrepância ao que se refere à largura.

**Sub-espécie:** *Culex (Microculex) fuscatus*.



**Figura 21:** Genitália masculina de *Culex (Microculex) inimitabilis*. Gc - gonocoxito, Gs - gonóstilo, dSL - divisão distal do lobo subapical, pSL - divisão proximal do lobo subapical. GC - garra do gonóstilo. Lateral - vista lateral, Medial - vista medial. X-TL - lobos IX tergite. Falósoma: AeS- esclerito do edeago, LP - placa lateral. Proctiger: BP - placa basal. X-Te - X tergite.

**Distribuição:** *Cx. inimitabilis* é uma espécie amplamente difundida pela América do sul e Central, sendo documentada em: Brasil, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Granada, Guiana, Panamá, Suriname, Trinidad e Tobago, Venezuela.

**Material analisado:** 4 lâminas; 4 G♂. STA11; FSP089; FSP-13279; FSP-13280.

**Diagnose:** Lobos digitiformes, mais altos que largos. Comprimento equivale a no máximo 2x ao que é observado no comprimento. Espaço entre os lobos equivale à 4x a largura basal destes. Margem externa do processo colunar com 3 cerdas desenvolvidas, porém, menos delgadas que *a* e *b*. Esclerito do edeago em forma de gancho quando em vista lateral. Estreito e esclerotizado em toda extensão; exceção feita à pequena porção hialina presente em uma pequena porção a superfície dorsal.

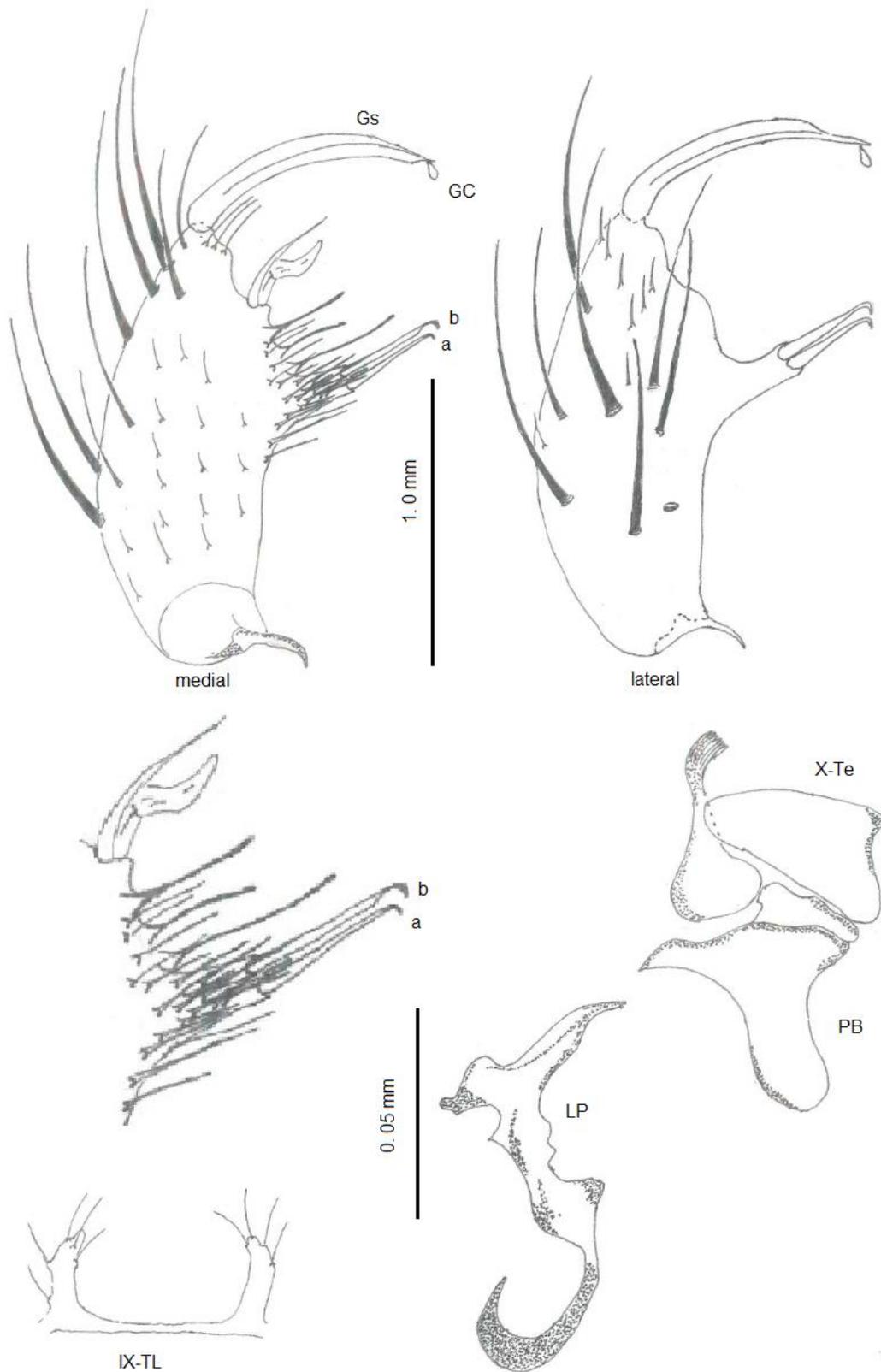
### ***Culex (Microculex) fuscatus* Lane & Whitman, 1951**

*Culex (Microculex) fuscatus*, 1951: 361 (Pe, Le). Material-Tipo: Rio Soberbo, Rio de Janeiro, Brasil. Material-Tipo depositado no INER.

Lane, 1953 (Belkin, Schick & Heinemann, 1971 (Tipo. Info); Xavier, 1973: 159 (Tipo. Info)

**Genitalia Masculina: (Figura 22).** IX-Tergito: Semelhante à *Cx. inimitabilis*. Lobos digitiformes, de comprimento equivalente a 3x sua largura basal, com margem interna levemente côncava e margem externa levemente convexa. Cada lobo de 4 a 5 cerdas simples e retas, podendo estar implantadas nas porções basal, medial e apical, sendo 2 obrigatoriamente presentes na porção apical. Espaço entre os lobos equivalentes a 3-4x sua largura basal. Gonocoxito: Guarda relevante semelhança à *Cx. inimitabilis*. Oblongo. Divisão distal do lobo subapical com cerda de formato foliar. Ao lado desta, existe outra cerda, esta de formato delgado e longo. Divisão proximal com processo colunar médio, com duas cerdas (cerda *a* e *b*) desenvolvidas e inseridas na região apical. Ambas retíneas, implantadas no mesmo nível e apresentam curvatura na porção apical. Cerda *a* discretamente maior que *b*. Gonóstilo: Estreito e alongado. Sem dilatações ou

protuberâncias na superfície ventral e dorsal. Ângulo de curvatura harmônico. Garra do gonóstilo em forma de folha no ápice da superfície ventral. Ápice arredondado. Falósoma: Placa lateral de maior comprimento que o esclerito do edeago. Placa lateral esclerotizada; processo ventral proeminente, implantado próximo à região subapical; processo apical pontiagudo; processo lateral de menor dimensão, com ápice arredondado. Esclerito do edeago em forma de gancho em vista lateral, fortemente esclerotizado, desprovido de região hialina. Porção terminal pontiaguda. Proctiger: X-Tergito com ápice mais estreito que a base, aspecto subtriangular; contornos suaves, arredondados. Placa basal larga; margem interna côncava, margem externa convexa. Paraprocto com base evidentemente dilatada; região medial afunilada, ausência de sinuosidades. Coroa do paraprocto com 7 dentes simples curvados.



**Figura 22:** Genitália masculina de *Culex (Microculex) fuscatus*. Gc - gonocoxito, Gs - gonóstilo, dSL - divisão distal do lobo subapical, pSL - divisão proximal do lobo subapical. GC - garra do gonóstilo. Lateral - vista lateral, Medial - vista medial. X-TL - lobos IX tergito. Falósoma: AeS- esclerito do edeago, LP - placa lateral. Proctiger: BP - placa basal. X-Te - X tergito.

**Distribuição:** De acordo com a literatura, *Cx. fuscatus* é relatado apenas no território brasileiro.

**Material analisado:** 7 Lâminas. 7G♂. RJ-STA30; SP-BG55; SP-J/APA3; SP-EC111; SP-EC160; SP-PR24; FSP-E8779.

**Diagnose:** Divisão distal do lobo subapical do gonocoxito com cerda foliar geralmente menos curva que a presente em *Cx. inimitabilis*. Lobos do IX- tergito com altura equivalente a 4x sua largura basal.

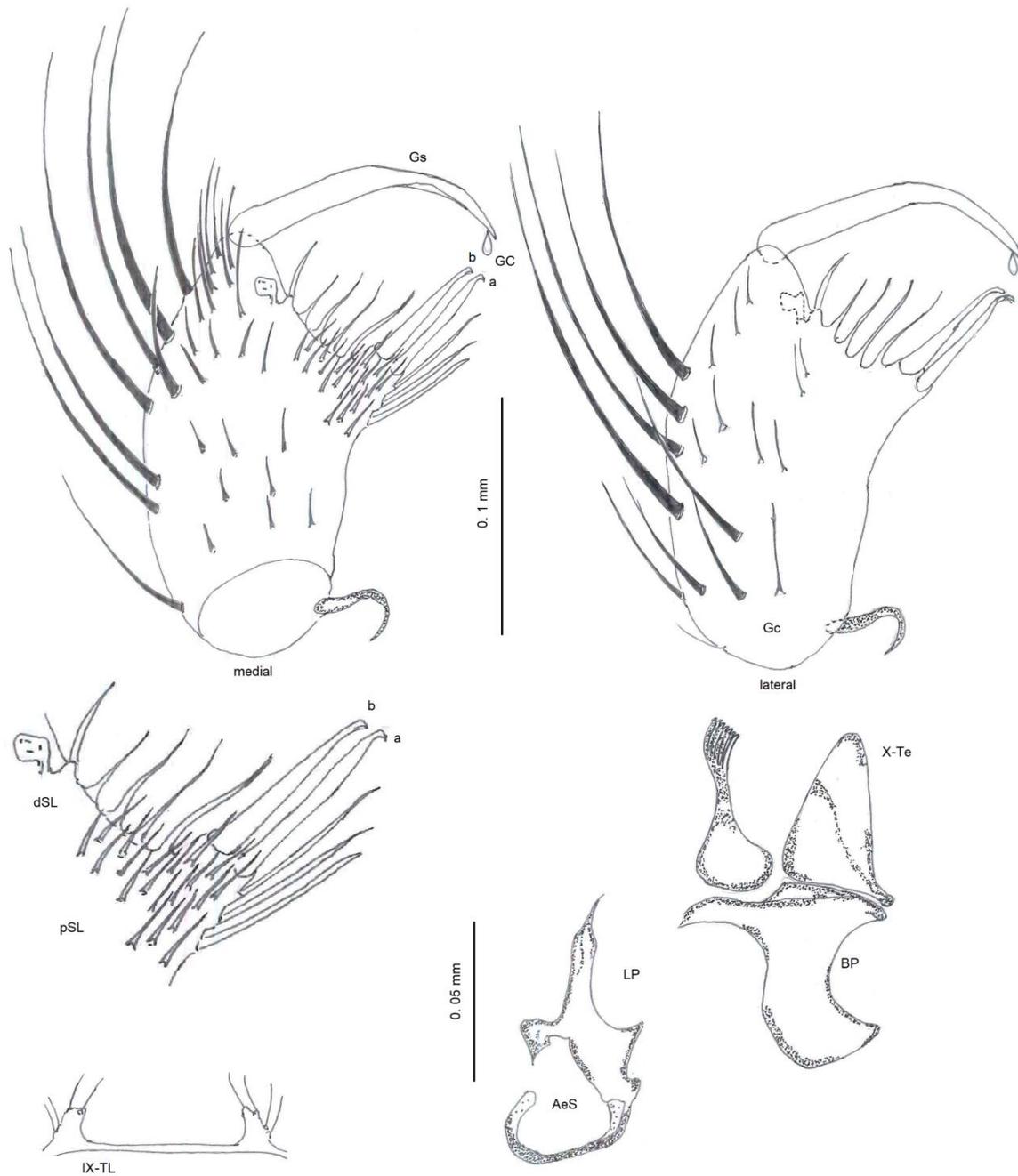
### ***Culex (Microculex) neglectus* Lutz, 1904**

*Culex neglectus*, Lutz, 1904 (In Bourroul, 1904:27) (♂, ♀).Localidade-Tipo: Serra da Cantareira, São Paulo, Brasil. Material-Tipo depositado no USNM.

Rozeboom & Komp, 1950b: (♂G); Lane & Whitman, 1951: 364 (♂G, ♀, Pe, Le; Desig. Lectótipo); Belkin et al, 1971: 26 ( Info. Tipo)

**Genitália Masculina (Figura 23).** IX-Tergito: Lobos proporcionalmente pequenos, de comprimento cerca de 1.5x a largura basal. Espaçamento entre os lobos cerca de 5x a largura basal destes. Cada lobo apresenta 4 cerdas finas e simples; duas delas localizadas na região apical e duas na região basal da margem externa. Gonocoxito: Divisão distal do lobo subapical com presença de 1 cerda de aspecto foliar. Esta, dispoem-se ao lado de uma cerda filiforme, via de regra, mais comprida. Ao longo do lobo subapical existe um conjunto de cerdas, em linha, de tamanho e espessura semelhantes. Processo colunar de largura nitidamente superior ao comprimento, o que lhe confere aparência tubercular. Ápice encimado por duas cerdas (cerdas *a* e *b*) com espessuras semelhantes e implantadas no mesmo nível. Ambas apresentam aspecto retilíneo, comprimento equivalente e curvatura apical. Base do processo colunar composto por grande quantidade de cerdas de tamanho reduzido. Margem externa com 3 cerdas maiores dispostas ladeadas de maneira harmoniosa. Estas apresentam aspecto e comprimento similares. Gonóstilo: Afilado. Ângulo de curvatura descenente harmonioso, revelando afunilamento no 1/3 apical. Superfície ventral e dorsal desprovidas de ondulações ou dilatações. Garra do gonóstilo em forma de folha,

localizada na superfície ventral. Falósoma: Placa lateral com comprimento maior que o apresentado pelo esclerito do edeago. Placa lateral com processo ventral, processo apical e processo lateral. Processo ventral localizado na porção medial da margem interna da placa lateral. Revela aparência em forma de gancho, com protuberância evidente na região distal. Região de implantação de largura menor que. Formação com aspecto de seta na junção distal das margens interna e externa. Processo apical longo e pontiagudo. Esclerito do edeago com ângulo curvo em vista lateral. Fortemente esclerotizado, podendo apresentar diminuta região hialina próxima a porção terminal. Esta se curva para a região interna, em ângulo relativamente abrupto. Proctiger: Paraprocto alongado, de base com aspecto globular. X-Tergito com aspecto triangular. Placa basal com região apical notoriamente mais largo que a porção basal, que por sua vez não apresenta importante disparidade à região medial. Coroa do paraprocto com presença de 7 dentes curvados.



**Figura 23:** Genitália masculina de *Culex (Microculex) neglectus*. Gc - gonocoxito, Gs - gonóstilo, dSL - divisão distal do lobo subapical, pSL - divisão proximal do lobo subapical. GC - garra do gonóstilo. Lateral - vista lateral, Medial - vista medial. X-TL - lobos IX tergite. Falósoma: AeS- esclerito do eedeago, LP - placa lateral. Proctiger: BP - placa basal. X-Te - X tergite.

**Distribuição:** De acordo com os registros, *Cx. neglectus* é determinado unicamente ao território brasileiro.

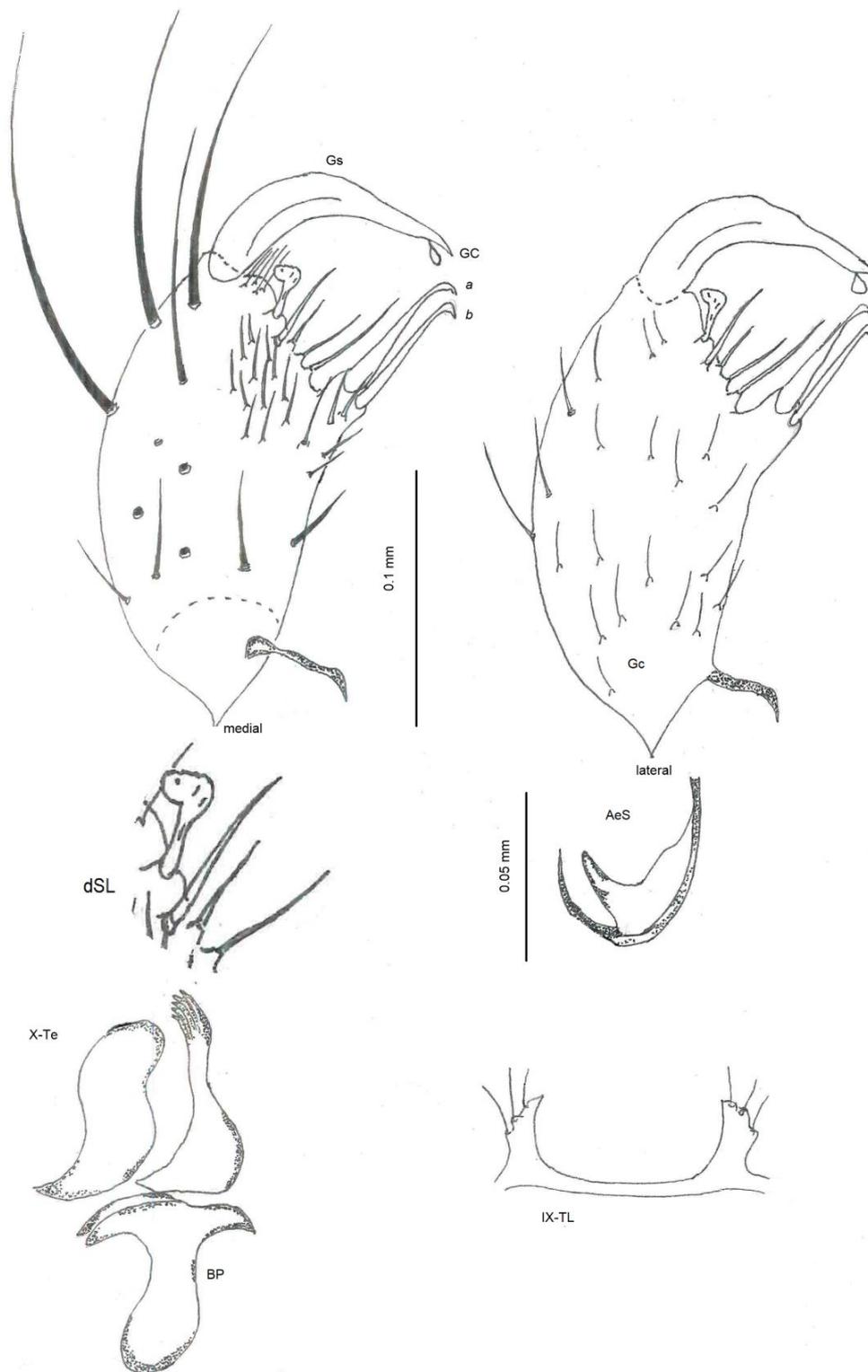
**Material examinado:** 8 Lâminas; 8 G♂. SP-CP156; SP-CP158; SP-CP161; SP-CP162; SP-EC163; SP-EC165; SP-EC166; RJ-STA196.

**Diagnose:** Esclerito do edeago com ângulo curvo em vista lateral. Fortemente esclerotizado, podendo apresentar diminuta região hialina próxima a porção terminal. Esta se curva para a região interna, em ângulo relativamente abrupto.

### ***Culex (Microculex) neglectus* Sp1**

**Genitalia Masculina. (Figura 24).** IX-Tergito: Lobos com aspecto digitiforme; comprimento equivalente a cerca de 2x a largura basal. Margem interna discretamente ovalada. Margem externa apresenta 3 cerdas finas e simples, distribuídas entre a região apical e subapical. Espaço entre os lobos equivale a 4x a largura basal deste. Gonocoxito: Apresenta semelhanças à *Cx. neglectus*. Divisão distal do lobo subapical do gonocoxito apresenta foliar de aspecto foliar. Esta pode possuir haste discretamente mais longa que as usualmente vistas em *Cx. neglectus*. Divisão proximal com processo colunar. Este apresenta 2 cerdas apicais (cerda *a* e *b*), estas, bem desenvolvidas, implantadas no mesmo nível. São similares em comprimento e não apresentam sinuosidades, sendo *a* discretamente menor. Ambas possuem ângulo de curvatura no ápice. Base do processo colunar apresenta considerável quantidade de cerdas de menor porte. Margem interna do processo colunar apenas com cerdas finas, simples, de menor comprimento. Gonóstilo: Evidentemente curvo. Quando comparado às espécies da Série Inimitabilis, pode ser reconhecido por ser bem mais curto e robusto. Região apical afunilada. Garra do gonóstilo em formato de folha, localizada na superfície ventral. Falósoma: Placa lateral apresenta comprimento superior ao esclerito do edeago. Esclerito do edeago forma de arco com ângulo de curvatura harmônico. Margem interna preenchida por estrutura robusta e digitiforme, de ápice liso, que lhe confere aspecto e conformação singular ao observado à espécie *Cx. neglectus*. Proctiger: X-Tergito de aspecto delgado com contornos irregulares. Placa basal apresenta região apical larga; margem interna côncava, margem externa convexa. Paraprocto alongado com base

rombosa. Discreta sinuosidade na região subapical. Coroa do paraprocto com 5 dentes simples, levemente curvos.



**Figura 24:** Genitália masculina de *Culex (Microculex) neglectus* sp.1. Gc - gonocoxito, Gs - gonóstilo, dSL - divisão distal do lobo subapical, pSL - divisão proximal do lobo subapical. GC - garra do gonóstilo. Lateral - vista lateral, Medial - vista medial. X-TL - lobos IX tergite. Falósoma: AeS- esclerito do eedeago, LP - placa lateral. Proctiger: BP - placa basal. X-Te - X tergite.

**Distribuição:** Espécie determinada às localidades onde foram encontradas em atividades de coleta

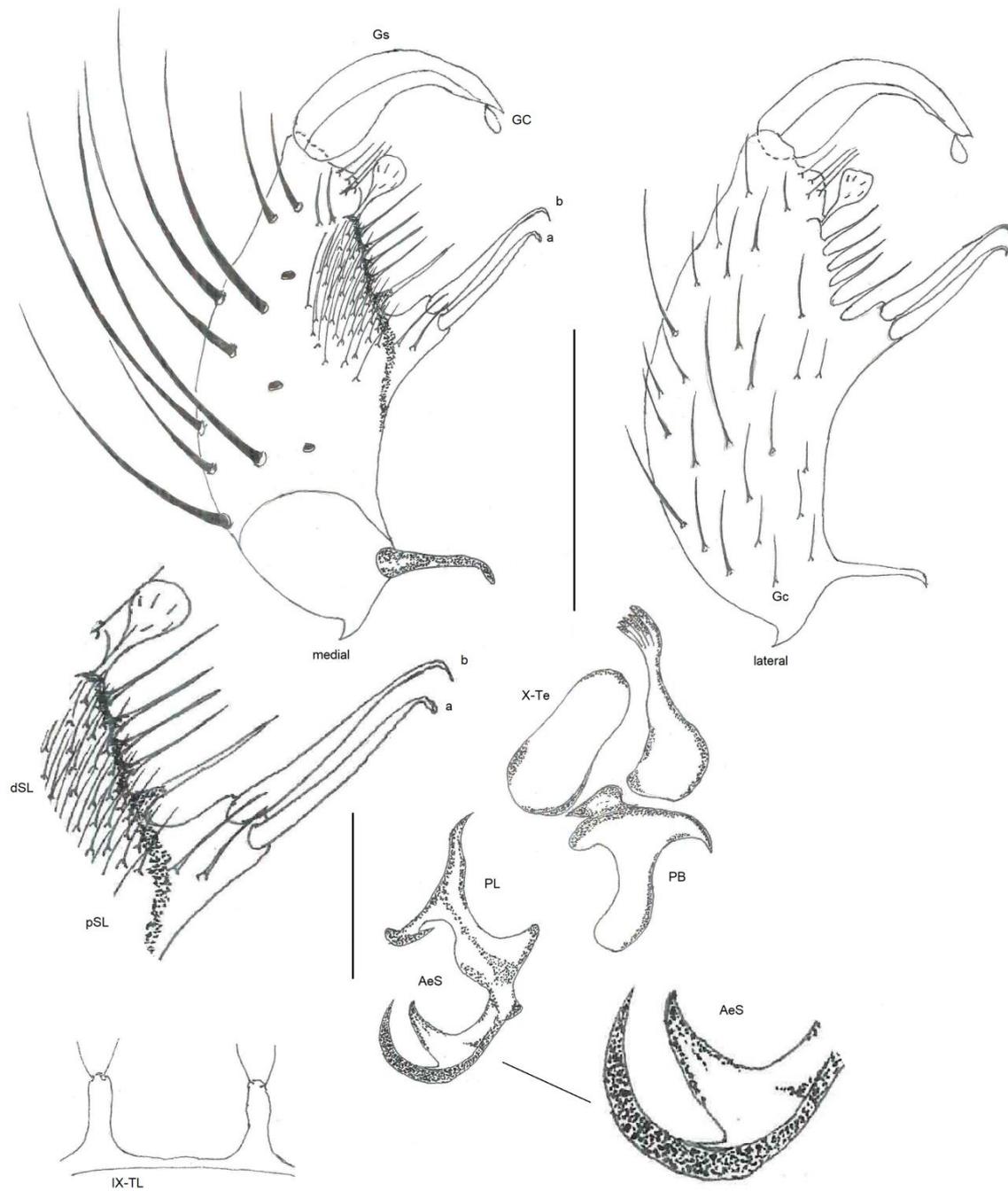
**Material analisado:** 5 Lâminas. 5G♂. SP-J/APA4; SP-CANT21; SP-MTS213; RJ-STA4; FSP-SP47-14

**Diagnose:** Margem interna do esclerito do edeago com robusta formação hialina com processo digitiforme.

### ***Culex (Microculex) neglectus sp.2***

**Genitália Masculina.** (Figura 25). IX-Tergito: Lobos digitiformes, tendo o comprimento equivalente a cerca de 2x a largura basal destes, à semelhança de *Cx neglectus sp1* e *Cx. fuscatus*. Ápice possui 2 cerdas finas, simples e retas. Margem interna e externa, retas. Espaço entre os lobos equivalente a 3x a largura basal destes. Gonocoxito: Semelhante à *Cx. neglectus* e *Cx. neglectus sp1*. Oblongo. Divisão distal do gonocoxito com lobo subapical. Este possui cerda com aspecto foliar, que apresenta haste com comprimento notavelmente de maior a assinalada em *Cx. neglectus*. Lobo subapical com conjunto de cerdas delgadas que se estendem até a base do processo colunar. Processo colunar: Curto. 2 cerdas delgadas no ápice (cerdas *a* e *b*), ambas retílineas com curvatura apical. Cerda *b* com maior comprimento que *a*. Base do processo colunar com menor conjunto de cerdas quando comparado com *Cx. neglectus* e *Cx. neglectus sp1*. Ausência de cerdas desenvolvidas na margem externa. Gonóstilo: Aspecto delgado, curto em forma de gancho. Região basal evidentemente delgada. Garra do gonostilo em forma de folha no ápice da superfície ventral. Falósoma: Placa lateral de maior comprimento que o esclerito do edeago. Placa lateral apresenta processo ventral, processo apical e processo lateral. Processo ventral desenvolvido e esclerotizado, localizado na porção medial da margem interna, com saliência pontiaguda ventralmente. Processo apical desenvolvido, pontiagudo. Processo lateral desenvolvido, de base larga, pontiagudo. Esclerito do edeago com profundas semelhanças com *Cx.*

*neglectus Sp1*. Superfície ventral em forma de arco com ângulo de curvatura harmônico. Margem interna preenchida por estrutura robusta e digitiforme, de ápice liso. Proctiger: X-Tergito de conformação delgada. Apresenta contornos irregulares, no geral, arredondados. Placa basal com margem interna côncava e externa convexa. Paraprocto. Aspecto similar à *Cx. neglectus* e *Cx. negectus Sp1*. Coroa do paraprocto com 5 dentes, pouco recurvados.



**Figura 25:** Genitália masculina de *Culex (Microculex) neglectus* sp.2. Gc - gonocoxito, Gs - gonóstilo, dSL - divisão distal do lobo subapical, pSL - divisão proximal do lobo subapical. GC - garra do gonóstilo. Lateral - vista lateral, Medial - vista medial. X-TL - lobos IX tergito. Falósoma: AeS- esclerito do edeago, LP - placa lateral. Proctiger: BP - placa basal. X-Te - X tergito.

**Distribuição:** Locais onde foram coletados. Colocar.

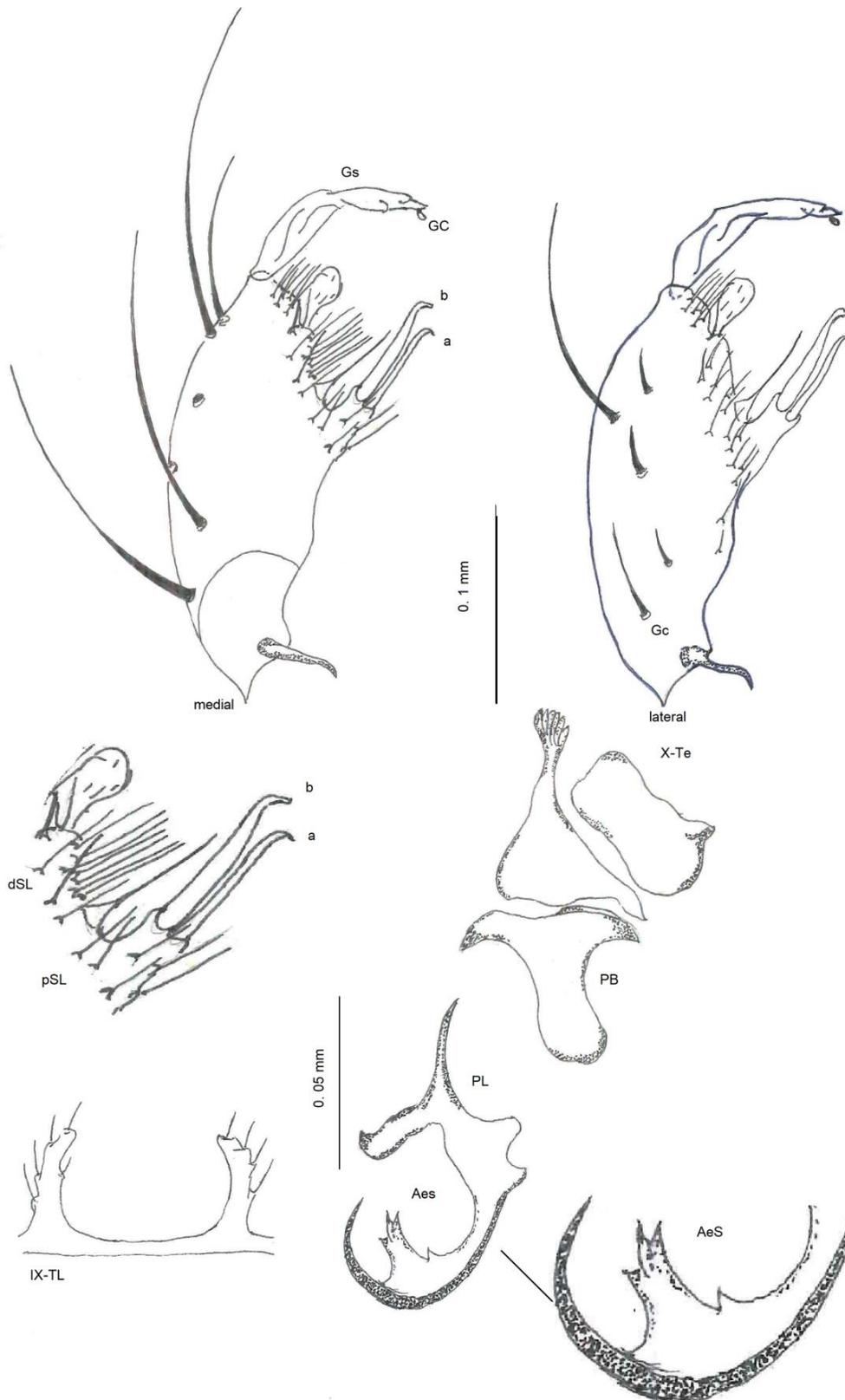
**Material analisado:** 14 Lâminas. 14G♂. SP-PR37; SP-J/APA2; SP-PR44; SP-VL/APA22; SP-EJ195; SP-SM213; SP-PR70; SP-EC97; RJ-STA3; RJ-STA189; RJ-STA185; SP-PR75; SP-VL/APA9; RJ-STA5.

**Diagnose:** IX-Tergito com lobos digitiformes, tendo o comprimento superior ao associado com *Cx. neglectus*. Cerda de aspecto foliar com haste notavelmente alongada presente no lobo subapical da divisão distal. Margem interna do esclerito do edeago preenchida por estrutura robusta e digitiforme de ápice liso.

### ***Culex (Microculex) neglectus sp.3***

**Genitalia Masculina. (Figura 26).** IX-Tergito: Aspecto semelhante à *Cx. fuscatus* e *Cx. neglectus sp2*. Lobos em formato digitiforme, de comprimento equivalente a 3x sua largura basal. Margem interna e externa curvadas. Espaço levemente côncavo, sendo entre os lobos à 3x a largura basal destes. Gonocoxito: Oblongo. Aspecto geral de grande similitude à *Cx. neglectus sp1*, *Cx. neglectus sp2*. Divisão distal apresenta lobo subapical com cerda foliar. Esta, de base mais delgada que a vista em *Cx. neglectus*, *Cx. neglectus sp1* e *Cx. neglectus sp2*, bem como a própria cerda mostra-se mais desenvolvida. Cerdas delgadas e retas existem até a base do processo colunar. Processo colunar: Curto, possui 2 cerdas implantadas no ápice (cerda *a* e *b*). Ambas de aspecto delgado, inseridas no mesmo nível. Cerda *b* pouco maior que *a*. Base do processo colunar apresenta conjunto de cerdas de menores dimensões. Margem externa do processo colunar com 2 cerdas mais desenvolvidas. Gonóstilo: Semelhante à *Cx. neglectus sp1* e *Cx. neglectus sp2*. Falósoma: Placa lateral e esclerito do edeago com comprimentos equivalentes. Placa lateral apresenta processo ventral, processo apical e processo lateral. Processo ventral bem desenvolvido em ângulo perpendicular à placa lateral, fortemente esclerotizado. Processo apical desenvolvido e pontiagudo. Processo lateral com reentrância côncava. Esclerito do edeago curvo em vista lateral, em semelhança com gancho. Aspecto geral similar à *Cx. neglectus sp1* e *Cx. neglectus sp2*, exceção a região apicular da formação hialina com formato digitiforme na margem interna. Esta, é caracterizada por espículas, que variam de 2 à 4. Proctiger: X-Tergito

delgado com formato próximo a retangular; processo lateral na porção dorso ventral da margem externa. Placa basal larga; margem interna côncava e margem externa convexa. Paraprocto com base notoriamente globosa, desprovido de sinuosidades na porção subapical. Coroa do paraprocto com 6 dentes simples, levemente curvados.



**Figura 26:** Genitália masculina de *Culex (Microculex) neglectus* Sp.3. Gc - gonocoxito, Gs - gonóstilo, dSL - divisão distal do lobo subapical, pSL - divisão proximal do lobo subapical. GC - garra do gonóstilo. Lateral - vista lateral, Medial - vista medial. X-TL - lobos IX tergito. Falósoma: AeS- esclerito do edeago, LP - placa lateral. Proctiger: BP - placa basal. X-Te - X tergito.

**Distribuição:** locais de coleta.

**Material analisado:** 2 Lâminas, 2 G♂. STA-183; FSP-SP47-24.

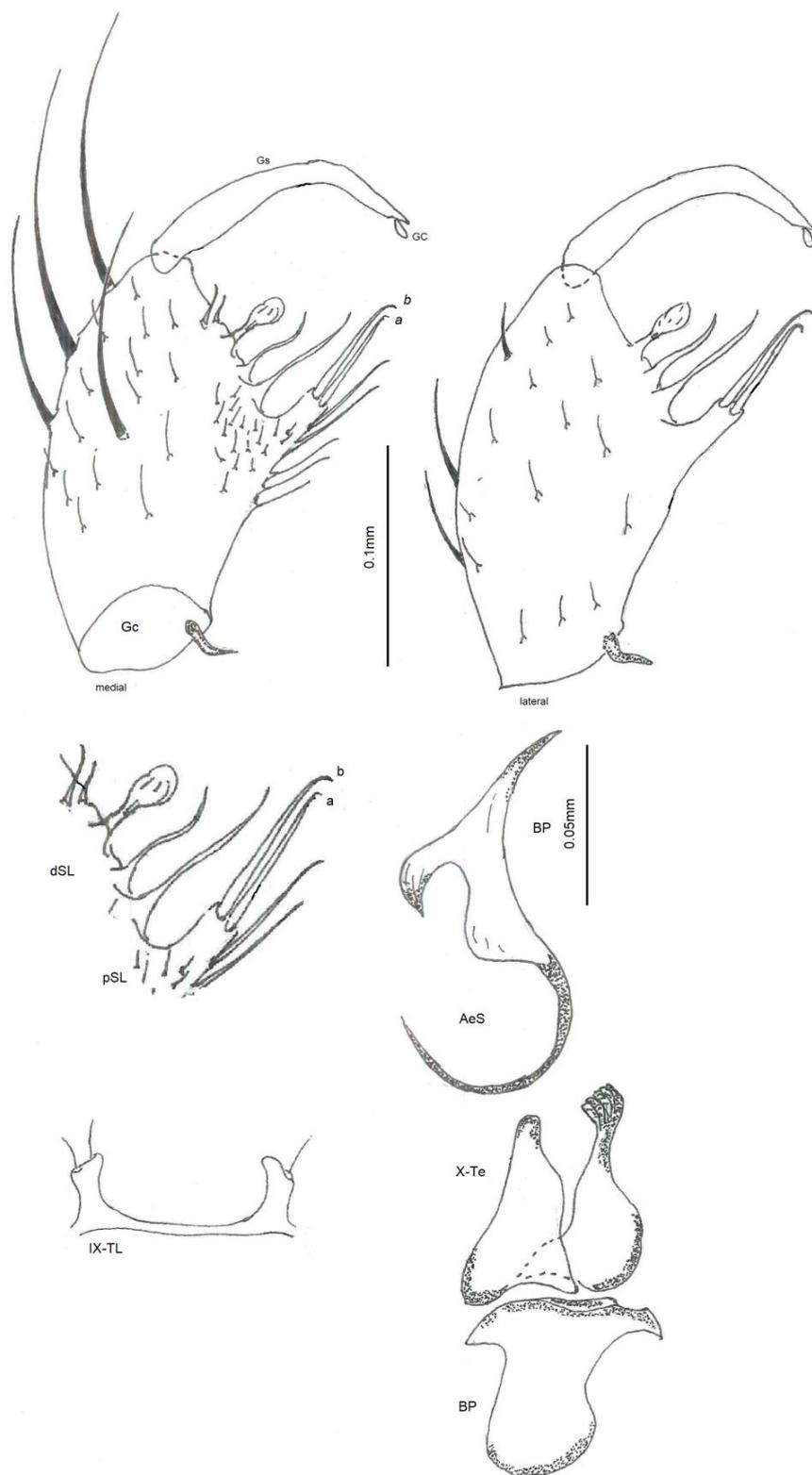
**Diagnose:** Lobos em formato digitiforme, de comprimento equivalente a 3x sua largura basal. Margem interna e externa curvada. Espaço levemente côncavo, sendo entre os lobos à 3x a largura basal destes. Margem interna apresenta lobo subapical com cerda foliar. Cerda foliar com base delgada e desenvolvida. Esclerito do edeago dotado de formação hialina com formato digitiforme na margem interna. Esta, é caracterizada por espiculas, que variam de 2 à 4.

## ***Culex (Microculex) elongatus* Rozeboom & Komp, 1950**

*Culex (Microculex) elongatus*, 1950b: 147 (♂G, ♀, Pe, Le). Localidade-Tipo: Acacias, Meta, Colômbia. Material-Tipo depositado no USNM.

Pecor et al, 2000:213 (Distri. Peru)

**Genitália Masculina (Figura 27).** IX-Tergito: Lobos de aspecto digitiforme, levemente curvos na superfície interna. Cada lobo com perceptível protuberância na margem externa próxima à região subapical dotada de uma cerda fina e simples. Espaço entre os lobos de cerca de 3x a largura basal destes. Gonocoxito: Formato oblongo. Aspecto geral guarda semelhanças com *Cx. neglectus*. Porém, diferentemente, em *Cx. elongatus* o lobo subapical mostra conjunto de cerdas em menor quantidade, sendo apenas 2, onde a mais próxima da base do processo colunar possui maior comprimento. A cerda em formato de folha presente na divisão distal mostra-se isolada. Processo colunar em consonância com o exposto sobre *Cx. neglectus*; apresenta conjunto de cerdas de menor porte, porém, estas menos desenvolvidas, encimado por 2 cerdas desenvolvidas (cerdas *a* e *b*), ambas implantadas no mesmo nível, com *b* discretamente de maior comprimento que *a*, e apresentam curvatura pouco pronunciada na região apical. Margem externa com 2 duas cerdas desenvolvidas. Gonóstilo: Aspecto de arco, afilado. Base sensivelmente dilatada em relação à porção apical. Garra do gonóstilo situada na porção ventral; formato de foliar. Falósoma: Placa lateral apresenta comprimento superior quando comparado ao esclerito do edeago. Placa lateral com processo ventral e processo apical. Processo ventral em formato de garra, fortemente desenvolvido e esclerotizado. Região terminar pontiaguda. Processo apical longo, pontiagudo e curvado. Margem externa de aspecto claramente convexo, desprovido de protuberâncias ou dilatações em toda sua extensão. Esclerito do edeago em formato de gancho, filiforme, esclerotizado. Ângulo de curvatura parabólico. Proctiger: Paraprocto com aspecto delgado; região côncava na margem interna próxima à coroa do paraprocto. X-Tergito com formato triangular, com leves sinuosidades nas superfícies internas e externas. Placa basal com aspecto evidentemente delgado. Região medial e basal sem disparidades importantes em largura.



**Figura 27:** Genitália masculina de *Culex (Microculex) elongatus*. Gc - gonocoxito, Gs - gonóstilo, dSL - divisão distal do lobo subapical, pSL - divisão proximal do lobo subapical. GC - garra do gonóstilo. Lateral - vista lateral, Medial - vista medial. X-TL - lobos IX tergito. Falósoma: AeS- esclerito do edeago, LP - placa lateral. Proctiger: BP - placa basal. X-Te - X-tergito.

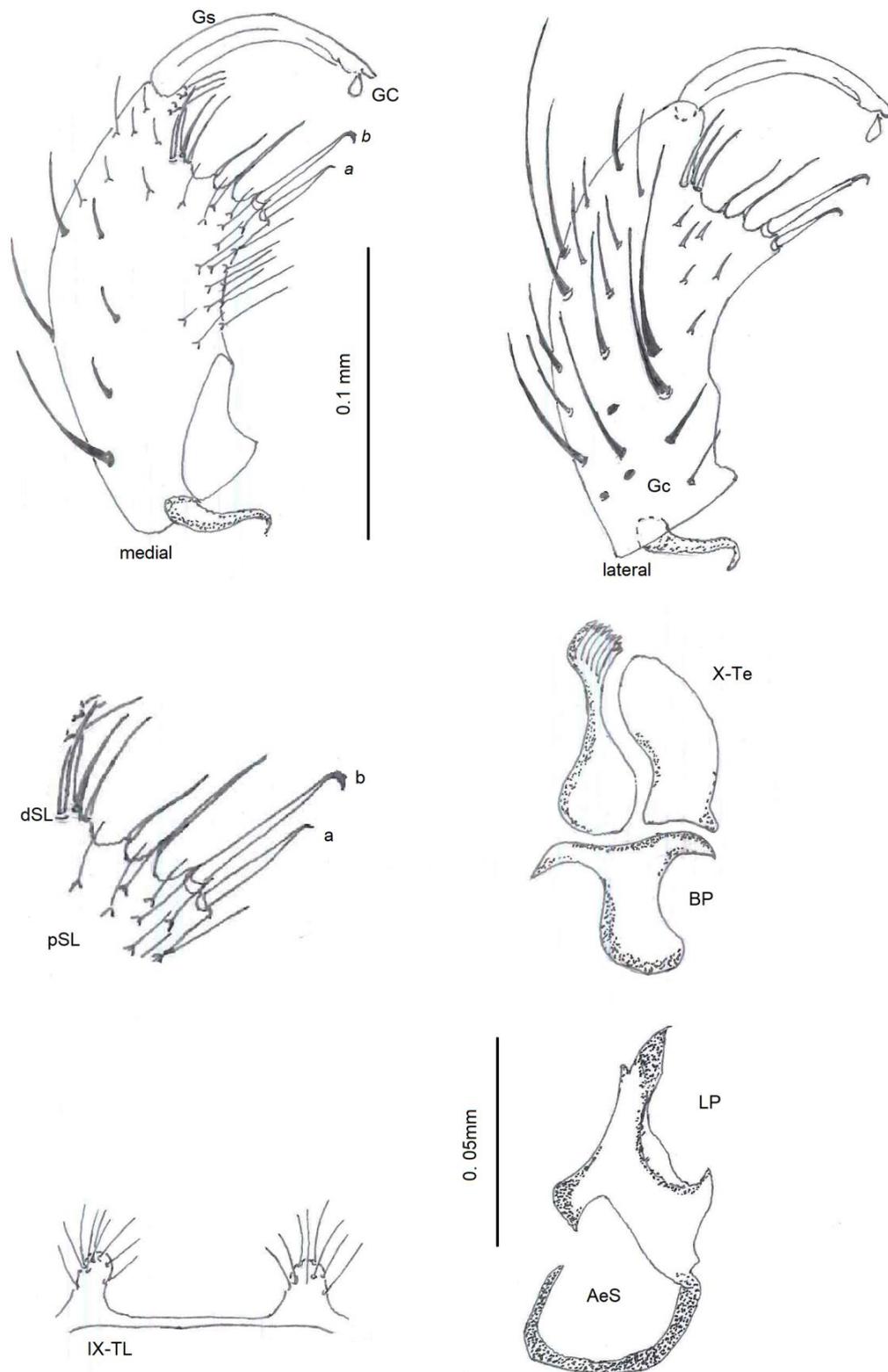
**Distribuição:** Baseado na literatura existente, a presença de *Cx. elongatusé* assinalada ao Peru e Colômbia

**Material examinado:** 6 Lâminas, 6G♂. Sítio Itapõa. FSP-LESP-1220, M. Sato 1981 det; FSP-LESP-1217; FSP-LESP, 1982; FSP-LESP, 1984; FSP-LESP-1222.

**Diagnose:** Divisão distal do lobo subapical mostra conjunto de cerdas reduzido me quantidade, sendo uma, com maior comprimento. A cerda em formato de folha mostra-se isolada. Esclerito do edago com formato de gancho, filiforme, esclerotizado. Ângulo de curvatura parabólico.

## ***Culex (Microculex) sp1.***

**Genitália Masculina.** (Figura 28). IX-Tergito: Lobos pequenos com formato digitiforme; comprimento pouco maior que largura. Região apical com 5 cerdas finas e simples, no geral, de comprimento superior ao mostrado pelo lobo. Espaço entre os lobos de cerca de 3x a largura basal destes. Gonocoxito: Pequeno; aspecto oblongo. Divisão distal do lobo subapical pouco desenvolvido, dotado de 5 cerdas simples, de comprimentos variados, sendo 2 destas tendo cerca do dobro do tamanho das demais. Divisão proximal com processo colunar. Este, curto, de largura superior ao comprimento, encimado por duas cerdas desenvolvidas (cerdas *a* e *b*), ambas retilíneas, inseridas no mesmo nível, dotadas de curvatura na região apical, sendo *b* pouco mais comprida que *a*. Gonóstilo: Em forma de gancho em vista lateral. Possui semelhança estrutural com o observado em *Cx. neglectus* sp1. Garra do gonóstilo em forma de folha, localizado na superfície ventral. Falósoma: Placa lateral e esclerito do edeago com comprimentos distintos, sendo a placa lateral de dimensões ligeiramente superiores. Placa Lateral: apresenta processo ventral, processo dorsal, processo apical e processo lateral. Processo ventral bem desenvolvido e esclerotizado em formato e garra. Região distal afunilada em formato de seta. Processo dorsal discreto, localizado na região subapical da margem interna do processo apical. Processo lateral fortemente desenvolvido e esclerotizado. Esclerito do edeago. Em formato de gancho, quando em vista lateral. Superfície ventral e dorsal sem dilatações ou protuberâncias; inexistência de áreas hialinas; estrutura esclerotizada. Proctiger: Paraprocto alongado; região basal dilatada; região medial afunilada, desprovida de sinuosidades. X-Tergito: Formato delgado. Margem externa curva. Placa Basal: região apical de largura cerca de 3x a equivalente da porção medial e basal.



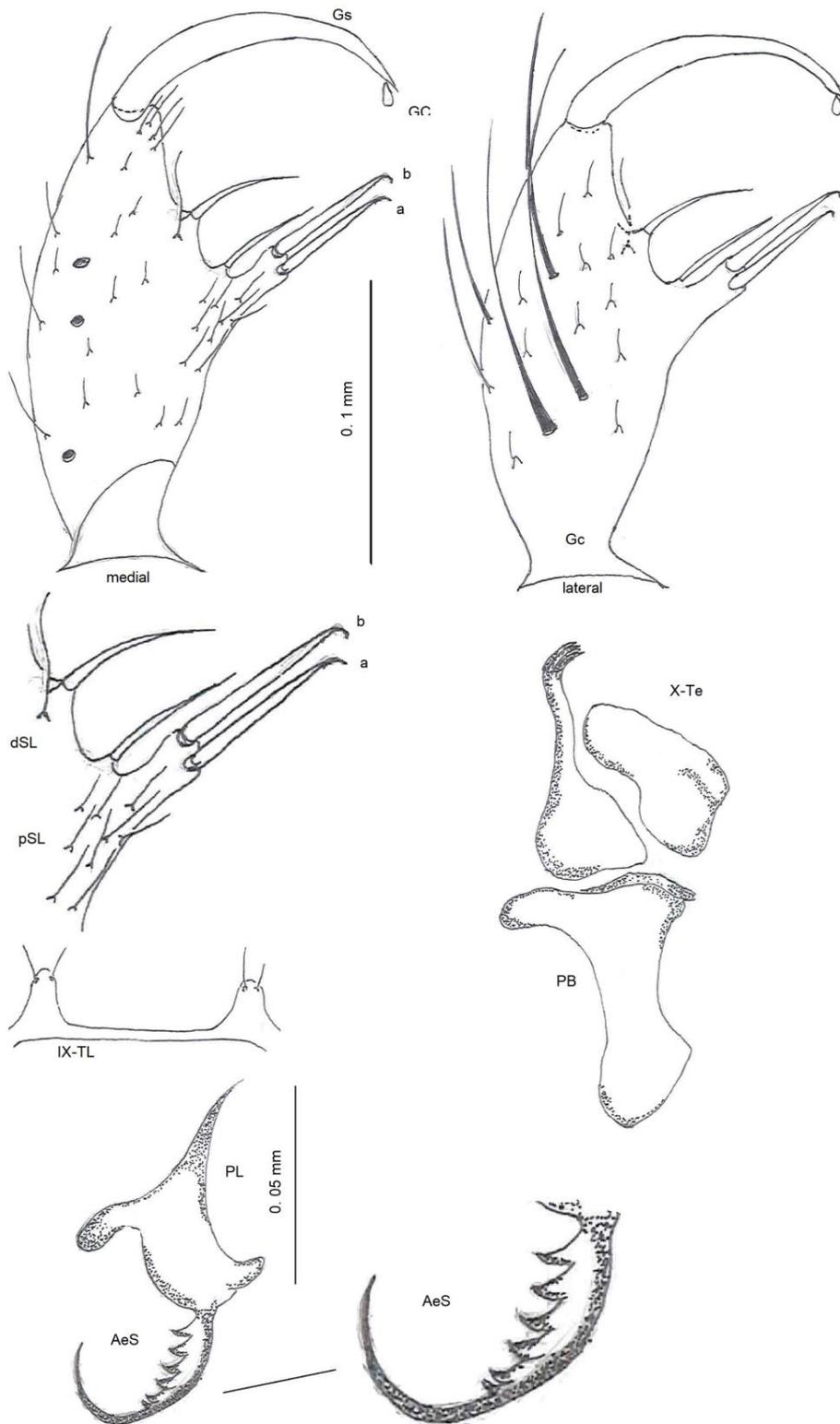
**Figura 28:** Genitália masculina *Culex (Microculex) sp.1*. Gc - gonocoxito, Gs – gonóstilo, dSL – divisão distal do lobo subapical, pSL – divisão proximal do lobo subapical. GC – garra do gonóstilo. Lateral – vista lateral, Medial – vista medial. X-TL – lobos IX tergito. Falósoma: AeS- esclerito do eedeago, LP – placa lateral. Proctiger: BP – placa basal. X-Te – X tergito.

**Material examinado:** 2 Lâminas, 2 G♂. RJ-STA-171; RJ-STA-180.

**Diagnose:** Lobos do IX-tergito pequenos com formato digitiforme; comprimento pouco maior que largura. Divisão distal do lobo subapical dotado com 5 cerdas simples, de comprimentos variados, sendo 2 destas tendo o dobro do tamanho das demais. Processo colunar curto.

## *Culex (Microculex) sp2.*

**Genitália Masculina. (Figura 29).** IX-Tergito: Lobos com aparência digitiforme; com leve afunilamento em direção apical. Largura basal pouco inferior ao comprimento. 2 cerdas finas e retas implantadas apicalmente. Estas com aproximadamente o mesmo comprimento dos lobos. Espaço entre os lobos, no geral, de conformação linear, sem aparência de vale; equivalente a 4x a largura basal. Gonocoxito: Oblongo; estreito. Região medial apresenta maior largura quando comparado com a região apical e basal. 4 cerda hialinas presentes no ápice. Divisão distal do lobo subapical apresenta 2 cerdas simples, de mediano comprimento, sendo uma delas pouco menor. A cerda posicionada de forma mais interna mostra-se mais desenvolvida e com maior curvatura. Divisão proximal com processo colunar evidente. 2 cerdas pouco sinuosas, de comprimento e aspecto semelhantes presentes na superfície mesoventral, próximas à divisão proximal. Processo colunar com 2 cerdas desenvolvidas na porção apical (cerda *a* e *b*). Ambas delgadas e retas, desprovidas de curvatura apical. Cerda *a* em posição pouco inferior em relação à cerda *b*. Base do processo colunar permeado por cerdas de menor tamanho e hialinas. Gonóstilo: Estreito, alongado, curvo. Ângulo de curvatura harmônico, ausência de protuberâncias ao longo da superfície dorsal e ventral. Região apical afunilada. Garra do gonóstilo em forma de folha, posicionada no ápice da superfície ventral. Falósoma: Placa lateral possui semelhanças gerais com as espécies determinadas ao Grupo *Inimitabilis*, apresenta: processo ventral, processo apical e processo lateral. Processo ventral desenvolvido, esclerotizado. Processo apical desenvolvido e pontiagudo. Processo lateral caloso. Esclerito do edeago em forma de gancho quando em vista lateral. Este expõem claramente denticulos que recobrem ao menos metade da superfície dorsal. Ângulo de curvatura pouco harmônico, sendo claramente descendente no sentido distal. Proctiger: Paraprocto alongado. Região basal evidentemente dilatada, com subitido estreitamento em direção ao ápice. Coroa do paraprocto com 4 dentes curvos. X-Tergito mostra-se com formato disforme, tendendo ao ovóide. Placa basal larga e de igual comprimento ao paraprocto. Região medial alongada. Margem interna côncava; região externa convexa.



**Figura 29:** Genitália masculina *Culex (Microculex) Sp2*. Gc - gonocoxito, Gs – gonóstilo, dSL – divisão distal do lobo subapical, pSL – divisão proximal do lobo subapical. GC – garra do gonóstilo. Lateral – vista lateral, Medial – vista medial. X-TL – lobos IX tergito. Falósoma: AeS- esclerito do edeago, LP – placa lateral. Proctiger: BP – placa basal. X-Te – X tergito.

**Material examinado:** 1 Lâmina, 1 G♂. FSP – 1998 (Sem local determinado)

**Diagnose:** Presença 2 cerdas pouco sinuosas, de comprimento e aspecto semelhantes presentes na superfície mesoventral, próximas à divisão proximal. Processo colunar com 2 cerdas desenvolvidas na porção apical (cerda *a* e *b*). Cerda *a* em posição pouco inferior em relação à cerda *b*. Base do processo colunar permeado por cerdas de menor tamanho e hialinas. Lobos do IX-tergito com aparência digitiforme; leve afunilamente em direção apical. Largura basal pouco inferior ao comprimento. 2 cerdas finas e retas implantadas apicalmente. Esclerito do edeago expõem claramente denticulos que recobrem ao menos metade da superfície dorsal.

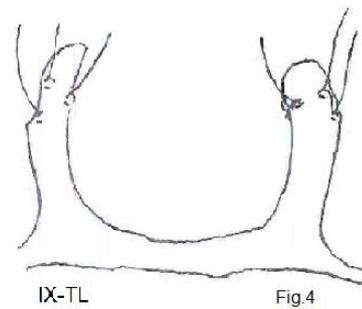
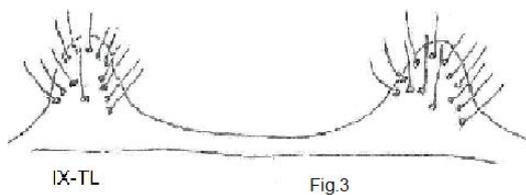
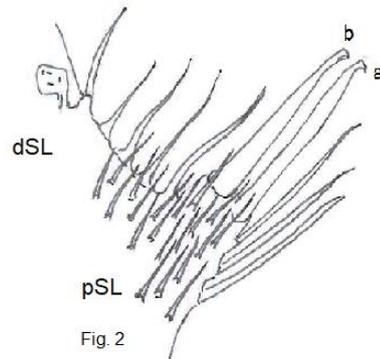
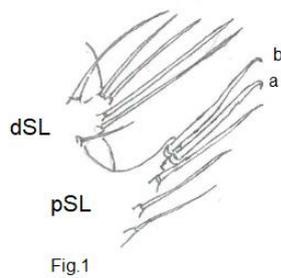
A seguir é apresentada uma proposta de chave dicotômica ilustrada para as espécies de *Culex* (*Microculex*) que puderam ser investigadas neste estudo.

**Chave de identificação.**

**Genitálias masculinas**

1. Divisão distal do lobo subapical do gonocoxito (dSL) em forma tuberosa (Fig. 1); Lobos do IX-tergito (IX-TL) com formato monticular que varia em altura ou arredondado, onde o comprimento não se mostra superior à largura (Fig.2).....2

Divisão distal do lobo subapical do gonocoxito (dSL) em formato não tuberoso, percorrendo considerável área da região mesoventral podendo apresentar amplo conjunto de cerdas ou cerdas com apêcto foliar (Fig.3). Lobos do IX-tergito (IX-TL) com formato digitiforme, onde o comprimento é evidentemente superior à largura (Fig.4).....10



2. (1) Processo ventral da placa lateral (PL) localizado junto à porção medial desta (PL) (Fig.5); Lobos do IX-tergito (IX-TL) com formato monticular desprovido de ápice afunilado, podendo ser pouco desenvolvido ou arredondado (Fig.6), separados entre si por distância, no geral, inferior a 2x sua largura basal.....3

Processo ventral do esclerito do edeago (AeS) localizado próximo à região apical da placa lateral (LP) (Fig.7); Lobos do IX-Tergito (IX-TL) com formato monticular, onde o ápice é discretamente afunilado; separados entre si por distância correspondendo à 2 ou 3x sua largura basal (Fig.8).....9

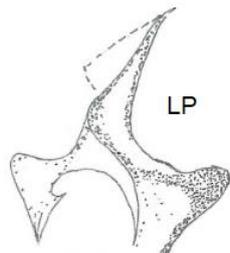


Fig.5

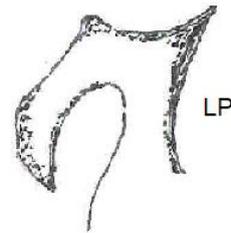
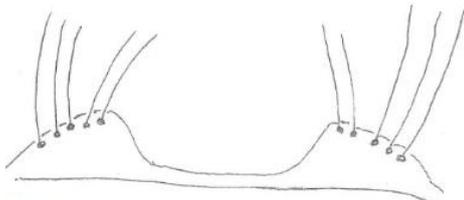
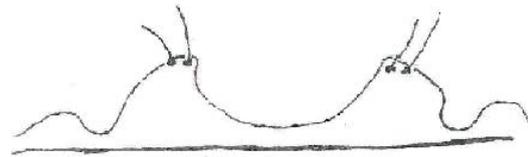


Fig.6



IX-TL

Fig.7

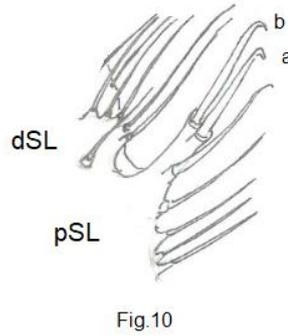
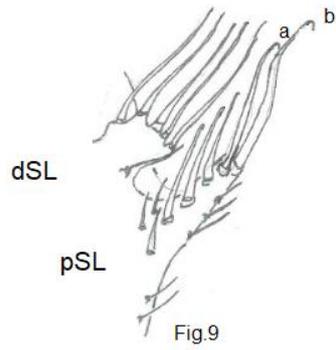


IX-TL

Fig.8

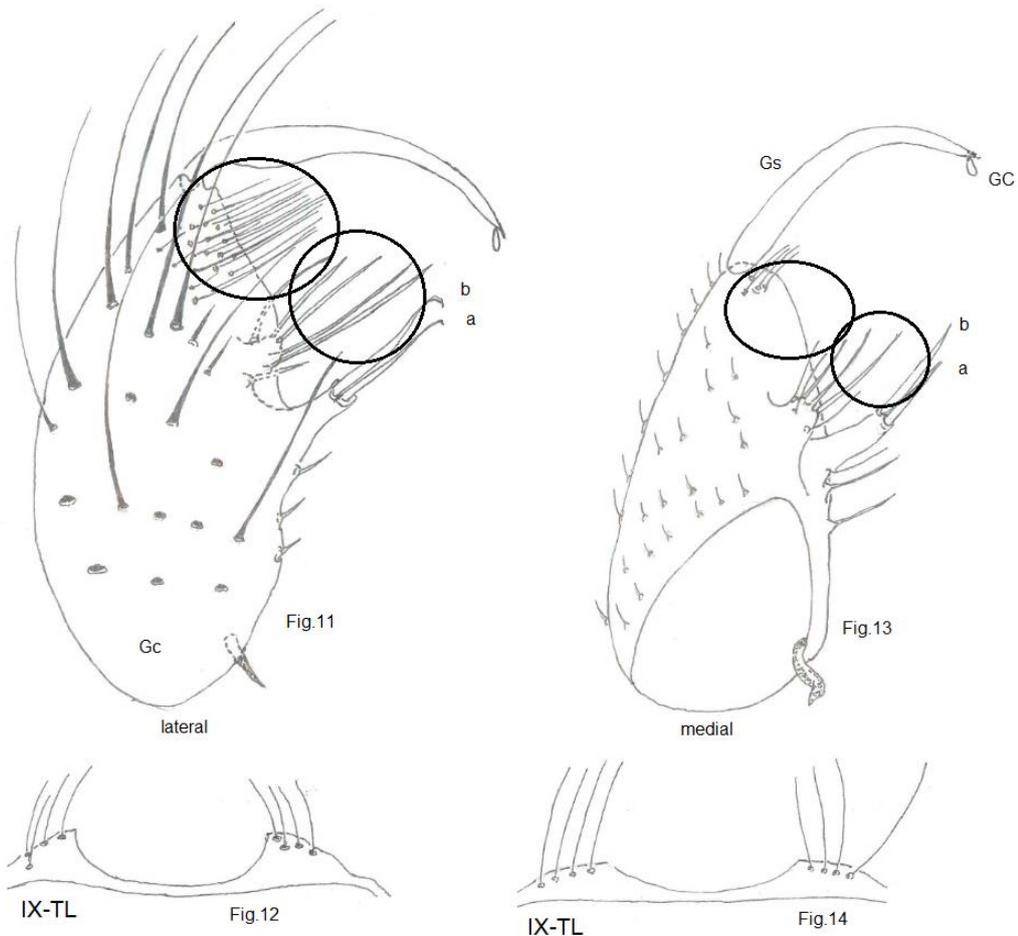
3. (2) Divisão distal do lobo subapical do gonocoxito (dSL) com 5 cerdas desenvolvidas, que podem apresentar o mesmo comprimento ou não (Fig.9).....4

Divisão distal do lobo subapical do gonocoxito (dSL) com 6 cerdas, onde 2 destas são mais desenvolvidas que as demais (Fig. 10).....8



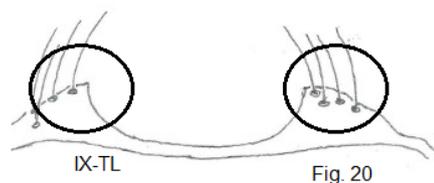
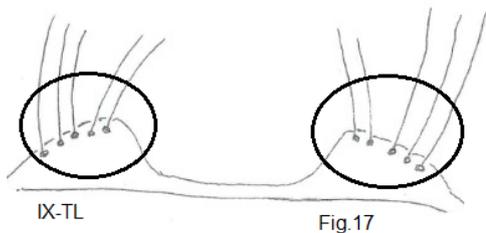
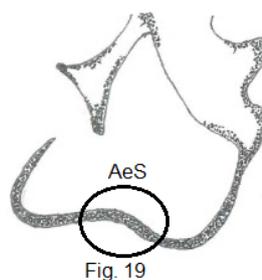
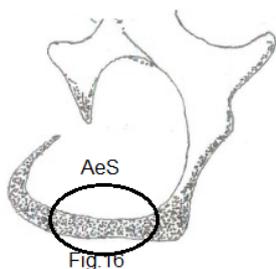
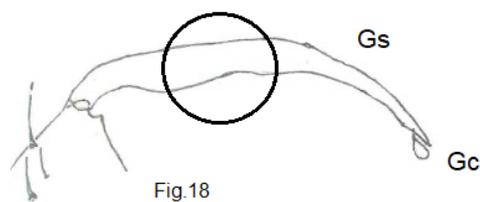
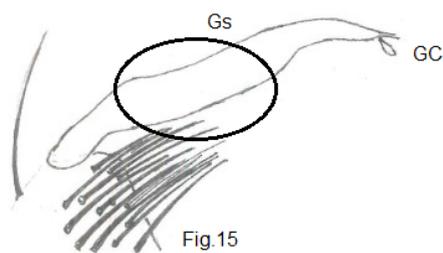
4. (3) Divisão distal do lobo subapical do gonocoxito (dSL) com 5 cerdas de mesmo aspecto e comprimento. Região mesoventral apical do gonocoxito apresenta evidente conjunto expressivo de cerdas (Fig. 11) que em sua totalidade, compartilham o mesmo comprimento; Lobos do IX-tergito (IX-TL) com aspecto monticular, onde o desenvolvimento destes é evidente (Fig.12).....5

Divisão distal do lobo subapical do gonocoxito (dSL) com 5 cerdas de comprimentos singulares, sendo 2 destas, mais desenvolvidas que as demais; Região mesoventral apical do gonocoxito não apresenta evidente conjunto expressivo de cerdas; se presente, é limitado a poucas e esparsas cerdas, que podem variar em comprimento (Fig.13); :Lobos do IX-tergito (Ix-TL) podem ter aspecto arredondado ou monticular, neste caso, seu desenvolvimento é pouco expressivo (Fig. 14).....6



5. (4) Superfície dorsal do gonóstilo com ângulo pouco harmônico, havendo concavidade (Fig. 15); Esclerito do edeago (EaS) desprovido de sinuosidade em sua extensão basal (Fig.16); Lobos do IX-tergito (IX-TL) com margem interna em fomato pontiagudo no ápice; presença de 5 cerdas compridas e simples(Fig. 17).....*pleuristriatus*

Superfície dorsal do gonostilo com ângulo harmônico, desprovido de concavidade (Fig.18); Esclerito do edeago (EaS) não apresenta sinuosidade em sua extensão basal (Fig.19); Lobos do IX-tergito (IX-TL) com margem interna em formato abaulado no ápice; presença de 5 cerdas compridas e simples (Fig. 20).....*albipes*



6. (4) Esclerito do edeago (EaS) em forma e gancho, provido de 2 pontos de curvatura evidentes (Fig.21); Lobos do IX-tergito (IX-TL) em formato monticular, com número de cerdas variando de 4 à 8 (Fig. 22); Gonóstilo com ângulo de curvatura harmônico na superfície ventral; Cerdas *a* e *b* de comprimento inferior ao processo colunar; estas, desprovidas de curvatura na porção apical (Fig, 23).....7

Esclerito do edeago (EaS) em forma de anzol, desprovido de pontos de curvatura (Fig. 24); Lobos do IX-Tergito (IX-TL) com formato abaulado, avantajados; apresentam 6-7 cerdas compridas, finas e retilíneas (Fig.25). Gonóstilo com dilatação na superfície ventral; Cerdas *a* e *b* de comprimento superior ao processo colunar; estas apresentam curvatura na porção apical (Fig.26).....*intermedius*

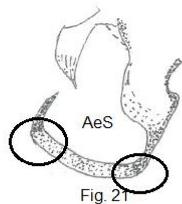


Fig. 21

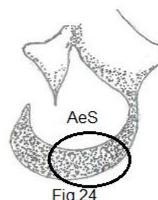
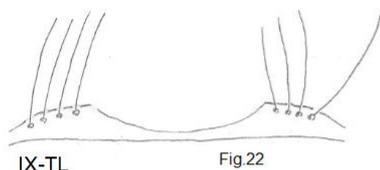
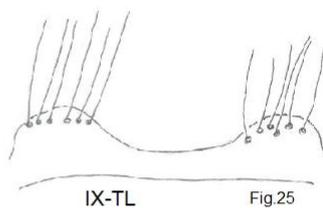


Fig. 24



IX-TL

Fig. 22



IX-TL

Fig. 25

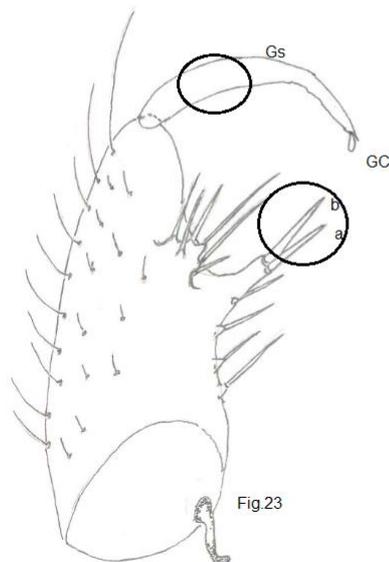


Fig. 23

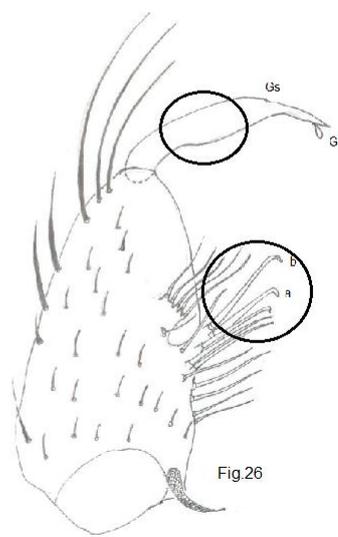
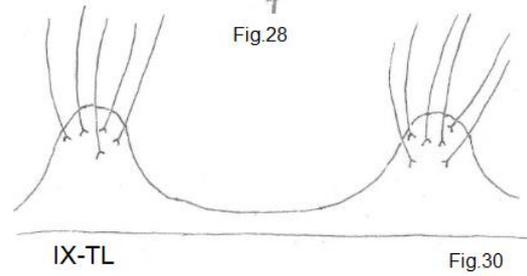
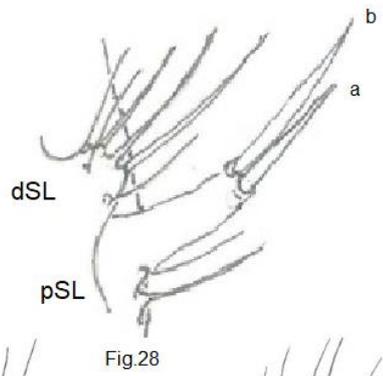
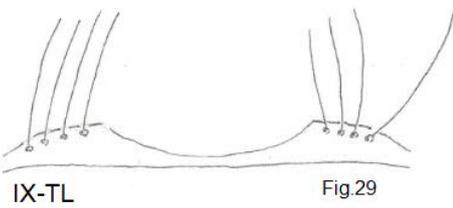
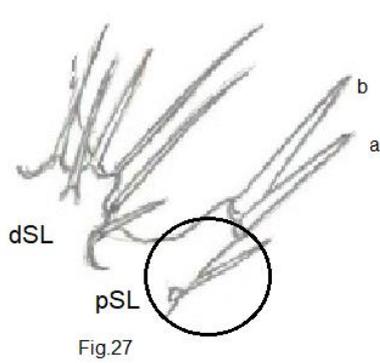


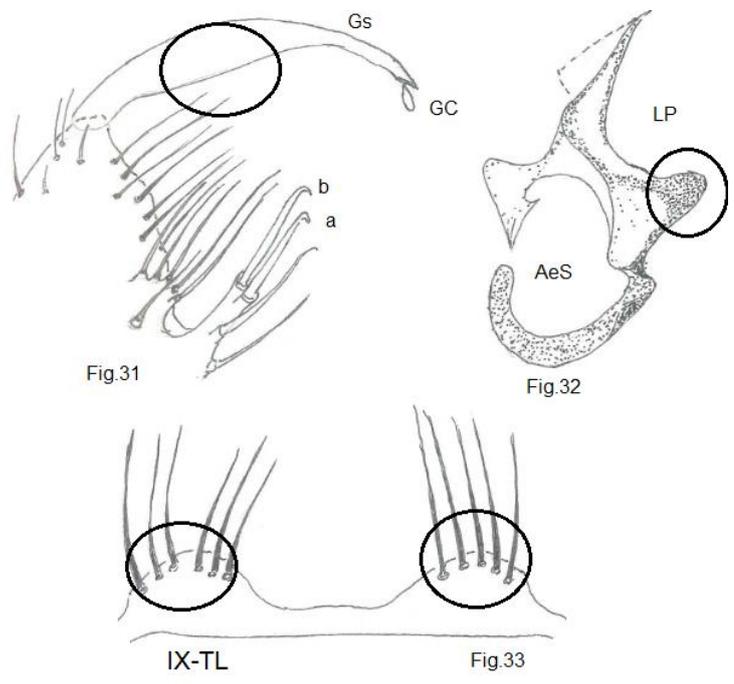
Fig. 26

7. (6) Margem externa do processo colunar com uma cerda fina presente na região medial (Fig.27); lobos do IX-tergito (IX-TL) de aspecto monticular pouco expressivo, sendo a largura superior à altura (Fig.28).....*lanei*

Margem externa do processo colunar sem presença de uma cerda fina na região medial (Fig.29); lobos do IX-tergito (IX-TL) de aspecto moticular expressivo, sendo a altura igual, ou mesmo superior à largura (Fig.30).....*aureus*



8 (3) Base do processo colunar com 2 cerdas delgadas e compridas; superfície ventral do gonóstilo (Gs) apresenta dilatação evidente em sua extensão (Fig. 31). Esclerito do edeago em formato de anzol em vista lateral; processo lateral desenvolvido e caloso (Fig.32). Lobos do IX-tergito (IX-TL) em formato abaulado com 6 cerdas compridas, simples e retilíneas (Fig.33).....*davisi*.



9 (2) Divisão distal do lobo subapical do gonocoxito (dSL) apresenta 7 cerdas; destas, 4 são maiores, de comprimento semelhante, posicionadas na porção apical (Fig. 34); esclerito do edeago (EaS) semelhante a anzol, com porção apical sem curvatura; porção hialina na região medial; área de junção à placa lateral mostra-se fina (Fig. 35); lobos do IX-tergito (IX-TL) em forma monticular, sendo a altura superior à largura basal (Fig. 36).....*worontzowi*

Divisão distal do lobo subapical do gonocoxito (dSL) apresenta 5 cerdas; destas, 3 são maiores que as demais, posicionadas de maneira homogênea nas regiões apical e basal (Fig. 37); esclerito do edeago (EaS) semelhante a anzol, com porção apical curvada ventralmente; ausência de porção hialina na região medial: área de junção à placa lateral (PL) mostra-se robusta (Fig. 38); lobos do IX-tergito (IX-TL) em forma monticular, sendo a altura inferior à largura basal (Fig.39).....*reducens*

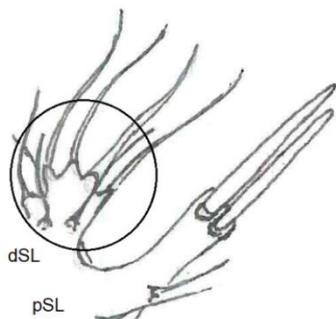


Fig.34

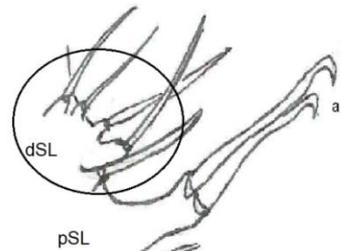


Fig.37

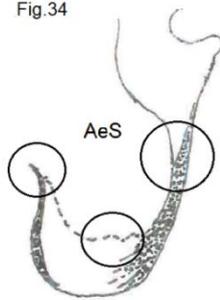


Fig.35

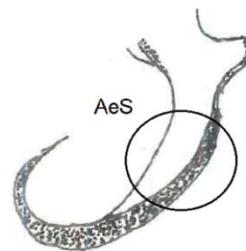


Fig.38

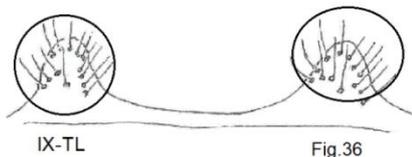


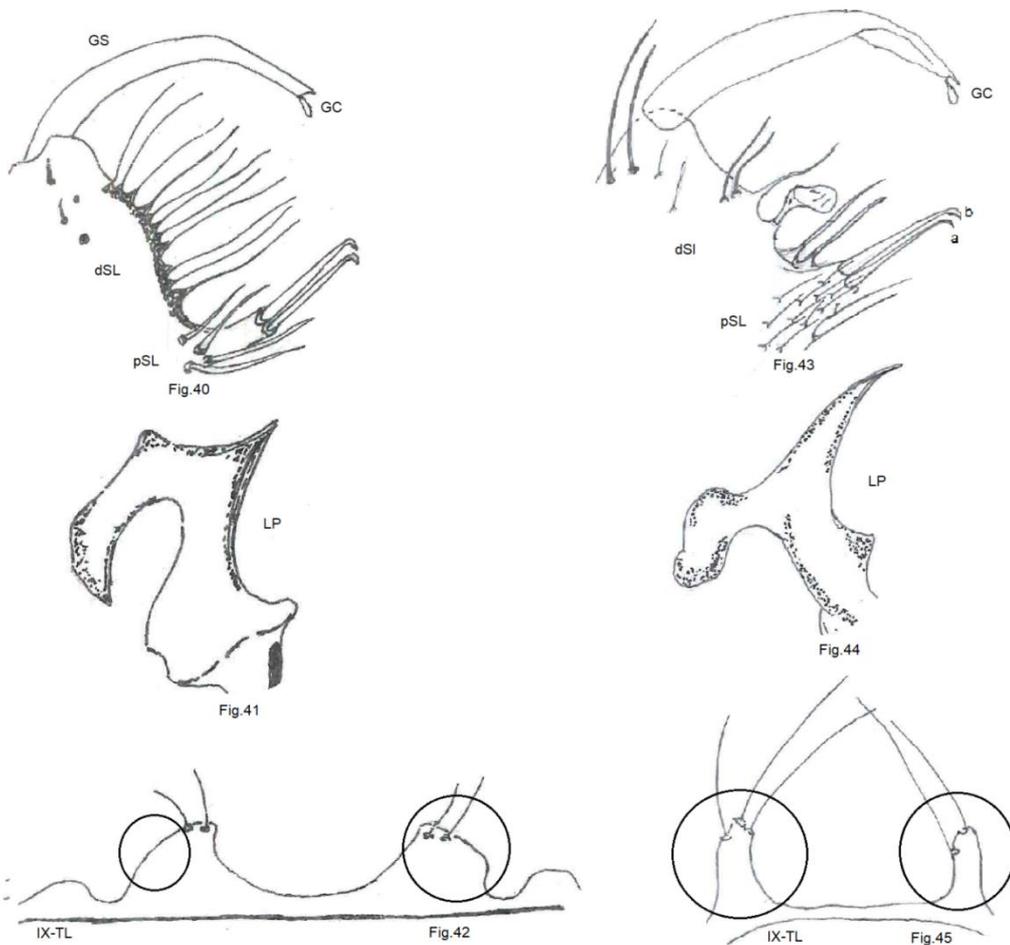
Fig.36



Fig.39

10 (1). Presença de amplo conjunto de cerdas compridas e retilíneas na divisão distal do lobo subapical (dSL) do gonocoxito. Estas podem preencher toda a extensão da estrutura ou limitar-se à região apical (Fig. 40); processo ventral da placa lateral (LP) localizado na região apical desta (Fig. 41); lobos do IX-tergito com formato tuberoso, geralmente a margem externa se mostra curva (Fig. 42).....**11**

Presença de poucas cerdas na divisão distal do lobo subapical do gonocoxito. Estas são no geral robustas, podendo mostra-se lanceoladas ou em formato foliar (Fig. 43); processo ventral da placa lateral localizado na região medial desta (Fig. 44); lobos do IX-tergito em formato digitiforme sem clara discrepância morfológica entre as margens externa e interna (Fig. 45).....13



- 11 (10) Conjunto de cerdas compridas e retilíneas concentradas à região apical da divisão distal do lobo subapical do gonocoxito (dSL) permanecendo extensa área glabra inferior (Fig.46)..... *dubitans*

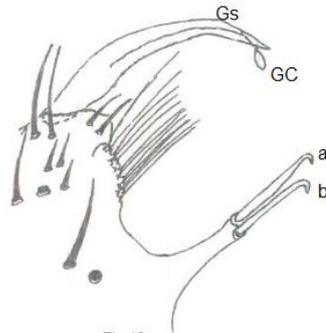


Fig.46

- Conjunto de cerdas compridas e retilíneas que percorrem toda a extensão da divisão distal do lobo subapical do gonocoxito, não permanecendo área glabra (Fig. 47).....12

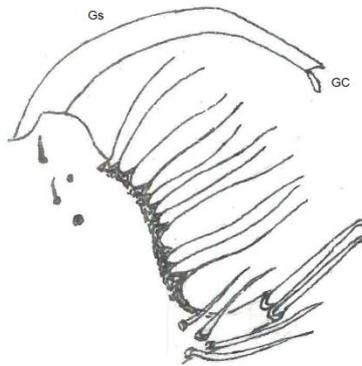
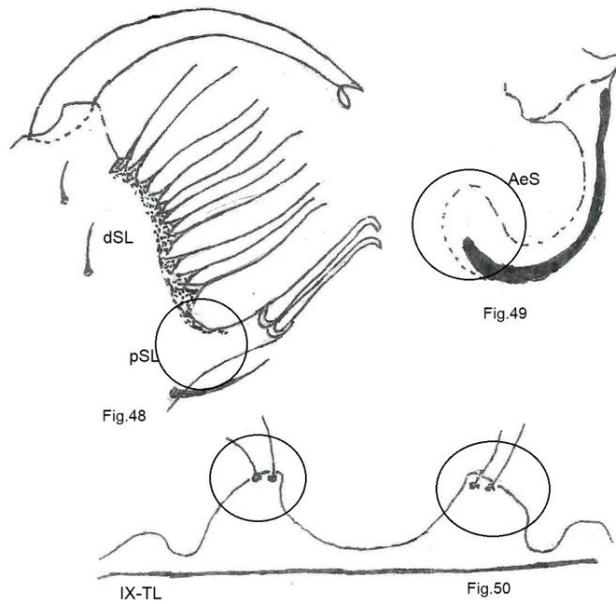
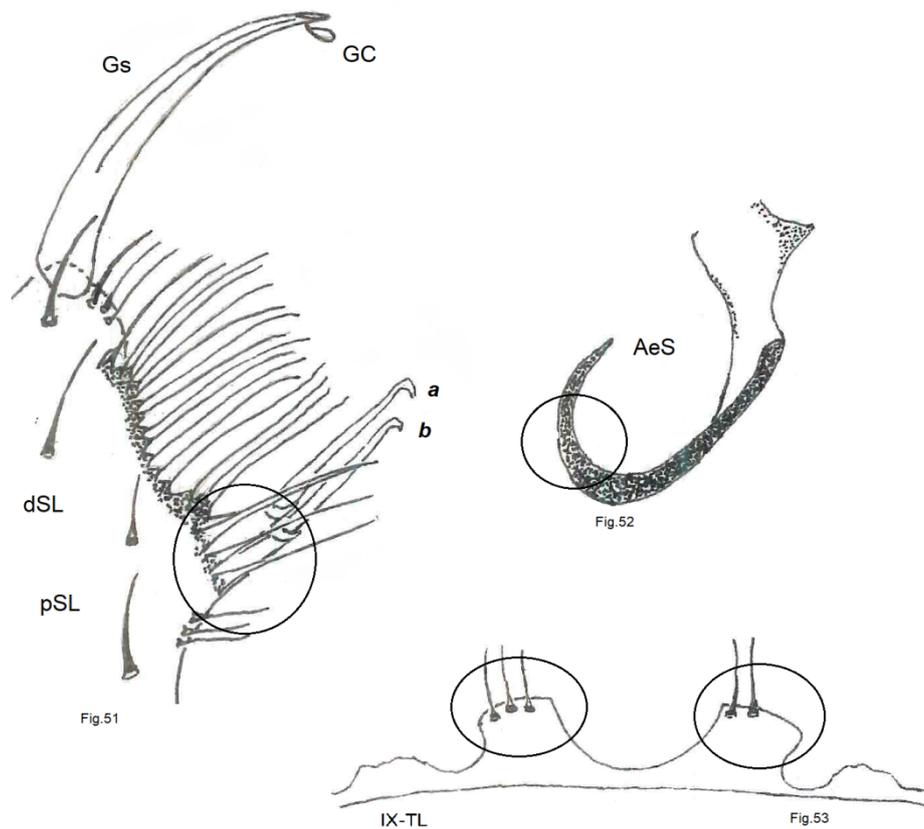


Fig.47

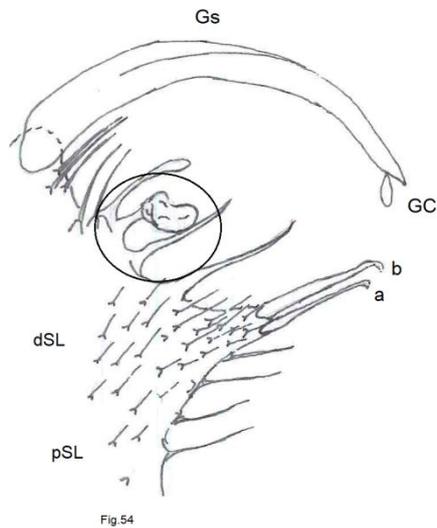
12 (11) Extensão do conjunto de cerdas presentes na divisão distal do lobo subapical (dSL) do gonocoxito não transpassa a divisão proximal (pSL) (Fig. 48); esclerito do edeago com formações hialinas presentes; região terminal abaulada e hialina (Fig.49); lobos do IX-tergito (IX-TL) podendo apresentar margem externa curva, com presença de 2 cerdas finas na região (Fig. 50.....imitator



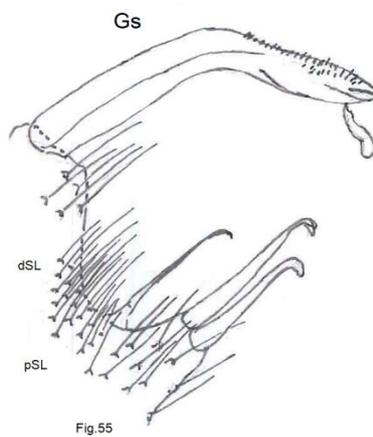
Extensão do conjunto de cerdas presentes na divisão distal do lobo subapical do gonocoxito (dSL) transpassa a divisão proximal (pSL) (Fig. 51); esclerito do edeago sem formações hialinas presentes, sendo evidente apenas a esclerotização da estrutura; região terminal pontiaguda (Fig.52); lobos do IX-tergito podendo apresentar margem externa rombosa, com presença de 2 a 3 cerdas na região apical (Fig. 53).....*retrosus*



- 13 (10) Presença de cerda com aspecto foliar na divisão distal do lobo subapical do gonocoxito (dSL) (Fig. 54).....14



- Ausência de cerda com aspecto foliar na divisão distal do lobo subapical do gonocoxito (dSL) (Fig. 55).....21



14 (13) Cerda com formato foliar localizada na porção apical da divisão distal do lobo subapical do gonocoxito (dSL), sem presença de cerdas delgadas localizadas de forma superior à esta; conjunto de numerosas cerdas retilíneas ao longo da extensão da divisão distal (Fig. 56).....15

Cerda com formato foliar localizada na porção medial da divisão distal do lobo subapical do gonocoxito (dSL), com presença de cerdas delgadas localizadas de forma superior à esta; conjunto de poucas cerdas retilíneas ao longo da extensão da divisão distal (Fig. 57).....18

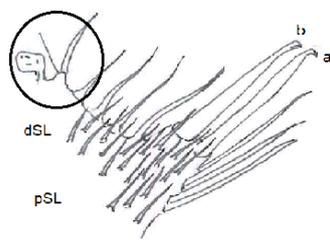


Fig.56

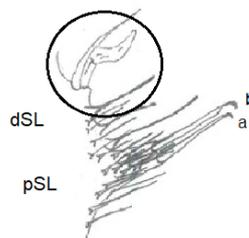
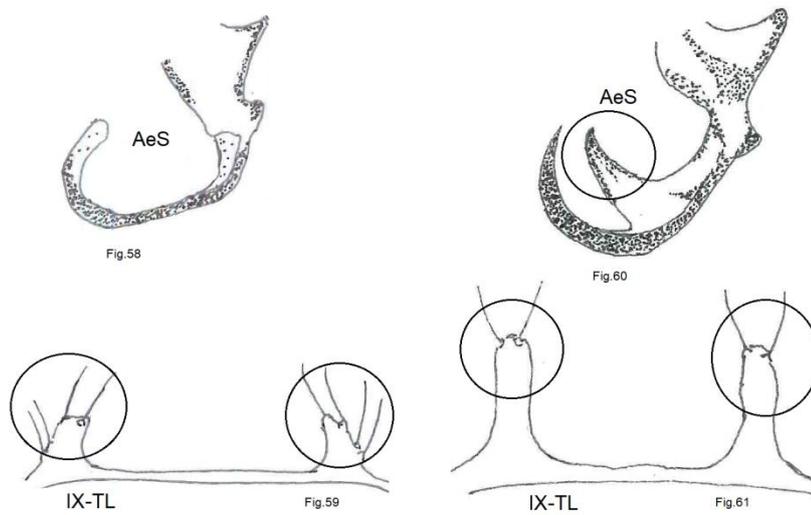


Fig.57

15 Esclerito do edeago (EaS) em forma de gancho quando em vista lateral, desprovido de formações hialinas (Fig. 58); lobos do IX-tergito (IX-TL) em formato digitiforme, sendo a altura e o comprimento equivalentes; (Fig.59).....*neglectus*

Esclerito do edeago (EaS) com evidente formação hialina interna. Esta apresenta região apical pontiaguda (Fig.60); lobos do IX-tergito (IX-TL) em formato digitiforme, sendo a altura superior à largura (Fig.61).....16



16 (15) Cerda foliar localizada no ápice da divisão distal do gonocoxito (dSL) apresenta região basal fina, diferindo da região apical (Fig. 62); formação hialina interna ao esclerito do edeago com ápice liso (Fig. 63); lobos do IX-tergito com altura equivalente a 2 - 3x a largura basal (Fig.64).....17

Cerda foliar localizada no ápice da divisão distal do gonocoxito (dSL) apresenta região basal desenvolvida, sendo pouco singular à região apical (Fig.65); formação hialina interna ao esclerito do edeago com ápice provido de cristas (Fig.66); lobos do IX-tergito com altura equivalente a 4x a largura basal (Fig. 67).....*neglectus* Sp. 3

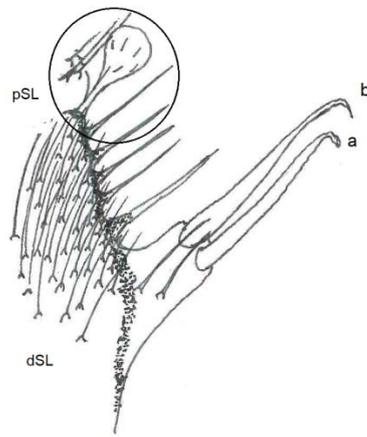


Fig.62

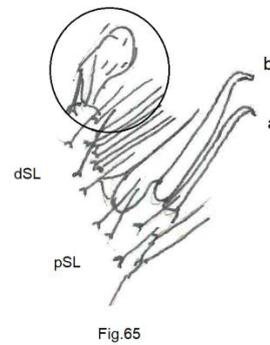


Fig.65

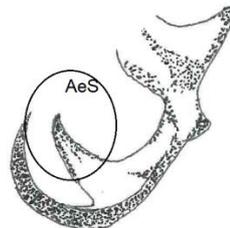


Fig.63

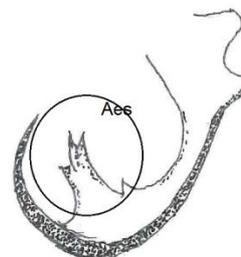


Fig.66

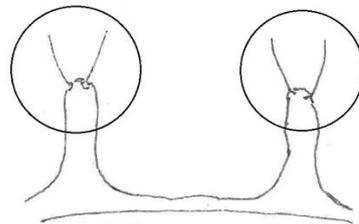


Fig.64

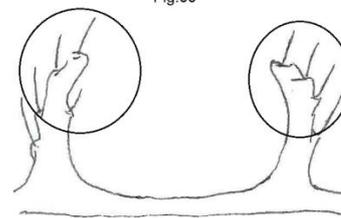
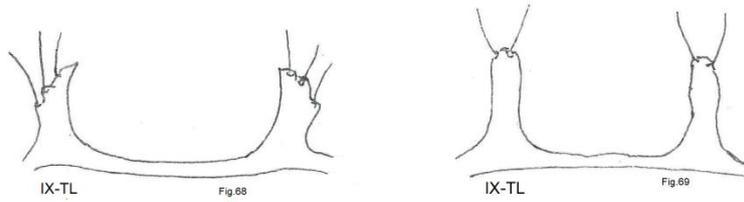


Fig.67

**17** Lobos do IX-tergito (IX-TL) apresentam altura equivalente a 2x a largura basal; margem externa ovalada com presença de 3 cerdas finas (Fig. 68).....*neglectus* Sp.1

**18**

Lobos do IX-tergito (IX-TL) apresenta altura equivalente a 3x a largura basal; margem externa reta; presença de 2 cerdas finas na porção apical (Fig. 69).....*neglectus* Sp2



19 Cerda foliar presente na divisão distal do lobo subapical do gonocoxito (dSL) inserida formação tuberosa evidente (Fig. 70); processo ventral da placa lateral (PL) projetando-se de forma perpendicular culminando em área ventral calosa (Fig. 71).....19

Cerda foliar presente na divisão distal do lobo subapical do gonocoxito (dSL) inserida em formação pouco evidente ou ausente (Fig.72); processo ventral da placa lateral (PL) não projetada de forma perpendicular, culminando em área ventral pontiaguda (Fig. 73).....20

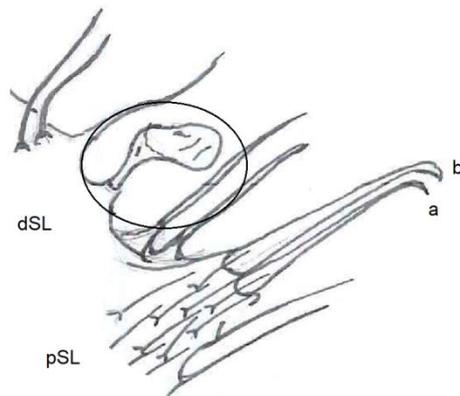


Fig. 70

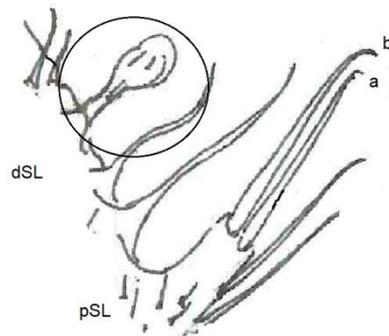


Fig.72

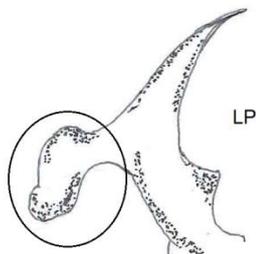


Fig.71

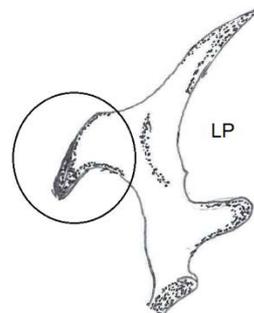
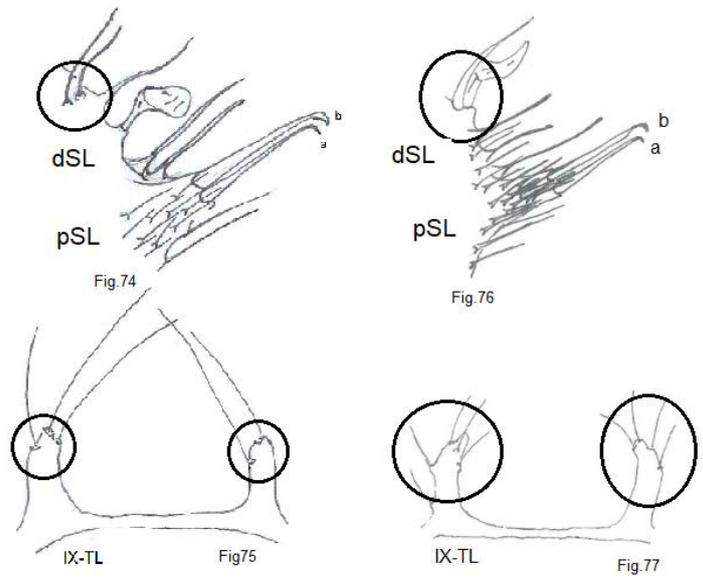


Fig.73

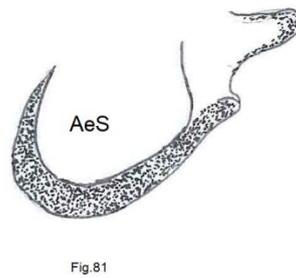
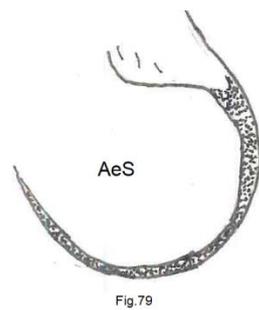
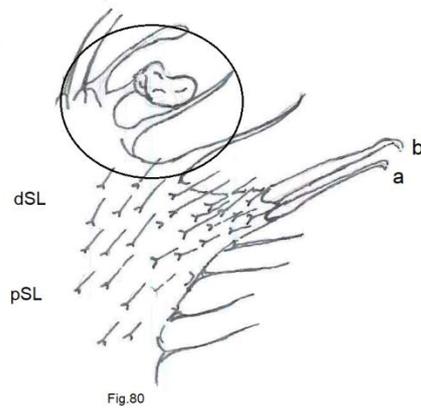
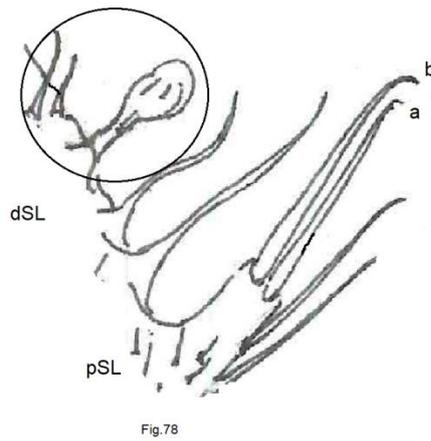
20 Cerda presente na divisão distal do gonocoxito (dSL) apresenta 3 cerdas posicionadas de maneira superior; destas, 2 estão ladeadas e são semelhantes em comprimento e aspecto. Processo colunar da divisão proximal (pSL) onde a basea presenta maior largura que o ápice (Fig. 74); lobos do IX-tergito (IX-TL) em formato digitiforme, com largura basal equivalente a 2x a altura; ao menos 2 cerdas finas e proporcionalmente longas entre a região apical e da margem interna (Fig. 75).....*inimitabilis*

Cerda presente na divisão dista do gonocoxito (dSL) apresenta 1 cerda posicionada de maneir superior. Processo colunar da divisão proximal (pSL) onde a base apresenta largura semelhante ao ápice (Fig.76); lobos do IX-tergito (IX-TL) em formato digitiforme, com largura basal eaquivalente a 3x a altura; 3 a 5 cerdas finas e proporcionalmente curtas dispostas nas regiões apical, medial e da margem externa de forma homogênea (Fig. 77).....*fuscatus*



20 Cerda foliar presente na divisão distal do lobo subapical do gonocoxito (dSL) com aspecto retilíneo; 2 cerdas pouco desenvolvidas localizadas superiores á cerda foliar; processo colunar da divisão proximal bem destacado, onde a base apresenta a mesma largura do ápice (Fig.78); esclerito do edeago fino e com ângulo de curvatura harmônico (Fig. 79).....*elongatus*

Cerda foliar presente na divisão distal do lobo subapical do gonocoxito (dSL) com aspecto curvo (Fig.80); processo colunar da divisão proximal com forma tuberosa, onde a base apresenta largura superior ao ápice; esclerito do edeago espesso, com ângulo de curvatura mais pronunciado partir o 1/3 final (Fig.81).....*aphylactus*



21 (13) Esclerito do edeago (AeS) em forma de gancho com presença de espiculosidades ao menos em metade da superfície dorsal (Fig. 82).....*Microculex* Sp1

Esclerito do edeago (AeS) em forma de gancho sem presença de espiculosidades ao longo da superfície dorsal (Fig. 83).....22

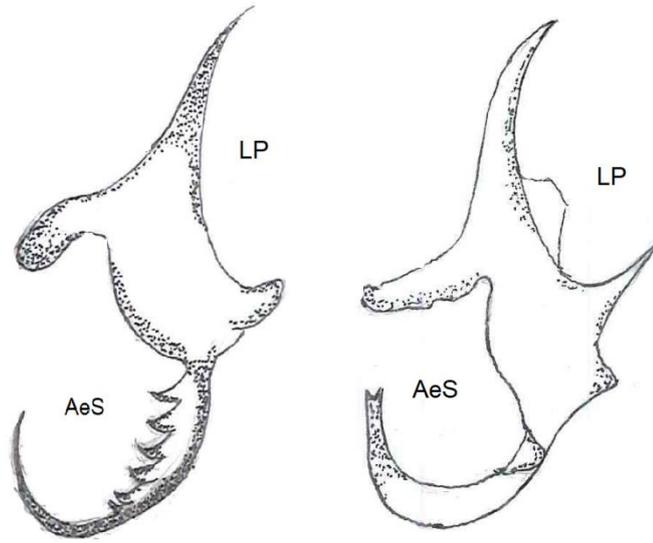


Fig.82

Fig.83

22 (21) Divisão distal do lobo subapical do gonocoxito com 1 cerda desenvolvida e retilínea (Fig. 84); Lobos do IX- tergito digitiformes, bem desenvolvidos; altura equivalente a 4x a largura basal (Fig. 85).....*hedys*

Divisão distal do lobo subapical do gonocoxito com 2 cerdas, sendo 1 mais desenvolvida (Fig. 86); Lobos do IX- tergito em formato monticular; altura pouco mais que a largura basal (Fig. 87).....*Microculex* sp2

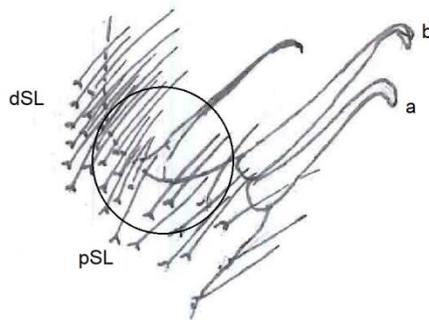


Fig.84

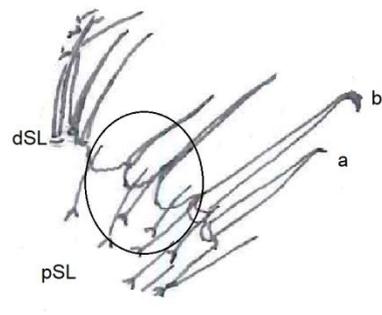
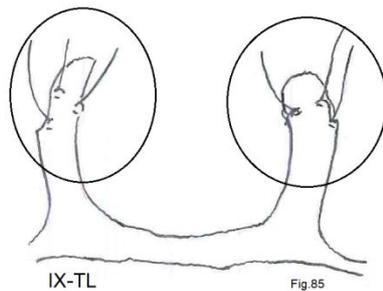
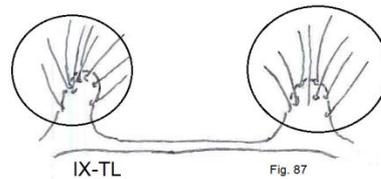


Fig.86



IX-TL

Fig.85



IX-TL

Fig. 87

## 6. Discussão

Dentre os muitos trabalhos que expõem as lacunas a serem investigadas a respeito do subgênero *Microculex*, Harbach (2011) salienta a falta de informações, seja de cunho epidemiológico quanto taxonômico que permia este grupo de culicídeos. Com o intuito de investigar as múltiplas facetas inerentes à dinâmica comparativa entre espécies, este estudo propôs a investigação das espécies de *Microculex* utilizando várias abordagens: a morfometria geométrica alar; o estudo ecológico sobre a dispersão destas espécies na cobertura vegetal, e por fim, a redescrição morfológica das genitálias masculinas e concepção de chave dicotômica ilustrada. Visto de forma isolada ou reunida, os resultados provenientes registram importantes achados.

### **Morfometria geométrica alar.**

O uso da morfometria geométrica alar como ferramenta acessória à taxonomia clássica, em consonância a estudos anteriores, mostrou eficaz na distinção entre fêmeas de espécies de culicídeos semelhantes (Lorenz et al., 2012; Wilke et al., 2016; Souza et al., 2020). As espécies direcionadas ao estudo morfométrico: *Cx. (Mcx.) pleuristriatus*; *Cx. (Mcx.) albipes*; *Cx. (Mcx.) lanei*; *Cx. (Mcx.) imitator* e *Cx. (Mcx.) worontzowi* são documentadas com frequência em muitos estudos de cunho faunístico e epidemiológicos, e não raro, sua identificação mostra-se dificultosa (Ceretti-Júnior et al., 2015; Bangher & Stein, 2017; Ortega-Morales et al, 2018; Santos et al, 2019). A plena distinção entre as espécies *Cx. (Mcx.) imitator* e *Cx. (Mcx.) worontzowi* tanto nas análises de CVA e Teste de reclassificação atestam as diferenças morfológicas observadas nos espécimes, como documentadas por Lane & Whitman (1951). Estes autores reinteram que a presença de cerdas brancas no mesonoto de *Cx. imitator* e sua ausência em *Cx. worontzowi*, bem como os anéis brancos presentes nos tarsômeros de *Cx. imitator* e ausentes em *Cx. worontzowi* são estruturas facilmente observadas durante o processo de identificação. No entanto, ao se manipular espécimes advindos de coleta de campo, onde a própria técnica ou transporte pode acarretar importantes danos ao material, o uso acessório da morfometria pode vir a tornar o procedimento de identificação menos passivo de equivocados.

Ao que tange os espécimes alocados na Série Pleuristriatus, a capacidade de uso da morfometria geométrica alar pode auxiliar de forma consideravelmente mais vantajosa, visto que ao contrário do mencionado no caso de *Cx. imitator* e *Cx.*

*worontzowi*, as espécies desta Série apresentam similaridades sobrepostas que podem tornar a procedimento de identificação das fêmeas pela taxonomia clássica inviável. Sob esta ótica, o resultado da CVA, que apresenta as três espécies aqui estudadas: *Cx. (Mcx.) pleuristriatus*; *Cx. (Mcx.) albipes* e *Cx. (Mcx.) lanei* trouxe importante contribuição para o estudo taxonômico deste grupo.

A variação observada no formato alar nas espécies, mesmo no caso das espécies que são assinaladas como idênticas (em se tratando de fêmeas), a exemplo de *Cx. (Mcx.) pleuristriatus* e *Cx. (Mcx.) albipes*, trás a hipótese de ocorrência de divergência evolutiva recente, como proposto por Gómes & Correa (2017). Neste panorama, espécies evolutivamente próximas não apresentam grande disparidade entre seus formatos alares.

Embora o uso de amostras reduzidas seja pouco indicado para estudos de cunho populacionais (Adams et al., 2012) a posição de utilizar volume baixo de amostras no caso das espécies *Cx. (Mcx.) lanei*, com 7 indivíduos e *Cx. (Mcx.) albipes* com 10 indivíduos é pautada pela existência de clara variação existente nas espécies (de acordo com os testes promovidos). Diante deste cenário, o uso de poucos indivíduos mostra-se justificável (Drake & Klingenberg, 2010). Muito embora os mecanismos que determinam a variação morfológica nas veias alares não sejam plenamente esclarecidos, é provável que adaptações oriundas de comportamento ou ecologia espécie-específica estejam envolvidas (Combes & Daniel, 2003). Apesar das hipóteses existentes, ainda não se pode afirmar quais seriam os genes envolvidos no processo de evolutivo que resulta na alteração dos formatos alares. No entanto, torna-se coerente assumir que o fato de alterações drásticas na conformação das veias alares pode afetar diretamente o padrão de voo dos mosquitos.

Como reportado por estudos anteriores, as espécies pertencentes ao subgênero *Microculex* são, no geral, encontradas em ambientes preservados (Harbach, 2011). Dentre estas espécies, poucas são encontradas em localidades afetadas pelas ações antrópicas (Ceretti-Junior et al., 2015), o que sugere que a ação humana tenha direta influência na distribuição destas espécies. No entanto, os espécimes utilizados neste estudo foram, em grande parte, coletados em ambiente alterado, o que indica a existência de um processo de adaptação do meio silvestre para o impactado. Importante mencionar a carência de estudos que busquem elucidar o papel de *Microculex* como vetores de agentes etiológicos para humanos ou animais. Este hiato de conhecimento pode ser explicado propriamente pelo reduzido número de taxonomistas conhecedores

de suas características, que por sua vez, tornam o estudo de hábito alimentar e capacidade vetorial inviáveis. Neste sentido, os resultados positivos obtidos pela morfometria geométrica alar neste estudo, abre a possibilidade de expansão do uso da técnica para as outras espécies do subgênero.

### **Distribuição em cobertura vegetal.**

O estudo proposto que visava investigar a hipótese de padrão distributivo de *Microculex* nos gradientes de cobertura vegetal obteve êxito em demonstrar os possíveis efeitos adaptativos que a ação humana pode exercer no comportamento destes culicídeos. É sabido que o impacto antropogênico no ambiente pode afetar as populações de mosquitos de maneira a proporcionar diferentes condições para a realização de sua reprodução; facilitando a introdução e permanência de espécies exóticas ou promovendo a adaptação de espécies nativas. Diante deste cenário, o aumento da possibilidade de transmissão de patógenos é um agravo que carece de atenção (Amerasinghe & Ariyasena, 1990; Chang et al., 1997; Lindblade et al., 2000; Norris, 2004; Matthys et al., 2006; Vanambeke et al., 2007; Abelha-Medrano et al., 2015; Carvalho et al., 2017).

A hipótese de adaptação existente em mosquitos nativos à fauna brasileira foi aventada pelos estudos de Forattini et al. (1989, 1997), estes tendo como alvo investigativos *Aedes scapularis* e *Culex (Melanoconion) ribeirensis*. No entanto, torna-se preponderante mencionar que a observação deste fenômeno adaptativo seja melhor explicitado em vetores de agentes etiológicos notoriamente disseminados, a exemplo: *Aedes albopictus* (Ayllon et al., 2018), *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*, onde, nestas espécies, o comportamento de oviposição é intimamente associado à presença de criadouros artificiais (Forattini, 2002).

A perda de cobertura vegetal é documentada não apenas como fator crucial para diminuição de biodiversidade e isolamento de espécies de mosquitos (Grime, 1973; Connel, 1978) mas também, e de forma mais grave, sob o ponto de vista da saúde pública, para o aumento na circulação de arbovírus (Foley et al., 2005). A alteração dos ambientes naturais pode proporcionar condições para a adaptação de mosquitos, que desta forma, podem explorar com sucesso, novos tipos de criadouros (Wilke et al., 2018; Montarsi et al., 2019). Os resultados obtidos neste estudo, comprovam, e vão de acordo com os achados de Ceretti-Junior et al., (2015), que mostraram que algumas espécies de *Microculex* podem realizar ovoposição e desenvolver-se em bromélias

localizadas em áreas alteradas pela ação humana. O encontro de imaturos deste subgênero infestando criadouros artificiais evidencia o processo de adaptação que algumas espécies estão expostas, em muito, ou completamente impulsionado pela ação antrópica, que tem como principal agente causador, a diminuição do percentual de cobertura vegetal.

A espécie *Cx. (Mcx.) pleuristriatus* foi primeiramente documentada ocupando criadouros artificiais por Kumm & Novis (1938). Posteriormente, outros pesquisadores confirmaram este fato (Forattini et al., 1997; Lourenço-de-Oliveira, 1986). Em ocasião semelhante, o presente estudo, pode corroborar tal evidência, tornando documentada a presença de *Cx. (Mcx.) pleuristriatus* em pneus, recipientes plásticos e lonas de cobertura automotiva. Conjuntamente, *Cx. (Mcx.) albipes* e *Cx. (Mcx.) aureus* foram espécies reportadas infestando criadouros artificiais, onde larvas de *Cx. albipes* foram registradas em tanques artificiais e larvas de *Cx. aureus* em vasos plásticos. Em conformidade aos achados dos esforços de campo pertinentes a este documento, Lourenço-de-Oliveira et al., (1986) observou larvas de *Cx. (Mcx.) gairus* presentes em criadouros artificiais associadas a *Li. durhami* e *Cx. quinquefasciatus*. Quando vistos de forma uniforme, os encontros neste estudo e os registros anteriores trazem coerência à hipótese de que as espécies pertencentes à Série Pleuristriatus apresentam tendência de adaptação à ambientes impactados, migrando das bromélias (criadouros típicos) para os criadouros artificiais. Em contrapartida, *Cx. (Mcx.) davisi* e *Cx. (Mcx.) lanei*, foram espécies encontradas apenas em bromélias. Este fato pode sinalizar que apesar de serem representantes da Série Pleuristriatus, estas espécies, sejam menos adaptadas à ambientes modificados, ainda, especificamente associadas à ecologia bromelicola.

A investigação acerca das características ecológicas do subgênero *Microculex* é um campo pouco explorado, ainda que a definição do grupo remonte ao início do Sec. 20. É de consenso, baseado em resultados anteriores, que este subgênero seja apontado como presente tipicamente em ambientes silvestres ou intermediários (Anjos & Navarro, 2008; Marchi et al., 2010; Silva et al., 2017). No entanto, os resultados deste trabalho apontam que algumas espécies, como *Cx. (Mcx.) aureus* e *Cx. (Mcx.) davisi* são, factualmente associadas com ambientes onde a cobertura vegetal é altamente preservada, outras espécies, como *Cx. (Mcx.) pleuristriatus* e *Cx. (Mcx.) imitator* podem ser encontradas em ambientes onde o gradiente de cobertura vegetal apresenta grande percentual de variação. Diante deste fato é plausível considerar que o nível de adaptação

á ambientes modificados ou a restrição à ambientes preservados seja espécie-específico em *Microculex*.

A presença das espécies de *Microculex* em vegetais Bromeliacea foi dominante, não havendo registros, neste estudo, de larvas deste subgênero em buracos de árvores, em discordância ao apontado por Dorvillé et al. (1996) que determina buracos de árvores como criadouros típicos. O encontro de larvas *Microculex* prioritamente associado ao conteúdo aquático de bromélias é consonante com estudos similares (Lane, 1953; Muller & Marcondes, 2006; Marques et al., 2012; Ceretti-Junior et al., 2015) o que pode demonstrar a especificidade deste tipo de criadouro, sendo o encontro de *Microculex* em outros criadouros naturais como pouco comum.

A riqueza e abundância de espécies de culicídeos são associadas com a taxa de cobertura vegetal da região, fato este, que proporciona o aumento de potenciais criadouros naturais (Correa et al., 2014). A investigação comparativa de áreas florestais com ambientes peridomiciliares no Kenya demonstra que quanto mais preservado o ambiente, maior é o número de espécies de mosquitos (Lounibos, 1981). Dentre os resultados apontados por este estudo, um dos que figura como principais, pode-se citar a discreta variação na riqueza e composição das espécies de *Microculex* entre os gradientes de cobertura vegetal, mesmo no caso daqueles, onde o processo de antropização seja marcadamente recente. Fica claro, concomitantemente que algumas espécies, a exemplo de *Cx. (Mcx.) imitator* possui a capacidade de colonizar bromélias presentes em locais alterados; outras espécies, a exemplo de *Cx. (Mcx.) pleuristriatus* revelam a tendência de colonizar criadouros artificiais. Porém, assinalada é a presença de algumas espécies, como *Cx. (Mcx.) davisi* e *Cx. (Mcx.) lanei* apenas a localidades minimamente alteradas.

Entre as 14 espécies de *Microculex* observadas neste estudo, apenas *Cx. (Mcx.) imitator* possui registro factual de evidente adaptação à ambiente impactado na Cidade de São Paulo (Ceretti-Junior et al., 2015). A condução de estudos que visem a verificação da presença destes culicídeos em localidades com menos de 60% de cobertura vegetal poderá trazer maior grau de confiabilidade a estes registros.

O conhecimento adquirido acerca do hábito alimentar das espécies de *Microculex* é restrito á poucas espécies e não atualizado. Lutz & Lutz (1939) observaram *Cx. (Mcx.) imitator* e *Cx. (Mcx.) pleuristriatus* realizar repasto sanguíneo em sapos, estes, no interior de bromélias. Em ambiente laboratorial, Lourenço-de-Oliveira et al. (1986) replicou estas observações, utilizando *Cx. (Mcx.) imitator* e *Cx.*

(*Mcx.*) *gairus*, confirmando a tendência destes mosquitos em possuírem a tendência de realizar hematofagia em sapos, ainda que lhes fosse acessível a possibilidade de realizar em répteis, pássaros, roedores e em humano (como voluntário). De forma mais recente, Santos et al. (2019) fazendo uso de espécimes de *Microculex* adultos advindos de coleta de campo, demonstraram que estas estavam ingurgitadas com sangue de anfíbios e pássaros. Por dificuldades inerentes ao processo de identificação, não foi possível determinar as quais espécies correspondiam os exemplares coletados. O comportamento aparentemente eclético de repasto sanguíneo neste subgênero pode ser demonstrado pelo encontro de *Cx. (Mcx.) pleuristriatus*, coletado em área de proteção ambiental, ingurgitada com sangue de pássaro e roedor (Alencar et al., 2015). O evidente hiato no conhecimento acerca do hábito alimentar as espécies de *Microculex*, somado à possibilidade de ecletismo hematofágico e capacidade de adaptação a ambientes impactados e criadouros artificiais esclarece a necessidade de estudos com foco no hábito alimentar e participação de *Microculex* na manutenção de patógenos em ciclos enzoóticos, sobretudo, devido à escassez de evidências de comportamento hemotofágico destes culicídeos em condições naturais.

### **Estudo morfológico das genitálias masculinas.**

Como evidenciado pelos resultados e discussões referentes aos tópicos anteriores, a dificuldade associada à correta identificação das espécies de *Microculex*, como já salientado por Lane & Whitman (1951), causa repercussões negativas em estudos faunísticos e epidemiológicos.

Baseado na premissa de atualizar o conhecimento a respeito da taxonomia das genitálias masculinas de *Microculex* foi possível compilar relevante volume de informações a título de tornar o processo de identificação destas espécies mais confiável. Os registros adquiridos trazem maiores detalhes na estrutura genital masculina de 23 espécies de *Microculex*, sendo algumas delas, pela primeira vez registrada, confirmando a hipótese firmada, para outras, estende seu mapa de distribuição. No entanto, torna-se crucial o estudo posterior das demais fases de vida, a título de fornecer a descrição completa, tornando possível a validação das referidas espécies.

Quando comparado com os estudos anteriores, sobretudo aos postulados de Lane (1953) e Cotrim & Galati (1977) foi possível corroborar a validade das estruturas mencionadas, com exceção à morfologia da Falósoma, mais enfaticamente ao aspecto e

morfologia da placa latera (PL) e esclerito do edeago (Aes) que aparentam possuir características de suma importância para a determinação de algumas espécies.

Ao que concerne as espécies pertencentes à Série Imitator, a investigação e redescrição das genitálias masculinas puderam validar as determinações apontadas por seus descritores. A quantidade de cerdas existentes na divisão distal do lobo subapical do gonocoxito é crucial para a separação de *Cx. (Mcx.) imitator*, *Cx. (Mcx.) imitator retrosus* e *Cx. (Mcx.) dubitans*. No entanto, como resultado da investigação taxonômica, o apontamento do formato do esclerito do edeago (AeS) e presença de região hialina neste, pode ser um importante fator de separação das espécies. Lane (1953) se refere ao ângulo de curvatura da porção ventral do processo ventral da placa lateral como estrutura determinante para diferenciar as espécies desta Série, porém, torna-se salutar a menção de que o próprio procedimento de preparação da lâmina, onde o volume de bálsamo para fixação utilizado e posicionamento da estrutura pode causar falsas impressões angulares. Portanto, é reinterada a não-indicação desta estrutura para fins determinantes de espécies, mas permanecendo sua validade como estrutura típica da Série Imitator.

Os achados pertinentes às espécies pertencentes à Série Consolator, em termos numéricos, a menor das Séries, contando atualmente com 4 espécies (*Cx. consolator*, *Cx. worontzowi*, *Cx. reducens* e *Cx. hedys*) (Lane & Whitman, 1951), confirmam a validade da observação do número e aspecto das cerdas presentes na divisão distal do lobo subapical do gonocoxito. O postulado de Lane & Whitman (1951), quando da descrição de *Cx. (Mcx.) reducens* que pondera a respeito da semelhança das cerdas da supracitada estrutura quando comparadas com as existentes em *Cx. (Mcx.) consolator*, que poderia inclusive, tratar-se de uma variação de *Cx. (Mcx.) consolator* não pode ser refutada. A infrutífera localização desta espécie nos esforços de coleta inviabilizou análise comparativa. No entanto, ao verificar os pormenores das descrições, somado as ilustrações providas, parece pouco crível que o aspecto sobreposto das cerdas do lobo subapical possa ser alvo de contestação. Porém, por questões científicas, é recomendada a comparação direta destas espécies para firmar qualquer diagnóstico confirmatório.

Associado à recomendada observação das cerdas presentes na divisão distal do lobo subapical do gonocoxito, a correta dissecação, posicionamento e observação das estruturas do Falósoma confirmaram-se como sendo valiosa para determinar as espécies estudadas. Como exposto nas descrições, tanto *Cx. (Mcx.) worontzowi* e *Cx. (Mcx.) reducens* apresentam incontestemente singularidade na placa lateral e no esclerito do edeago,

principalmente ao que tange ao próprio formato, tendo harmônioso ângulo de curvatura em *Cx. worontozowi*, sendo ausente de formações hialinas em *Cx. reducens*. A semelhança destas espécies, ao que se refere às estruturas da genitália masculina, com as espécies pertencentes à Série Pleuristriatus pode ser verificada e assinalada. A presença do lobo subapical do gonocoxito em forma tuberosa na divisão distal, e disposição numérica e aspecto das cerdas, em semelhança ao existente nas espécies da Série Pleuristriatus, pode levar, ao observador pouco familiarizado a conclusões equivocadas. O mesmo pode ser hipotetizado na ocasião de processo de dissecação e posterior posicionamento do gonocoxito de forma errônea, onde o correto ângulo de observação pode ser atribuído como determinante à correta determinação das espécies. Para tanto, como evidenciado tanto nas redescrições oriundas deste trabalho, como das chaves dicotômicas originadas, é indicado a observação das estruturas referentes à placa lateral, em particular o posicionamento e aspecto do processo ventral na diferenciação destas Séries. Nas espécies da Série Consolator, o processo ventral da placa lateral é localizado em posição proeminentemente mais apicular quando comparado com as espécies da Série Pleuristriatus.

Apesar das limitações inerentes ao trabalho, é proposta, baseada nas observações realizadas nas estruturas da genitália masculina, a provável existência de “espécies novas” relativas à denominada espécie *Cx. neglectus*. Estas, em sua conformação geral, principalmente ao que remete a presença e aspecto de cerda em formato foliar no ápice do lobo subapical da divisão distal do gonocoxito. Em particular, *Cx. neglectus* apresenta inconsistências, em muito decorrente de seu confuso processo de descrição. Oficialmente sua descrição é atribuída a Lutz (1903), fazendo parte do complicado de informações presentes em Bourroul (1904), onde são expostas brevemente as características principais dos adultos machos, fêmeas larvas e pupas (determinadas como *ninfas* no estudo). A investigação das genitálias masculinas ainda não se fazia presente na época. Tarefa esta que foi executada por Rozeboom & Komp (1950), onde, baseados em observações de material próprio e comparações com a descrição original á ilustração da genitália masculina (única) depositada no USNM, concluíram que a característica diagnóstica da espécie era a cerda apical em formato de folha presente no lobo subapical da divisão distal do gonocoxito (à época, mencionado como *lobo apical*). Neste trabalho, os autores mencionam “apêndice basal curvo” como relevante na determinação da espécie. Indo de encontro ao usualmente mencionado nas descrições do período é razoável supor que esta indicação seja o que hoje é reconhecido como

esclerito do edeago. Os autores atestam a similitude das características inerentes às genitálias masculinas de *Cx. neglectus* às encontradas também em *Cx. elongatus*. Assim o diagnóstico correto das espécies tornaria-se mais seguro quando observado as características dos adultos, a saber: a ausência de conjunto de cerdas brancas basais no abdome em *Cx. neglectus*; e estas serem largas e distintas em *Cx. elongatus*.

Ainda em referência ao mesmo trabalho, Rozeboom & Komp (1950) apontam o *status* confuso de *Cx. neglectus*. Segundo os autores, os espécimes a eles enviados por Dr. L. Whitman e Dr. J. Lane (coletados em bambús) eram idênticos à *Cx. elongatus*, exceto pela ausência de escamas brancas nas regiões basais dos tergitos abdominais. Neste aspecto, o espécime descrito por Lutz (Bourroul, 1904) e depositado no USNM possui estas mesmas características. No entanto, é assinalada profunda discordância entre a descrição e material depositado e o material enviado por Whitman & Lane, sugerindo que a espécie encontrada nos ocos de bambús, e desprovida de escamas brancas na porção basal dos tergitos abdominais possa se tratar, em verdade, de *Cx. elongatus* ou outra espécie.

Tendo como suporte os escritos e hipóteses de Rozeboom & Komp (1950) a respeito das notórias variações verificadas (e questionadas), em *Cx. neglectus*, neste trabalho é sugerida a possibilidade de existência de complexo de espécies neste táxon.

A falta de especificações e ilustrações a respeito da placa lateral e esclerito do edeago tornam a inequívoca determinação de qual seria atribuição correta ao espécime descrito por Lutz (1903) temerária. A espécie determinada como *Cx. neglectus*, pela presença da citada cerda foliar no ápice da divisão distal e altura dos lobos do IX-tergito, pode ser adotada como orientadora, mas desprovida de especificidade. Esta conformação, com notáveis graus de variação estão presentes tanto em *Cx. neglectus*, *Cx. neglectus sp1*, *Cx. neglectus sp2*, *Cx. neglectus sp3*. As espécies mencionadas como *Cx. neglectus sp1*, *Cx. neglectus sp2* e *Cx. neglectus sp3* compartilham da presença de proeminente processo interno hialino do esclerito do edeago. Onde em *Cx. neglectus sp1* e *Cx. neglectus sp2* o ápice deste processo interno é liso.

O aspecto e altura da cerda foliar nitidamente singular em *Cx. neglectus sp2* e *Cx. neglectus sp3* é associado com aspectos também singulares dos lobos do IX-tergito. Em *Cx. neglectus sp2* a cerda foliar tem sua haste mais alta que o observado em *Cx. neglectus* e *Cx. neglectus sp1*; mesmo padrão conferido aos lobos do IX-tergito. Destas suspostas espécies atribuídas ao sugerido Complexo Neglectus, *Cx. neglectus sp3* possui as características mais demarcadas: Cerda foliar da divisão distal do lobo

subapical mais desenvolvida e haste diminuta; Lobos do IX-tergito com altura equivalente a 4x a largura basal; Presença de dentículos no processo interno hialino do esclerito do edeago.

Em continuidade a discussão proposta quanto às espécies atribuídas ao sugerido Complexo Neglectus e a semelhança ponderada inicialmente com *Cx. elongatus*, esta parece não ser o material observado, tratando-se, de espécie nitidamente diferente. As principais características atribuídas quando de sua descrição (Rozeboom & Komp, 1950) foram confirmadas, a exceção do processo lateral da placa lateral, presente nos espécimes observados pelos descritores, mas ausente naqueles utilizados neste documento, o que poderia remeter à variação morfológica da espécie ou questões ligadas ao processo de preparação das lâminas. Ao passo do caráter investigativo da proposta, cabe mencionar que a área de distribuição de *Cx. elongatus* deve ser estendida, compreendendo também o território brasileiro.

Quanto as demais espécies referidas à Série Inimitabilis, *Cx. microphyllus* não foi coletada e não foi possível a consulta de material depositado referente. As informações que concernem à *Cx. inimitabilis*, *Cx. aphyllactus*, *Cx. fuscatus* puderam ser confirmadas e sensivelmente expandidas. Importante mencionar que as citadas espécies possuem fortes semelhanças, o que torna o processo de identificação extremamente dependente do processo de preparação, dissecação e montagem das genitálias. Os espécimes de *Cx. inimitabilis* pertinentes as coletas realizadas diferem quanto a conformação dos lobos do IX-tergito em relação aos exemplares depositados na Coleção Entomológica da Faculdade de Saúde Pública, apresentando lobos evidentemente menores. De acordo com as observações, apesar da notória semelhança entre as três espécies supracitadas, é proposta a observação da cerda foliar presente na divisão distal do gonocoxito de *Cx. inimitabilis* e *Cx. fuscatus*, onde no primeiro, esta apresenta conformação curva, com tendência a ângulo decubente e na segunda, apesar da curvatura semelhante, a tendência é de ângulo ascendente. Em relação à *Cx. aphyllactus*, aspecto de inclinação da margem externa do IX-tergito é sugerida como característica auxiliar no diagnóstico da espécie.

Os avanços no aspecto de estudo das genitálias masculinas da Série Pleuristriatus confirmam e extensão os postulados de Cotrim & Galati (1977). Das espécies mencionadas no citado trabalho, *Cx. gairus* e *Cx. xenophobus* não puderam ser investigados, por motivos relativos à presença em coleta de campo e impossibilidade quanto á consulta de material depositado. No mais, os achados pertinentes às outras

espécies trouxeram acréscimo de conhecimento. Os principais podem ser associados as características diagnósticas propostas para separar as espécies *Cx. pleuristriatus* e *Cx. albipes*. Porém, a correta observação da presença de porção dilatada no gonóstilo e curvatura na superfície ventral e dorsal do esclerito do edeago seja relacionado ao processo de fixação das estruturas na lâmina. No geral, para as espécies da Série Pleuristriatus, é assinalada a importância da observação das cerdas presentes na divisão distal do lobo subapical do gonocoxito, em conformidade aos estudos anteriores (Lane & Whitman, 1951; Lane, 1953; Cotrim & Galati, 1977), no entanto, as redescrições que constam neste documento indicam a observação de características associadas ao esclerito do edeago e lobos do IX-tergito para a identificação das espécies. Baseado nas evidências do estudo é sugerido o uso associado às cerdas da divisão distal que podem ser alocadas em ângulos pouco favoráveis à observação, o que pode, facilmente, resultar em identificações equivocadas.

Quanto às espécies que não figuram em nenhuma das Séries propostas por Lane & Whitman (1951), as características diagnósticas apontadas puderam ser confirmadas e expandidas, havendo o detalhamento de estruturas pouco abordadas nas descrições originais

O espécime determinado como *Culex (Microculex) sp1* guarda relevantes semelhanças com *Culex (Microculex) stonei*, a saber: presença de 3 cerdas isoladas na região apical da divisão distal do lobo subapical; 2 cerdas retilíneas na região mesoventral, junto a base do processo colunar. As características preconizadas na morfologia da placa lateral e esclerito do edeago, igualmente, são presentes nestes espécimes, no entanto, a principal singularidade é verificada na altura dos lobos do IX-tergito. Em *Cx. stonei*, estes possuem altura superior a largura, e neste espécime, os lobos são invariavelmente menores, tendo altura e largura semelhantes.

O espécime determinado como *Culex (Microculex) sp2* divide notórias semelhanças com *Cx. chryselatus* e *Cx. kukenan*. Em relação à primeira, o aspecto geral do gonocoxito, sobretudo a conformação da divisão distal do lóbulo subapical, processo colunar e cerdas presentes. No entanto, este espécime possui 2 cerdas na divisão distal, enquanto em *Cx. chryselatus* são 3. Semelhante diferença pode ser mencionada sobre as cerdas observadas na porção mesodorsal, que em *Cx. chryselatus* são 2 e neste espécime é observada apenas 1. As semelhanças com *Cx. kukenan* são visíveis na conformação e aspecto dos lobos do IX-tergito e placa lateral. Importante mencionar que embora neste espécime existam dentículos na superfície ventral do esclerito do

edeago como mencionado em *Cx. kukeenan* (Anduze, 1942), estes aparentam maior desenvolvimento e aspecto pontiagudo, além de não serem vistos em toda a extensão da estrutura. Ainda que se trate de material deprovido de adulto, exúvias de larva e pupa, baseado nestas observações, é possível conjecturar referência à espécie não-descrita.

Dentre os trabalhos descritivos das espécies de *Microculex*, é devido à menção da completude existente no trabalho de Lourenço-de-Oliveira & Silva (1987) quanto à descrição de *Cx. (Mcx.) siphantulatus*. A não obtenção desta espécie durante as atividades de campo e as condições pouco facilitadoras no aspecto observacional das lâminas depositadas na Coleção Entomológica da Faculdade de Saúde Pública permitem apenas a utilização e confirmação das informações explicitadas no referido trabalho.

De forma sucinta, os resultados expostos neste trabalho correspondem há um importante avanço no campo da ecologia e taxonomia de *Microculex*, um subgênero de *Culex* deprovido de estudos específicos desde os trabalhos de Lane (1953) e Cotrim & Galati (1977). O uso precursor da morfometria geométrica alar como ferramenta acessória na identificação de *Microculex* se mostrou eficaz na distinção de espécies semelhantes, podendo ser associada à taxonomia clássica, tendo seus intuítos expandidos para outras espécies. As evidências ecológicas apontam para processos de adaptação à ambientes impactados, cujas repercussões no âmbito epidemiológico carecem de investigações mais profundas. As redescrições e descrições, bem como a chave dicotômica ilustradas para genitálias masculinas fazem menção a um esforço antes inexistente para este subgênero, cuja intenção é facilitar a consulta de pesquisadores. A indicação de completa dissecação, e observação morfológica da placa lateral e esclerito do edeago provem importantes características diagnósticas pouco exploradas anteriormente. A sumarização de supostas espécies não descritas e atributos morfológicos não mencionados em estudos precursores confirmam a complexidade taxonômica inerentes ao subgênero *Microculex*. Torna-se latente a necessidade de continuidade dos esforços taxonômicos e ecológicos acerca deste subgênero. Este trabalho, mesmo ciente de suas limitações, buscou ser um marco iniciador na pesquisa específica de *Microculex*, um subgênero diverso, complexo, pouco conhecido e amplamente disseminado no Brasil e nas Américas.

## 7 Conclusões

- O presente estudo foi efetivo em elucidar padrões inerentes à morfologia das asas dos espécimes de *Microculex* por meio da ferramenta de Morfometria Geométrica alar de forma a viabilizar o seu uso acessório à taxonomia clássica.
- De acordo com os resultados provenientes do estudo a respeito da dispersão dos mosquitos do subgênero *Microculex* nos gradientes de cobertura vegetal demonstrou que algumas espécies mostram a tendência de adaptação a criadouros localizados em áreas de transição, bem como criadouros artificiais.
- Os procedimentos de coleta realizados puderam atestar a presença de espécies não reportadas ao território brasileiro, a exemplo de *Microculex elongatus*
- A investigação taxonômica sobre as genitálias masculinas foi positiva na redescritção de 18 espécies válidas.
- De acordo com as observações, baseadas nas descrições originais, o presente trabalho reporta a existência de 5 espécies de *Microculex* não-descritas.
- A apresentação de nova chave dicotômica para genitálias masculinas de *Microculex* representa significativo avanço na taxonomia deste subgênero.
- É salientada a importância da continuidade de estudos de cunho taxonômico e epidemiológico a respeito de *Microculex*.

## 8 Referências Bibliográficas.

- Abela-Medrano CA, Ibáñez-Bernal S, Mac-Gregor-Fros I, santiago-Alarcon D. Spatiotemporal variation of mosquito diversity (Diptera: Culicidae) at places with different land-use types within a neotropical montane cloud forest matrix. *Parasite & Vectors*. 2015; 8(487). doi:10.1186/s13071-015-1086-9.
- Adams DC, Rohlf FJ, Slice DE. A field come of age: geometric morphometrics in the 21<sup>st</sup> Century. *Ital J Mammal*. 2012; 24:7-14.
- Anduze PJ. La fauna culicidiana de Venezuela. Description de uma especie nueva (Diptera: Culicidae). *Rev S.A.S*. 1942. Vol 8 (4), 557-560. Instituto de Higiene, Caracas.
- Anjos AF, Navarro-Silva MA. Culicidae (insecta: Diptera) em área de Floresta Atlântica, no Estado do Paraná. *Brasi. Acta Sci Biol*. 2008; 30(1), 23-27.
- Alberti M, Marsluff J. Ecological resiliense in urban ecosystems: linking urban patterns to human and ecological functions. *Urban Ecosyst*. 2004. 7, 241-265.
- Alencar A, Mello FC, Gil-Santana HR, Giupponi APD, Araújo NA, Lorosa ES, Guimarães AE, Silva JS. Feeding patterns of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in the Atlantic Forest, Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Entomol*. 2015; 5(27), 789-802. doi: 10.1093/jmedent/27.5.789.
- Araújo VA, Melo SK, APA Araujo, MLM Gomes, Carneiro MAA. Relationship between invertebrate fauna and bromeliad size. *Braz J Biol*. 2007. 67 (4): 611-617.
- Armbruster P, Hutchinson RA, Cotgreave P. Factors influencing community structure in a South American tank bromeliad fauna. *Oikos*. 2002. 96: 225 – 234.
- Amerasinghe FP, Ariyasena TG. Larval Survey of surface Water-breeding Mosquitoes During t in the Irrigation Development in the Mahaweli Project, Sri Lanka. *J Med Entomol*. 1990; 5(27), 789-802. doi:10.1093/jmedent/27.5.789.
- Ayllón T, Câmara DC, Morone FC, Gonçalves LS, Barros FS, Brasil P, et al. Dispersion and oviposition of *Aedes albopictus* in a Brazilian slum: Initial evidence of Asian tiger mosquito domiciliarion in urban environments. *PloS One*; 4 (13). 2018. doi: 10.1371/journal.pone.0195014.
- Bates D, Maechler M, Bolker B, Walker S, Christensen RHB, Singmann H, et al. Package lme4: linear mixed-effects models using Eigenand S\$. *R Found Stat Comput*. 2016; 1,1-113.
- Berlin OG, Belkin JN. Mosquitoes studies (Diptera; Culicidae) XXXVI. Subgenera *Aedinus*, *Tinolestes* and *Anoedioporpa* of *Culex*. *Contrib Am Entomol Inst*. 1980. 17(2) 1-104
- Bhatt S, Gething PW, Brady O. et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013. 496, 504 – 507. <https://doi.org/10.1038/nature12060>.
- Bookstein FL. Morphometric tools for landmark data: geometry and biology. Cambridge University Press. 1991.

- Calado DC, Navarro-Silva MA. Identification of *Anopheles (Kerteszia) cruzii* Dyar & Knab and *Anopheles (Kerteszia) homunculus* Komp (Diptera: Culicidae; Anophelinae) by molecular markers (RAPD and RFLP). Rev Bras Zool. 2005 22 (4).
- Cardoso CAA, Lourenço-de-Oliveira R, Codeço CT, Motta MA. Mosquitoes in Bromeliads at ground level of the Brazilian Atlantic Forest: the relationship between mosquito fauna, water volume, and plant type. Arthr Biol. 2015. Vol 108 (4).
- Carvalho GC, Ceretti-Junior W, Barrio-Nuevo KM, Wilk-da-Silva R, Christe RO, Paula MB, et al. Composition and diversity of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in urban parks in the South regions of the city of São Paulo. Bio Neotr; 2(12). doi:10.1590/1676-0611-BN-2016-0274.
- Ceretti-Junior W, Christe RO, Rizzo M, Strobel RC, Junior MOM, Mello MSHS, Fernandes A, Medeiros-Sousa AR, Carvalho GC, Marrelli MT. Species composition and ecological aspects of immature mosquitoes (Diptera: Culicidae) in bromeliads in the City of São Paulo, Brazil. J Athropod-Borne Dis. 2015. 10(1): 102 – 112.
- Chacín I. Distribución geográfica de la familia Bromeliaceae en Venezuela. Trabajo Especial de Grado, Escuela de Biología, Universidad Central de Venezuela. 1993. Caracas, Venezuela.
- Chang MS, Hii J, Burtner P, Mansoor F. Changes in abundance and behaviour of vector mosquitoes induced by land use during the development of an oil palm plantation in Sarawak. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1997; 91(4), 382-386.
- Chaves LF. An entomologist guide to demystify pseudoreplication: data analysis of field studies with design constraints. J Med Entomol. 2010; 47, 291-298.
- Christe RO, Marrelli MT, Vidal PO, Vendrami DP, Wilke ABB. Assessment of the microgeographic population structure of *Aedes fluviatilis* (Diptera; Culicidae) using wing geometric morphometrics. Entomol Gener. 2019; (39) 183-191
- Christe RO, Wilke ABB, Vidal PO, Marrelli MT. Wing sexual dimorphism in *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae). Inf Gen Evol. 2016. 45: 434-436.
- Clastier J. *Culex (Melanoconion) dolichophyllus* n. sp. et *Culex (Microculex) stonei* Lane et al., 1943 Whitman (Diptera: Culicidae) em Guyane Française. Annales de Parasitologie (Paris). 1970. 45 (6); 857-861.
- Combes AS & Daniel TL. Flexural stiffness in insect wings I. scaling and influence of wing venation. J Exp Biol. 2003; 206:2979-2987. doi: 10.1242/jeb.00523.
- Connell JH. Diversity in tropical rain forest and coral reefs: high diversity of trees as coral is maintained in a non-equilibrium state. Science. 1978. 199, 1302-1310.
- Consoli RAGB, Lourenço de Oliveira R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Cad Saúde Pública. 1994 Mar; 11 (1): 157 – 8.

- Correa FF, Gleiser RM, Leite PJ, Fagundes E, Gil-Santana HR, Mello CF, et al. Mosquito (Diptera: Culicidae) communities in Nova Iguaçu Natural Park Rio de Janeiro, Brazil. *J Am Mosq Control Assoc.* 2014; 30, 83-90. PMID:25102590.
- Cotrim MD & Galati EAB. Revisão da Série Pleuristriatus do subgênero *Microculex* Theobald, 1907 (Diptera: Culicidae). *Ver Bras Ent.* 1977. 20 (34): 169-205.
- Dupuy JF. *Statistical Methods for Overdispersed count Data.* 1st ed. Elsevier, Amsterdam. 2018.
- Demari-Silva B, Suesdek L, Sallum MAM, Marrelli MT. Wing geometry of *Culex coronator* (Diptera: Culicidae) from South and Southeast, Brazil. *Parasite & Vectors.* 2014. 7: 174.
- Demari-Silva B, Vesgueiro FV, Sallum MAM, Marrelli MT. Taxonomic and Phylogenetic between species of the Genus *Culex* (Diptera: Culicidae) from Brazil inferred from the Cytochrome *c* Oxidase I Mitochondrial Gene. *J Med Ent.* 2011. 48 (2): 272-279.
- Dorvillé LFM. Mosquitoes as bioindicators of forest degradation in southeastern Brazil, a statistical evaluation of published data in the literature. *Stud Neotrop Fauna & Environm.* 1996. 31: 68-78.
- Drake AG, Klingenberg CP. Large scale diversification of skull shape in domestic dogs: disparity and modularity. *Am Nat.* 2010; 175:289-301.
- Dujardin JP, Kaba D, Henry AB. The exchangeability of shape. *BMC Res Notes.* 2010; 3:266. doi; 10.1186/1756-0500-3-266 PMID 20026429.
- Dyar HG. New American mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Insector Inscitiae Menstruus.* 1918b. 6; 120-129
- Dyar HG, Knab F. Mosquitoes from the Canal Zone. 1907
- Dyar HG, Knab F. New species of Tropical American Mosquitoes. *Insector Inscitiae Menstruus.* 1919. Vol. 7.
- Dujardin JP. Morphometrics applied to medical entomology. *Infec Gen Evol.* 2008. 8 (6): 875:90.
- Eberhard WG. *Sexual Selection and Anima Genitalia.* Cambridge, MA, Harvard University Press. 1985. 244 pg.
- Edman JD. Disease control through manipulation of vector-host interactions: some historical and evolutionary perspectives. In: Scott TW, Grumstrup-Scott J (Eds.), *Proceedings of a Symposium: The role of Vectors-Host Interactions in Disease Transmission.* Entomol Soc Amer. 1988. Miscelanneous Publication; 53- 50.
- Edwards FW. *Genera insectorum. Diptera. Fam. Culicidae Fascicle 194.* 1932. Brussels, Belgium: Desmet Verteneuil.
- Flock H & Fauran P. Nouveaux *Culex* em Guyane française (VI). *Culex (Melanoconion) patientiae n. sp. Culex (Carrolia) manaensis n. sp. Culex (Microculex) reginae n.*

- sp.* Publications/ Archives de L'Institut Pasteur de la Guyane française et de L'Inini. 1955. 370: 1- 7.
- Foley JA, DeFries R, Asner GP, Barford C, Bonan G, Carpenter SR, et al. Global Consequences of Land Use. *Science*. 2005; 309 (570). Doi:10.1126/science.1111772.
- Forattini OP & Coutinho JO. Sobre duas espécies do subgênero *Microculex* (Diptera: Culicidae). *Studia Ent*. 1963. 6(1-4): 481-495.
- Forattini OP. *Entomologia Médica*. EDUSP. 1965. Faculdade de Higiene e Saúde Pública, São Paulo.
- Forattini OP & Toda A. Notas sobre Culicidae (Diptera). 11. Algumas espécies amazônicas de *Microculex*. *Studia Ent*. 1963. 9 (1-4): 501-514.
- Forattini OP, Kakitani I, Sallum MAM. Breeding places of *Aedes scapularis* (Diptera: Culicidae) in artificial containers. *Ver. Saúde Pública*. 1997. 31 (5) 519-22.
- Forattini OP. *Culicidologia Médica: identificação, biologia, epidemiologia*. 2nd ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo 2002.
- Frank JH & Lounibos LP. Insects and allies associated with bromeliads: a review. *Terr Arthropod Ver*. 2009. 1(2): 125-153.
- Fruciano C. Measurement error in geometric morphometrics. *Dev Genes Evol*. 2016; 226:139-158.
- Guimarães JH. Systematic database of Diptera of the Americas south of the United States, family Culicidae São Paulo, Brazil: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo. Ed. Pleide. 1997.
- Grime JP. Competitive exclusion in herbaceous vegetation. *Nature*. 1973; 242, 344-347.
- Gómes GF & MM Correa. Discrimination of Neotropical *Anopheles* species used on molecular and wing geometric traits. *Inf Gen Evol*. 2017; 54:379-386.
- Hammer Ø, Harper DATT, Ryan PD. PAST: Pleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontol Electron*. 2001;4:9
- Harbach RE. Mosquito Taxonomic Inventory [Internet]. 2022. Available from: <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/>
- Harbach RE. Classification within the cosmopolitan genus *Culex* (Diptera; Culicidae) The foundation for molecular systematics and phyogenetic research. *Acta Tropica*. 2011. 120: 1-14.
- Hartig F. DHARMA: residual diagnostics for hierarchical (Multi-Level/ mixed) regression models. R Packag version 0.2.0. 2018.
- Huber BA. Genital morphology and copulatory mechanics in *Anyphaena accentuate* (Anyphaenidae) and *Clubiona palliula* (Clubionidae: Araneae). *J Zoo*. 1995. 235, 689-702.

- Huber BA. Evidence for functional segregation in the directionally asymmetric male genitalia of the spider *Metagonia mariguitarensis* (González-Sponga) (Pholcidae: Araneae). *J Zoo.* 262, 317-326.
- Jirakanjakit N, Leemingawat S. Dujardin JP. The geometry of the wing of *Aedes (Stegomyia) aegypti* in isofemale lines through successive generations. *Inf Gen Evol.* 2008. 8(4): 414-21.
- Johnson MTJ, Munshi-South J. Evolution of life in urban environments. *Science.* 2017; 358. Eaam8327.doi:10.1126/science.aam8327.
- Joly AB. Conheça a vegetação brasileira. Edusp.1970. Polígono. São Paulo.
- Joly CA, Metzger JP, Tabarelli M. Experiences from the Brazilian Atlantic Forest: ecological findings and conservation initiatives. *New Phytol.* 2014; 204 (3): 459-73.
- Klingenberg CP. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Mol Ecol Resour.* 2011; 11:353-357. doi:10.1111/j.1755-0998.2010.02924.x PMID:21429143.
- Kumm HW. Mosquitoes breeding in bromeliads at Bahia, Brazil. *Bull Ent Res.* 1933. 24: 561-573.
- Kumm HW, Novis O. Mosquito studies on the Ilha do Marajó, Pará, Brazil. *Am J Hyg.* 1938; 27, 498-515.
- Lane J. Neotropical Culicidae, Vol 1. Uni São Paulo. 1953. São Paulo, Brazil. 548 p
- Lane J & Whitman I. Novas espécies de *Culex* no Brasil (Diptera; Culicidae). *Rev. Ent.* 1943.14(3): 389-408.
- Lane J & Whitman L. The subgenus *Microculex* in Brazil (Diptera: Culicidae). *Ver Bras Biol.* 1951. 11: 341-366.
- Laurito M, Oliveira TMP, Almirón WR, Sallum MAM. COI barcode versus morphological identification of *Culex (Culex)* (Diptera: Culicidae) species: a case study using samples from Argentina and Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013. 108: 110-122.
- Leme EC & Marigo LC. Bromélias na natureza. 1993. Rio de Janeiro.
- Lindblade KA, Walker ED, Onapa AW, Katungu J, Wilson ML. Land use change alters malaria transmission parameters by modifying temperature in a high-land area of Uganda. *Trop Med Int : Health.* 2000; 5(4), 263-274.
- Liria J. Fauna Fitotelmata em las bromélias *Aechmea fendleri* André y *Hohenbergia stellata* del Parque Nacional San Steban, Venezuela. *Rev Per Biol.* 2007. 14(1): 033-038.
- Lounibos LP. Habitat segregation among African treehole mosquitoes. *Ecol Entomol.* 1981;6, 129-154.

- Louise C, Vidal PO, Suesdek L. Microevolution of *Aedes aegypti*. PloS One. 2015;10:e0137851.doi:10.1371/journal.pone.0137851 PMID:26360876.
- Lourenço-de-Oliveira R, Heyden R, Silva TF. Alguns aspectos da ecologia dos mosquitos (Diptera: Culicidae) de uma área de planície (Granjas Calábria) em Jacarepaguá, Rio de Janeiro, V, criadouros. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1986. 81(3): 265-271.
- Lorenz C, Marques TC, Sallum MAM, Suesdek L. Morphometrical diagnosis of the malaria vectors *Anopheles cruzii*, *An. homunculus* and *An. bellator*. Parasite & Vectors. 2012. 5; 257.
- Lutz A, Lutz B. Notes on the genus *Phyllomedusa wagler*. Observations on small *Phyllomedusae* without vomerine teeth or conspicuous parotids found in the regions of Rio de Janeiro. III – Mosquitoes biting batrachians and phragmosis in casque-head frog. Anais Acad Bras Ciênc. 1939. II, 250-256.
- Marchi JM, Muller GA, Marcondes CB. Mosquitos (Diptera: Culicidae) de uma Futura Unidade de Conservação em Área de Mata Atlântica no Sul do Brasil. Entomo Bras. 2010; 3(2), 34-37. <http://periodico.ebras.bio.org/ojs>.
- Marques CT, Bourke BP, Laporta GZ, Sallum MAM. Mosquito (Diptera: Culicidae) assemblage associated with *Nidularium* and *Vriesea* bromeliads in Serra do Mar, Atlantic Forest. Parasite & Vectors. 2012. 5:41.
- Marques GRAM & Forattini OP. Culicidae in bromeliads: diversity os species by anthropic environments, coastal area of Southeastern Brazil. Ver Saúde Pública. 2008. 42(6): 979-85.
- Mattys B, Goran EKN, Koné M, Koudou BG, Vounatsou P, Cissé G, et al. Urban agricultural land use and characterization of mosquito larval habitats in a medium-sized town of Côté d' Ivoire. J Vec Ecol. 2006; 31(2), 319-334. doi: 10.3376/1081-1710(2006)31[319:UALUAC]2.0.CO;2.
- Marteis LS, Natal D, Sallum MAM, Medeiros-Sousa AR, La Corte R. Mosquitoes of the Caatinga: 2. Species from periodic sampling of bromeliads and tree holes in a dry Brazilian Forest. Acta Tropica. 2017. 171: 114-123.
- Medeiros-Sousa AR; Fernandes A, Ceretti-Junior W, Wilke ABB, Marrelli MT. Mosquitoes in urban green spaes: using na island biogeographic approach to identify drivers of species richness and composition. Sci Rep. 2017; 7(1), 17826.
- McKinney ML. Urbanization, biosiversity, and conservation. The impacts of urbanization on native species are poorly studied, but educating a highly urbanized human population about these impacts can greatly improve species conservation in all ecosystems. Bioscience. 2002; 52 (10), 883-890.
- Mocellin MG, Simões TC, Nascimento TFS, Teixeira MLF, Lounibos LP, Lourenço-de-Oliveira R. Bromeliad-inhabitin mosquitoes inan urban botanical garden of dengue endemic Rio de Janeiro. Are bromeliads productive habitats for the invasive vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*? Mem Ins Oswaldo Cruz. 2009. Rio de Janeiro. Vol. 104 (8): 1171-1176.

- Montarsi F, Martini S, Michelutti A, Da Rold G, Mazzucatu M, Qualizza D, Gennara D, et al. The invasive mosquito *Aedes japonicus japonicus* is spreading in northeastern Italy. *Parasite & Vectors*. 2019; 12, 120.
- Monteiro LR, Reis SF. *Princípios de morfometria geométrica*. São Paulo: Holos Editora. 1999.
- Muller GA & Marcondes CB. Bromeliad-associated mosquitoes from Atlantic forest in Santa Catarina Island, southern Brazil (Diptera: Culicidae) with new records for the State of Santa Catarina. *Ilheringia, Sér Zool*. 2006. 96(3): 315-319.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GA, Kent J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*. 2000. 403 (6772), 853.
- Navarro JC, Del Ventura F, Zorrilla A, Liria J. Registros de mayor altitud para mosquitos (Diptera: Culicidae). *Ver Biol Trop*. 2010. 58 (1).
- Navarro JC, Liria J. Phylogenetic relationship among eighteen neotropical Culicini species. *J Am Mosq Control Assoc*. 2000; 16 (2): 75-85.
- Norris DE. Mosquito-borne Diseases as a Consequence of Land Use Change. *Eco-Health*. 2004; 1,19-24. doi:10.1007/s10393-004-0008-7.
- O'Meara GF, Cutwa MM, Evans LE. Bromeliad - inhabiting mosquitoes in south Florida: native and exotic plants differ in species composition. *J Vector Ecol*. 2003; 28: 37-46.
- Pecor JE, Jones J, Turrel MJ, Fernandez R, Carbajal, O'Guinn M, Sardalis M, Watts D. et al. Checklist of mosquitoes species in Peru. *J Am Mosq Control Assoc*. 2000; 16(3): 210-218.
- Pessoa SB, Galvão ALA. Notas sobre algumas espécies de mosquitos que se criam em bromélias (Diptera: Culicidae). *Rev Biol Hyg*. 1936. 6:79-90.
- Petersen V, Virginio F, Suesdek L. Polymorphism in male genitalia of *Aedes (Ochlerotatus) scapularis* Rondani, 1848. *Bull Entomol Res*. 2018. 108, 1 -4.
- Ravindra K & Dayanand DNK. *Multivariate Data Reduction and discrimination with SAS Software*. 2000.
- Ribeiro AF, Urbinatti PR, Duarte AMRC, Paula MB, Pereira DM, LF Mucci, et al. Mosquitoes in degraded and preserved areas of the Atlantic Forest and potential for vector-borne disease risk in the municipality of São Paulo, Brazil. *J Vector Ecol*. 2012; 37 (2): 316-24.
- Rohlf FJ, Marcus LF. A revolution morphometrics. *Trends Ecol & Evo*. 8 (4): 129-132.
- Rossi GC, Harbach RE. *Phytotelmatomyia*, a new Neotropical subgenus of *Culex* (Diptera: Culicidae). *Zootaxa*. 2008. 1879, 1-17
- Root FM. Studies on Brazilian mosquitoes. III. The genus *Culex* . *Am J Hyg*. 1927. 7:574-598.
- Rozeboom LE & Komp WHM. A new *Microculex elongatus* from Colômbia, with notes on the subgenus. *Proc Ent Soc Wash*. 1950. 52(3); 147-157.

- Sá ILR, Huthcings RSG, Huchings RW, Sallum MAM. Revision of the Atratus Group *Culex (Melanoconion)* (Diptera: Culicidae). Parasites & Vectors. 2020, 13:269.
- Sallum MAM, Forattini OP. Revision of the Spissipes Section of *Culex*. J Am Mos Control Assoc. 1996. 12 (3) 517 -600.
- Sallum MAM, Foster PG, Santos CLSD, Flores DC, Motoki MT, Bergo ES. Resurrection of two species from synonymy of *Anopheles (Nyssorhynchus) strodei* Root, and characterization of a distinct morphological form from the Strodei Complex (Diptera: Culicidae). J Med Ent. 2010. 47, 504-526.
- Santos SC, Pie Mr, Rocha TC, Navarro-Silva A. Molecular identification of blood meals in mosquitoes (Diptera: Culicidae) in urban and forested habitats in southern, Brazil. PloS One; 14(2), e02 125 17.
- Silva JS, Lopes Cm, Guimarães AE, Mello CF, Alencar J. Diversity of mosquitoes at the Itatiaia National Park, State of Rio de Janeiro, Brazil. J Am Mosq Control Assoc. 2017; 33(4), 270-275.
- Smith LB. Bromeliaceae. Vol. XII. Primera Parte. Instituto Botánico, Dirección de Recursos Naturales Renovables. 1971. Ministerio de Agricultura y Cría, Caracas, Venezuela.
- Song H & Wenzel JW. Mosaic pattern of genital divergence in three populations of *Schistocerca lineata* Scudder, 1899 (Orthoptera: Acrididae: Cyrtacanthacridinae). Biol J Linne Soc. 94, 289-301.
- Sorensen T. A method of establishing groups of equal amplitude in plant sociology based on similarity of species and its application to analyses of the vegetation on Danish commons. Biol skr. 1948; 5,1-34.
- Stein M, Alvarez CN, Alonso AC, Bangher DN, Willener JA, Campos RE. New records of mosquitoes (Diptera: Culicidae) found in phytotelmata in Northern Argentina. Zootaxa. 2018. 4399 (1): 087-100.
- Stein M, Almeida FL, Willener JA, Almirón WR. Classification of immature mosquito species according to characteristics of the larval habitat in the subtropical province of Chaco, Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011. 106: 400-407.
- Stein M, Juri MJD, Oria GL, Ramirez PG. *Aechmea distichantha* (Bromeliaceae) epiphytes, Potential new habitat for *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) collected in the Province of Tucumán, Northwestern Argentina. Florid Entomol. 2013. 96(3): 1202-1206.
- Souza ALS, Multini LC, Marrelli MT, Wilke ABB. Wing morphometrics identification of mosquito species (Diptera: Culicidae) of neglected epidemiological importance. Acta Tropica. 2020; Nov; 211:105593. doi: 10.1016/j.actatropica.2020.105593.
- Talaga S, Duchemin, Girod R, Dusfour I. The *Culex* mosquitoes (Diptera: Culicidae) of French Guiana: A comprehensive review with the description of three new species. J Med Ent. 2020. Vol 20 (20)
- Theobald FV. A Monograph of the Culicidae of the World. Vol 3. 1903.

- Theobald FV. A Monograph of the Culicidae of the World. General notes.1907
- Torres-Gutierrez, Bergo ES, Emerson KJ, Oliveira TMP, Greni S, Sallum MAM. Mitochondrial COI gene as a tool in the taxonomy of mosquitoes *Culex* subgenus *Melanoconion*. Acta Tropica. 2016. 164; 137-149.
- Vanwambeke SO, Lambin EF, Eichhorn EF, Flasse SP, Harbach RE, Oskam L, et al. Impact of land-use change on dengue and malaria in northern Thailand. EcoHealth. 2007; 4(1), 37-51. doi: 10.1007/s10393-007-0085-5.
- Vesgueiro FT, Demari-Silva B, Malafronte RS, 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). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2011.06: 1-8.
- Zelditch ML, Swiderski DL, Sheets HD. Geometric morphometrics for biologists: a primer. Academic Press. 2012.
- Weaver SC.. Urbanization and geographic expansion of zoonotic arboviral disease: mechanism and potential strategies for prevention. Trends Microbiol. 2013. 21 (8): 360-3.
- Wilke ABB, Christie RO, Multini LC, Vidal PO, Wilk-da-Silva R, Carvalho GC, Marrelli MT. Morphometric wing characters as a tool for mosquito identification. PloS One. 2016. 1(8). E0161643.doi:10.1371/journal.pone.0161643.
- Wilke ABB, Vasques C, Petrie W, Caban-Martinez, Beier AJ. Construction sites in Miami-Dade County, Florida are highly favorable environments for vector mosquitoes. Plos One. 2018; 13(12), e0209625.doi:10.1371/journal.pone.0209625.
- WHO. Global programme to eliminate lymphatic filariasis (GPELF). 2010 Progress Report 2000 – 2009 and Strategic Plan 2010-2020.
- WHO. Malaria entomology and vector control: Guide for participants. World Health Organization. 2013a. ISBN 978-92-4-150581-9.
- WHO. Lymphatic filariasis: managing morbidity and preventing disability: na aide memory for national programme managers. World Health Organization. 2013b. ISBN 978-92-4-150529-1.
- WRBU 202 – site Walter Reed Biosystematics Unit – Systematic Catalog of Culicidae. Acessado em..... <http://www.mosquitocatalog.org/default.aspx?pgID=2>



## Distribution of *Culex (Microculex)* (Diptera: Culicidae) in forest cover gradients

Rafael Oliveira-Christe<sup>a,\*</sup>, Antonio Ralph Medeiros-Sousa<sup>b</sup>, Aristides Fernandes<sup>b</sup>, Walter Ceretti-Júnior<sup>b</sup>, Mauro Toledo Marrelli<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Institute of Tropical Medicine, University of São Paulo, Av. Dr. Eneas Carvalho de Aguiar 470, São Paulo, SP, Brazil

<sup>b</sup> Department of Epidemiology, School of Public Health, University of São Paulo, Av. Dr. Arnaldo 715, São Paulo, SP, Brazil

### ARTICLE INFO

**Keywords**  
*Microculex*  
 Forest cover  
 Domiciliation  
 Culicidae

### ABSTRACT

*Microculex* is a subgenus of wild mosquitoes belonging to genus *Culex*, closely related to preserved environments. Its immature forms are generally associated with natural breeding sites, especially bromeliads. Recent years have witnessed the presence of some *Microculex* species in anthropic environments, including immature forms in artificial breeding sites, which may represent an adaptive tendency. This study aimed to investigate the variation in the abundance and dispersal of *Microculex* species in environments with different forest cover proportions. Three sites with different proportions of plant cover (60%, 70%, and 90%) were selected in an environmental protection area in the city of São Paulo, with varying degrees of modification and human presence. Collection was performed from March 2015 to April 2017, targeting bromeliads and artificial containers. Variations in the species' richness, composition, and abundance in different environments were analyzed. Variations in mean abundance and larval density between the different forest cover gradients were analyzed with generalized linear mixed-effects models. A total of 1,028 specimens belonging to 14 species were collected. Richness and composition were similar across the environments. *Culex (Mcx.) imitator* and *Cx. (Mcx.) pleuristriatus* were the most abundant species. The results showed a relationship between forest cover reduction and an increase in larval abundance and density for *Cx. (Mcx.) pleuristriatus*. *Cx. (Mcx.) imitator* showed a decrease in larval abundance related to a reduction in forest cover. Species from Pleuristriatus Series were found both in bromeliads and in artificial breeding sites. The findings emphasize that the *Microculex* Group of mosquitoes is not limited to preserved environments, but that some species such as *Cx. (Mcx.) pleuristriatus* appear to be well-adapted to areas impacted by human activity, colonizing artificial breeding sites, which may suggest a possible domiciliation process.

### 1. Introduction

Urbanization is the most drastic form of use and exploitation of natural environments, causing significant changes in the landscape and resulting in a mosaic with different plant cover profiles (Alberti and Marzluff, 2004). The decrease in species richness in these environments has been observed following the increase in the abundance of a few species adapted to these sites. Many of these species are urban pests or arthropod vectors of human diseases (McKinney, 2002; Medeiros-Sousa et al., 2017; Johnson and Munshi-South, 2017).

One of the ecosystems most affected by increasing human activity is the Atlantic Forest (Schäffer and Prochnow, 2002; Tabarelli et al., 2010), which extends from Northeast Brazil to Paraguay, accompanying the coastline. Although reduced to only 7% of its original area, the Atlantic Forest is still considered one of the planet's most important hotspots (Myers et al., 2000; Marrelli et al., 2007; Laporta et al., 2013). From 5 to 12% of the Atlantic Forest in Brazil is in Environmen-

tal Protection Areas, consisting mostly of small forest patches (Tabarelli et al., 2010). Ecological reserves have been created by the Brazilian government with the aim of preserving the forest's remnants (Medeiros-Sousa et al., 2013; 2017).

In epidemiological problems associated with disorderly urbanization, adapted mosquitoes proliferate due to the increase in artificial breeding sites (Edman, 1988). Human invasion and degradation of natural environments can also favor the adaptation of some mosquitoes found naturally in wild environments, including species of subgenus *Microculex*. However, there is little information on the competence of this subgenus for harboring and transmitting etiological agents.

*Microculex* is one of the 13 subgenera in genus *Culex* (Diptera: Culicidae) found in South and Central America (Harbach, 2011). This subgenus includes 33 described species (Ortega-Morales et al., 2018), most of which separated into four Groups (Pleuristriatus, Imitator, Consolator, and Inimitabilis), beside others not allocated to any of these Groups (Lane, 1953; Cotrim and Galatti, 1977; Lourenço-de-

\* Corresponding author.

E-mail address: [rchriste@usp.br](mailto:rchriste@usp.br) (R. Oliveira-Christe)

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105264>

Received 17 July 2019; Received in revised form 29 October 2019; Accepted 9 November 2019

Available online xxx

0001-706/© 2019.

Oliveira and Silva, 1987). Although *Microculex* species breed almost exclusively in bromeliads (Forattini, 1965), these species have been also found in tree holes and bamboos, and studies have also reported a trend of some species to use artificial breeding sites or bromeliads in anthropized areas (Forattini et al., 1997; Ceretti-Junior et al., 2015).

Due to the lack of information and knowledge on the response by this Group of mosquitoes to the environmental changes from human activities, this study aimed to investigate variations in the richness, composition, and abundance of mosquito species from subgenus *Microculex* in environments with different forest cover proportions (inversely, proportions of anthropic use), located on the outskirts of the city of São Paulo, Brazil.

**2. Material and methods**

From March 2015 to April 2017, bromeliads, tree holes, and artificial containers were examined for *Microculex* larvae and pupae in APA Capivari-Monos, an environmental protection area in the city of São Paulo. Three sites were selected, based on the forest cover proportions in the Marsilac District as a reflection of the anthropic impact on each site. The study adopted a 1 km buffer around the sample sites, and forest cover proportion was measured (Fig. 1). The study sites were:

**Site 1.** Marsilac – a village surrounded by the EPA forest, near a railroad line (23° 54.395' S/46° 42.486' W), and considered the environment with the highest degree of anthropization. The site displays 60% forest cover around the sampling site.

**Site 2.** Transition Zone – a private property near Marsilac village, constituting a transitional area between a rural environment and the

EPA forest (23° 54.556' S/46° 42.167' W). Topographic measurements indicate that this site has 70% forest cover around the sampling site.

**Site 3.** Cachoeira do Marsilac – a private property in the EPA forest adjacent to a waterfall with a visitation area (23° 56.378' S/46° 41.659' W); the place was selected as representing the area with the lowest human impact, with 90% native forest cover.

In these localities, we examined 1 terrestrial (Site 1) and 10 epiphytic (*Vriesea* (Subfamily: Tillandsioidea) bromeliads (4 in Site 1, 2 in Site 2 and 4 in Site 3) and 1 tree hole (Site 1), typical natural larval habitats of *Microculex*. Artificial containers such as tires (3, restricted to Site 1), water tanks (1, restricted to Site 1), and plastic recipients (1 in Site 2; 1 in Site 3) were also examined. The procedure was repeated once a month, frequently in the same natural and artificial breeding sites. Manual suction samplers with a capacity of 500 ml were used to collect the water in the bromeliads and tree holes, and a 40 ml larval dipper was used in the artificial containers.

The larvae and pupae were transported to the Entomology Laboratory, School of Public Health, University of São Paulo (LESP/FSP/USP), where they were monitored until reared into adults and later identified to the species level. Larval and pupal exuviae were mounted on slides with Canada Balsam to assist identification. Whenever possible, male genitalia were dissected and analyzed to confirm species diagnosis. Specialized keys were used in the morphological identification (Lane and Whitman, 1951; Lane, 1953; Cotrim and Galati, 1977). For investigation on similarity species composition among differently study sites, Sorensen Index was utilized. This Index varies from 0 to 1, how much closer to 1, more species similarity between sites (Sorensen, 1948). The analyses were performed for all

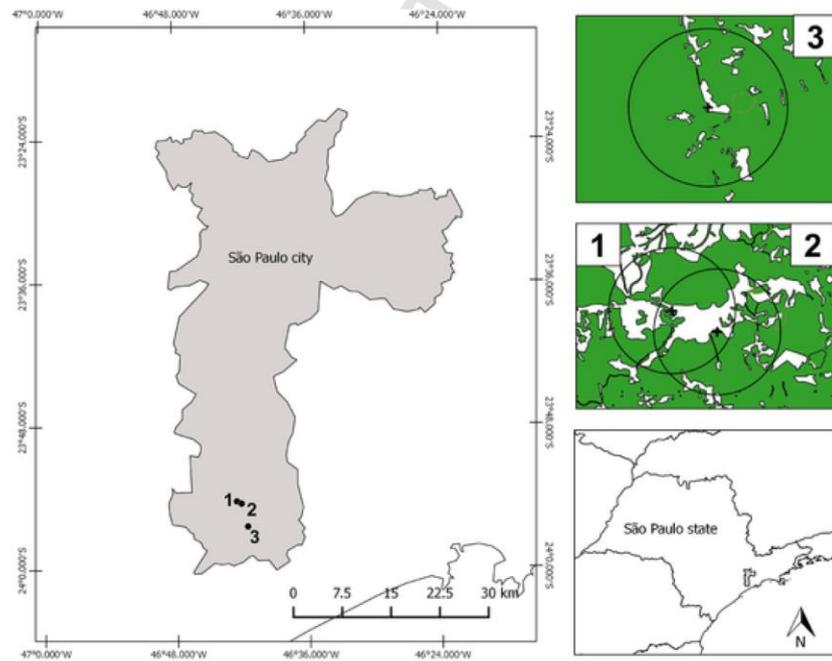


Fig. 1. Map of the city of São Paulo, Brazil, showing the sites where *Microculex* mosquitoes were collected. Green represents the forest cover (dense ombrophilous or heterogeneous forest) and white represents areas with human activity (roads, rural properties, or villages). Crosses inside the circles indicate collection points. Circles represent a 1 km buffer around the collection points. The map was created using QGIS v2.18.9 (<http://www.qgis.org>).

the mosquitoes in subgenus *Microculex* and for the two most abundant species collected in the study, *Cx. (Mcx.) imitator* and *Cx. (Mcx.) pleuristriatus*. Mean larval abundance (number of individuals divided by the number of breeding sites examined) and larval density (estimated individuals per 1000 ml of water extracted from bromeliads and artificial containers) were considered response variables. Since the samples collected at each site represent pseudo-replicates (repeated measures over time at the same site), generalized linear mixed-effects models were used (Chaves, 2010). Thus, the fixed effect was represented by the proportion of forest cover (60%, 70%, and 90%) and the random effect by the different collection months. Since the response variables represent abundance data, we opted to use Poisson errors (log link). The selected models were verified for independence of residuals, overdispersion, and presence of zero-inflated data (Dupuy, 2018). In all cases, the models showed adequate fit to the expected behavior. All analyses were performed in the R computational environment (R Development Core Team, 2018) with the support of the lme4 (Bates et al., 2016) and DHARMA (Hartig, 2018) packages.

### 3. Results

During the study period, 14 species from subgenus *Microculex* were collected in the sampling sites as a whole. The specimens were collected mainly in bromeliads, with some in artificial containers, but none were found in tree holes. Of the 1028 specimens collected, *Cx. (Mcx.) pleuristriatus* and *Cx. (Mcx.) imitator* were the most abundant species, representing 39.54% and 19.86% of the total, respectively (Table 1). *Cx. (Mcx.) albipes* and *Cx. (Mcx.) neglectus*, both belonging to the *Pleuristriatus* Series of *Microculex*, showed reasonable frequency in all the places, sometimes more abundant than *Cx. (Mcx.) imitator*, as in site 3 (the site with 90% forest cover).

The number of species or taxa found in each environment was the same (11), showing few differences in the species composition. Based on the Sorensen similarity Index, site 1 (with 60% forest cover) and site 2 (with 70% forest cover) were more similar in species composition than site 3 (Table 2)

Only specimens from the *Pleuristriatus* Series were collected in artificial breeding sites, including *Cx. (Mcx.) albipes* (8) in a water tank; *Cx. (Mcx.) aureus* (9) in a truck tarpaulin, and *Cx. (Mcx.) pleuristriatus*, (81) in discarded tires. Although *Cx. (Mcx.) albipes* and *Cx. (Mcx.) pleuristriatus* were found both in bromeliads and artificial breeding sites, *Cx. (Mcx.) aureus* specimens were only found in artificial containers and were limited to site 3.

*Cx. (Mcx.) aphyllactus* was only found in site 1. *Cx. (Mcx.) aureus* and *Cx. (Mcx.) davisii* were only found in site 3 (Waterfall), and *Mcx. lanei* was only found in site 2. *Cx. (Mcx.) aphyllactus*, *Cx. (Mcx.) aureus*, *Cx. (Mcx.) daumasturus*, *Cx. (Mcx.) inimitabilis*, *Cx. (Mcx.) davisii*, and *Cx. (Mcx.) lanei* were found rarely, with fewer than 1% of the specimens in all the sites.

In relation to the mixed-effects model used to investigate the influence of the proportion of remaining forest cover on larval density and mean abundance of *Microculex* mosquitoes, the data indicate that the response depends on the species and the type of abundance variable considered (Table 3). For *Cx. (Mcx.) imitator*, larval density was significantly lower in environments with less forest cover (60%) than in those with higher forest cover (90%). However, when the response variable was the mean number of larvae per breeding site, no difference was observed between the environments (Table 3; Fig. 2a and b). For *Cx. (Mcx.) pleuristriatus* the response of larval density to forest cover variation differed from *Cx. (Mcx.) imitator*, since there was a significant increase in larval density in the environment with less forest cover (60%) compared to the more preserved environment (90%). The same was true for mean larval abundance in the environment with less forest cover (60%) and the intermediate environment (70%) for *Cx. (Mcx.) pleuristriatus*, showing a significant increase compared to

**Table 1**  
Specimens of *Microculex* subgenus collected from March 2015 to April 2017, according to the breeding sites and localities.

Species	Site 1	Site 2	Site 3	Total
<i>Cx. (Mcx.) albipes</i>	60	40	33	133
Artificial Container	8			8
Epiphyte Bromeliad	17	40	33	90
Ground Bromeliad	35			35
<i>Cx. (Mcx.) aphyllactus</i>	3			3
Ground Bromeliad	3			3
<i>Cx. (Mcx.) aureus</i>			9	9
Artificial Container			9	9
<i>Cx. (Mcx.) daumasturus</i>	4	2		6
Epiphyte Bromeliad	4	2		6
<i>Cx. (Mcx.) davisii</i>			2	2
Epiphyte Bromeliad			2	2
<i>Cx. (Mcx.) dubitans</i>	19	10	15	44
Epiphyte Bromeliad	13	10	15	38
Ground Bromeliad	6			6
<i>Cx. (Mcx.) fuscatus</i>	8	11	3	22
Epiphyte Bromeliad	7	11	3	21
Ground Bromeliad	1			1
<i>Cx. (Mcx.) gr.imitator</i>	28	20	26	74
Epiphyte Bromeliad	20	20	26	66
Ground Bromeliad	8			8
<i>Cx. (Mcx.) imitator</i>	84	26	100	210
Epiphyte Bromeliad	54	26	100	180
Ground Bromeliad	30			30
<i>Cx. (Mcx.) inimitabilis</i>	2	4	1	7
Epiphyte Bromeliad		4	1	5
Ground Bromeliad	2			2
<i>Cx. (Mcx.) lanei</i>		2		2
Epiphyte Bromeliad		2		2
<i>Cx. (Mcx.) neglectus</i>	19	13	17	49
Epiphyte Bromeliad	14	13	17	44
Ground Bromeliad	5			5
<i>Cx. (Mcx.) pleuristriatus</i>	322	51	37	410
Artificial Container	78	3		81
Epiphyte Bromeliad	75	36	37	148
Ground Bromeliad	169	12		181
<i>Cx. (Mcx.) worontzowi</i>	8	20	29	57
Epiphyte Bromeliad	8	20	29	57
<b>Total</b>	<b>557</b>	<b>199</b>	<b>272</b>	<b>1028</b>

**Table 2**  
Sorensen Indices showing the similarity between sites 1, 2, and 3.

Index of Similarity (Sorensen)	Site 3	
	Site 1	Site 2
Site 1	0.81818	0.90909
Site 3		0.81818

the more preserved environment (90%) (Table 3; Fig. 2c and d). Likewise, the total number of *Microculex*, specimens also showed a positive response in larval density and mean abundance per breeding site in relation to the reduction in the forest cover in the study sites (Table 3; Fig. 2e and f).

### 4. Discussion

Anthropogenic impact on the environment can affect mosquito populations by creating new conditions for their reproduction, facilitating the introduction of exotic species or promoting adaptability of native ones. In this scenario, the potential for increasing pathogen transmis-

Table 3

Values for the parameters used in mixed-effects models to investigate the response in larval density and mean larval abundance of subgenus *Microculex* to variation in the proportion of forest cover. P-values indicate statistical significance of differences between "low" and "intermediate" and "high" forest cover. Standard errors of estimates are shown in parentheses.

Response variables	Species	Explanatory variables			Standard deviation of random intercepts (months)
		Fixed effect			
		High forest cover - intercept (intercept)	Intermediate forest cover - intercept difference	Low forest cover - intercept difference	
Estimated larval density per 1000 ml	<i>Cx. (Mcx.) imitator</i>	1.011 (0.197)	-0.957 (0.407) <i>p</i> = 0.018	-0.559 (0.229) <i>p</i> = 0.015	0.621
	<i>Cx. (Mcx.) pleuristriatus</i>	0.703 (0.246)	0.459 (0.278) <i>p</i> = 0.098	0.922 (0.231) <i>P</i> < 0.001	0.553
	Total <i>Culex (Microculex)</i>	2.149 (0.119)	0.516 (0.085) <i>P</i> < 0.001	0.296 (0.084) <i>P</i> < 0.001	0.507
Mean larval abundance	<i>Cx. (Mcx.) imitator</i>	0.936 (0.140)	0.113 (0.263) <i>p</i> = 0.665	0.004 (0.209) <i>p</i> = 0.981	0
	<i>Cx. (Mcx.) pleuristriatus</i>	0.988 (0.227)	0.624 (0.237) <i>p</i> = 0.008	0.952 (0.205) <i>P</i> < 0.001	0.586
	Total <i>Culex (Microculex)</i>	0.926 (0.154)	0.251 (0.167) <i>p</i> = 0.134	0.650 (0.151) <i>P</i> < 0.001	0.473

sion has drawn growing attention (Amerasinghe and Ariyaseena, 1990; Chang et al., 1997; Lindblade et al., 2000; Norris, 2004; Matthys et al., 2006; Vanwambeke et al., 2007; Abelha-Medrano et al., 2015; Carvalho et al., 2017). Adaptation by native Brazilian mosquitoes to environments modified by humans has already been reported (Forattini et al., 1989, 1997). This process can be more explicit in notable disease vectors such as *Aedes albopictus* (Ayllón et al., 2018), *Ae. aegypti*, and *Cx. quinquefasciatus*, whose oviposition behavior is highly associated with artificial containers (Forattini, 2002).

Loss of forest cover not only leads to a decrease in biodiversity and isolation of some mosquito species (Grime, 1973; Connel, 1978), but can also contribute to an increase in arbovirus circulation (Foley et al., 2005). Several studies have documented the human alterations to environments that create the conditions for adapted mosquito species to explore new breeding sites (Wilke et al., 2018; Montarsi et al., 2019). Our results show that *Microculex* species have the capacity to perform oviposition in bromeliads located in environments altered by humans, as previously documented by Ceretti-Junior et al. (2015), as well as occupying artificial breeding sites, evidencing an adaptation to environments that have undergone loss of vegetation and anthropization.

The finding of *Cx. (Mcx.) pleuristriatus* in artificial containers was initially documented by Kumm and Novis, 1938) and later confirmed by other authors (Forattini et al., 1997; Lourenço-de-Oliveira et al., 1986). In the present study, *Cx. (Mcx.) pleuristriatus* was found in abandoned tires, plastic cups, and a truck tarpaulin. *Cx. (Mcx.) albipes* and *Cx. (Mcx.) aureus* were also found in artificial containers, with *Cx. (Mcx.) albipes* breeding in a water tank and *Cx. (Mcx.) aureus* breeding in a plastic vase. Lourenço-de-Oliveira et al., 1986 were the first to observe *Cx. (Mcx.) gairus* in artificial breeding sites, in association with *Li. durhami* and *Cx. quinquefasciatus*. This may be evidence that some species in the Pleuristriatus Series have a tendency to adapt to im-

pected environments with loss of forest cover, migrating from bromeliads to artificial breeding sites. *Culex (Mcx.) davisii* and *Cx. (Mcx.) lanei* (belonging to the Pleuristriatus Series) were only found in bromeliads, probably because the species are less adapted to modified environments.

Few studies have analyzed the ecological characteristics of mosquitoes from subgenus *Microculex*. Some authors have differed in their definition of the habitat's characteristics for this subgenus, as sylvatic or intermediate environments (Anjos and Navarro-Silva, 2008; Marchi et al., 2010; Silva et al., 2017). Our study found that some species in subgenus *Microculex* were associated with well-preserved forest cover, such as *Cx. (Mcx.) aureus* and *Cx. (Mcx.) davisii*, while others such as *Cx. (Mcx.) pleuristriatus* and *Cx. (Mcx.) imitator* were found in environments with different forest cover gradients. This suggests that the degree of adaptation to modified or preserved environments is species-dependent in this subgenus. In relation to preferred larval habitats, no individuals from subgenus *Microculex* were found in tree holes, although Dorvillé et al. (1996) had indicated *Microculex* spp. as tree hole breeders. Rather, we found most of these mosquitoes in bromeliads, thus corroborating other studies (Lane, 1953; Muller and Marcondes, 2006; Marques et al., 2012; Ceretti-Junior et al., 2015).

Correa et al. (2014) demonstrated that high richness and diversity of culicids are linked to high plant cover, due to the increase in potential natural breeding sites. Likewise, two forest habitats revealed more mosquito species than a peri-domiciliary zone in Kenya (Lounibos, 1981). Our findings suggested few changes in the richness and composition of *Microculex* mosquitoes between different forest cover gradients, and that even under recent anthropization, some *Microculex* species showed an adaptive capacity to colonize bromeliads in more modified sites, as well as artificial breeding sites, while others still appeared to be limited to less altered environments.

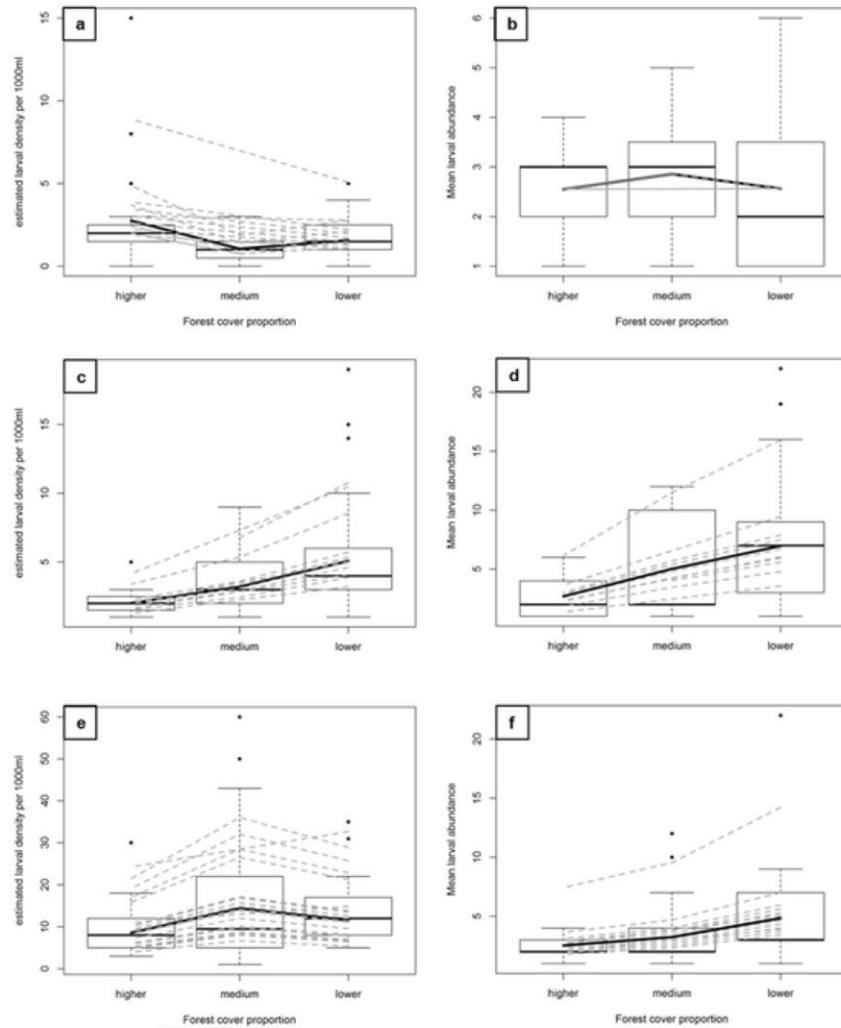


Fig. 2. Graphs showing variation in larval density (a, c, and e) and mean larval abundance (b, d, and f) of species from subgenus *Microculex* in relation to forest cover proportion. Solid black lines represent the models' mean prediction, and dashed gray lines represent random variation (related to monthly variations). In a and b, prediction for *Cx. (Mcx.) imitator*; in c and d predictions for *Cx. (Mcx.) pleuristriatus*; in e and f predictions for subgenus *Microculex* (all species).

Importantly, this study did not examine sites with less than 60% forest cover, thus limiting the observations' scope for the faunistic distribution of *Microculex* in sites with different forest cover gradients. As a topic for future studies, the replication of this study in other areas of Atlantic Forest with similar characteristics can provide important support for the current observations. Due to the abundance of bromeliads in the study area, only a small portion of these phytotelmas were examined. However, the sampling allowed identifying the *Microculex* fauna present in these areas. Evidence shows that some mosquito species are specifically associated with certain bromeliad gender (Marques et al., 2012), but the taxonomic identification of the bromeliads and their potential association with collected species was beyond the study's scope.

Of the 14 species observed, 11 were found in the three environments studied. Of these species, only *Cx. imitator* has evidence of adaptation to impacted environments in the city of Sao Paulo (Ceretti-Junior et al., 2015). Ecological data for *Microculex* is scarce, and the evidence of species adaptation is limited. More studies about ecological valence of this subgenus are needed.

Less is known about the hematophagous habits of *Microculex* species. Lutz and Lutz (1939) observed frogs being bitten by *Cx. (Mcx.) imitator* and *Cx. (Mcx.) pleuristriatus* in bromeliads. Under laboratory conditions, Lourenço-de-Oliveira et al. (1986) replicated this observation with *Cx. (Mcx.) imitator* and *Cx. (Mcx.) gairus*, confirming the tendency for these mosquitoes to be attracted to frogs, even when prep-

tiles, birds, rodents, and human volunteers are available. Santos et al. (2019) demonstrated species from subgenus *Microculex* engorged with blood from birds and amphibians, but their study did not identify the mosquitoes to the species level. *Culex (Mxc.) pleuristriatus* collected in a protected area were found to feed on the blood of birds and rodents (Alencar et al., 2015), indicating eclectic blood-sucking behavior in this species. The finding suggests the possibility of such hematophagous behavior in other subgenus species. This scenario highlights the relevance of future studies on the capacity of *Microculex* species to maintain enzootic pathogen cycles. There are still few studies on the hematophagous behavior of *Microculex* species under natural conditions.

## 5. Conclusion

Our results reinforce the need for further studies on the adaptive capacity of subgenus *Microculex* to areas where forest cover has been suppressed by human activity. The findings emphasize that the *Microculex* Group is not limited to preserved environments, and that some species such as *Cx. (Mxc.) pleuristriatus* appear to be well-adapted to areas impacted by human activity, colonizing artificial breeding sites, suggesting a possible domiciliation process, even though this does not necessarily mean that their presence is exclusive to impacted environments. It is necessary to elucidate the capacity of *Microculex* species to harbor and transmit pathogens to humans and other animals, since previous studies have shown that environmental alterations can lead to mosquito domiciliation and impact pathogen transmission dynamics (Forattini et al., 1987; 1989).

## Declaration of Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Acknowledgments

The authors wish to thank the São Paulo State Research Foundation (FAPESP 2014/50444-5) and Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq-301466/2015-7) for their financial support. ROC holds a PhD scholarship from FAPESP (2017/02342-7). We also wish to express our gratitude to the field teams at Division for the Control of Endemic Diseases, São Paulo Zoonosis Control Center, and the School of Public Health, University of São Paulo: Ana Maria Ribeiro de Castro Duarte, Luis Felipe Mucci, João Carlos do Nascimento, Paulo Frugoli dos Santos, Luis Milton Bonafé, Antônio Waldomiro de Oliveira, Laércio Molinari, Gabriel Marcelino Neto, Luiz Sposito Jr, Renildo Souza Teixeira, Daniel Pagotto Vendrami, Gabriela Cristina de Carvalho, Ramon Wilk da Silva, Eduardo Evangelista, and Amanda Alves Camargo.

## References

- Abelha-Medrano, C.A., Ibáñez-Bernal, S., MacGregor-Fors, I., Santiago-Alarcon, D., 2015. Spatiotemporal variation of mosquito diversity (Diptera: Culicidae) at places with different land-use types within a neotropical montane cloud forest matrix. *Parasit. Vectors* 8 (487). doi:10.1186/s13071-015-1086-9.
- Alberti, M., Marzluff, J., 2004. Ecological resilience in urban ecosystems: linking urban patterns to human and ecological functions. *Urban Ecosyst.* 7, 241–265.
- Alencar, A., Mello, F.C., Gil-Santana, H.R., Giupponi, A.P.D., Araújo, N.A., Lorosa, E.S., Guimarães, A.E., Silva, J.S., 2015. Feeding patterns of mosquitoes (Diptera: culicidae) in the Atlantic Forest, Rio de Janeiro, Brazil. *J. Med. Entomol.* 1–6.
- Amerasinghe, F.P., Ariyasena, T.G., 1990. Larval Survey of Surface Water-Breeding Mosquitoes During Irrigation Development in the Mahaweli Project, Sri Lanka. *J. Med. Entomol* 5 (27), 789–802. doi:10.1093/jmedent/27.5.789.
- Anjos, A.F., Navarro-Silva, M.A., 2008. Culicidae (Insecta: Diptera) em área de Floresta Atlântica, no Estado do Paraná. *Brasil. Acta Sci. Biol. Sci.* 30 (1), 23–27.
- Ayllón, T., Câmara, D.C., Morone, F.C., Gonçalves, L.S., Barros, F.S., Brasil, P., Carvalho, M.S., Honório, N.A., 2018. Dispersion and oviposition of *Aedes albopictus* in a Brazilian slum: Initial evidence of Asian tiger mosquito domiciliation in urban environments. *PLoS ONE* 4 (13). doi:10.1371/journal.pone.0195014.
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., Walker, S., Christensen, R.H.B., Singmann, H., et al., 2016. Package lme4: linear mixed-effects models using Eigen and S4. *R. Found. Stat. Comput.* 1, 1–113.
- Carvalho, G.C., Ceretti-Junior, W., Barrio-Nuevo, K.M., Wilk-da-Silva, R., Christe, R.O., Paula, M.B., Vendrami, D.P., Multini, L.C., Evangelista, E., Camargo, A.A., Souza, L.F., Wilke, A.B.B., Medeiros-Sousa, A.R., Marrelli, M.T., 2017. Composition and diversity of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in urban parks in the South regions of the city of São Paulo. *Biota Neotropica* 2 (12). doi:10.1590/1676-0611-BN-2016-0274.
- Ceretti-Junior, W., Medeiros-Sousa, A.R., Wilke, A.B.B., Strobel, R.C., Orico, L.D., Teixeira, R.S., Marques, S., Marrelli, M.T., 2015. Mosquito faunal survey in a central park of the city of São Paulo, Brazil. *J. Am. Mosquito Control Assoc.* 31 (2), 172–177.
- Chang, M.S., Hii, J., Buttner, P., Mansoor, F., 1997. Changes in abundance and behaviour of vector mosquitoes induced by land use during the development of an oil palm plantation in Sarawak. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 91 (4), 382–386.
- Chaves, L.F., 2010. An entomologist guide to demystify pseudoreplication: data analysis of field studies with design constraints. *J. Med. Entomol.* 47, 291–298.
- Connell, J.H., 1978. Diversity in tropical rain forests and coral reefs: high diversity of trees and corals is maintained in a non-equilibrium state. *Science* 199, 1302–1310.
- Correa, F.F., Gleiser, R.M., Leite, P.J., Fagundes, E., Gil-Santana, H.R., Mello, C.F., Gredilha, R., Alencar, J., 2014. Mosquito (Diptera: Culicidae) communities in Nova Iguaçu Natural Park Rio De Janeiro, Brazil. *J. Am. Mosquito Control Assoc.* 30, 83–90. PMID:25102590.
- Cotrim, M.D., Galati, E.A.B., 1977. Revisão da série Pleuristriatus do subgênero Microculex Theobald, 1907 (Diptera, Culicidae). *Rev. Bras. de Entomol., São Paulo* 20 (3/4), 169–205. v.n.
- Dupuy, J.-F., 2018. *Statistical Methods for Overdispersed Count Data*. 1st Ed. Elsevier, Amsterdam.
- Dorville, L.F.M., 1996. Mosquitoes as bioindicators of forest degradation in Southeastern Brazil. a statistical evaluation of published data in the literature. *Stud. Neotrop. Fauna Environ.* 31 (2), 68–78.
- Edman, J.D., 1988. Disease control through manipulation of vector-host interaction: some historical and evolutionary perspectives. In: Scott, T.W., Grunstrup-Scott, J. (Eds.), *Proceedings of a Symposium: The Role of Vector-Host Interactions in Disease Transmission*, #68, Miscellaneous publication, pp. 43–50. Entomological Society of America.
- Foley, J.A., DeFries, R., Asner, G.P., Barford, C., Bonan, G., Carpenter, S.R., Chapin, F.S., Coe, M.T., Daily, G.C., Gibbs, K.G., Helkowski, J.K., Holloway, T., Howard, E.A., Kucharik, C.J., Monfreda, C., Patz, J.A., Prentice, C., Ramankutty, N., Snyder, P.K., 2005. Global Consequences of Land Use. *Science* 309 (570). doi:10.1126/science.1111772.
- Forattini, O.P., 1965. *Entomologia médica*. In: Faculdade De Higiene e Saúde Pública. EDUSP, São Paulo.
- Forattini, O. P., 2002. In: *Culicidologia Médica*. Edusp.
- Forattini, O.P., Gomes, A., de, C., Natal, D., Kakitani, I., Marucci, D., 1987. Preferências alimentares de mosquitos Culicidae no Vale do Ribeira, São Paulo. *Ver. Saúde Pública*, S. Paulo 21, 171–187.
- Forattini, O.P., Gomes, A.C., Natal, D., Kanitani, I., Marucci, D., 1989. Preferências alimentares e domiciliação de mosquitos Culicidae no Vale do Ribeira, São Paulo, com especial referência a *Aedes scapularis* e *Culex* (Melanoconion). *Ver. Saúde Pública*, S. Paulo 23 (1), 9–19. 1989.
- Forattini, O.P., Kakitani, I., Sallum, M.A.M., 1997. Breeding places of *Aedes scapularis* (Diptera: Culicidae) in artificial containers. *Rev. Saúde Pública* 31 (5), 519–522.
- Grime, J.P., 1973. Competitive exclusion in herbaceous vegetation. *Nature* 242, 344–347.
- Harbach, R.E., 2011. Classification within the cosmopolitan genus *Culex* (Diptera: Culicidae): the foundation for molecular systematics and phylogenetic research. *Acta Trop.* 120 (1–2), 1–14.
- Hartig, F., 2018. DHARMA: residual diagnostics for hierarchical (Multi-Level / mixed) regression models. R Package version 0.2.0.
- Johnson, M.T.J., Munshi-South, J., 2017. Evolution of life in urban environments. *Science* 358. eaam8327. doi:10.1126/science.aam8327.
- Kumm, H.W., Novis, O., 1938. Mosquito studies on the Ilha do Marajó, Pará, Brazil. *Am. J. Hyg* 27, 498–515.
- Lane, J., 1953. In: *Neotropical Culicidae*, 2. Ed. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.
- Lane, J., Whitman, L., 1951. The subgenus "Microculex" in Brazil (Diptera, Culicidae). *Rev. Bras. Biol.* 11 (3), 341–366.
- Laporta, G.Z., Prado, P.L.K.L., Kraenkel, R.A., Coutinho, R.M., Sallum, M.A.M., 2013. Biodiversity can help prevent malaria outbreaks in tropical forests. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7 (3), e2139. doi:10.1371/journal.pntd.0002139.
- Lindblade, K.A., Walker, E.D., Onapa, A.W., Katungu, J., Wilson, M.L., 2000. Land use change alters malaria transmission parameters by modifying temperature in a high-land area of Uganda. *Trop. Med. Int. Health* 5 (4), 263–274.
- Lounibos, L.P., 1981. Habitat segregation among African treehole mosquitoes. *Ecol. Entomol.* 6, 129–154.
- Loureiro-de-Oliveira, R., Heyden, R., Silva, T.F., 1986. Alguns Aspectos da Ecologia dos Mosquitos (Diptera: Culicidae) de Uma Área de Planície (Granjeiras Calábria), em Jacarepaguá, Rio de Janeiro. *V. Criadouras. Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 81 (3), 265–271.
- Loureiro-de-Oliveira, R., Silva, T.F.D., 1987. *Culex siphonulatus*, a new species of mosquito from the coast of Rio de Janeiro State, Brazil (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 82 (1), 101–110.
- Lutz, A., Lutz, B., 1939. Notes on the genus *Phyllomedusa* wagneri. Observations on small *Phyllomedusae* without vomerine teeth or conspicuous parotids found in the regions of Rio de Janeiro. III – Mosquitos biting batrachians and phragmosis in casque-headed frog. *Anais Acad. Bras. Ciênc.* II, 250–256.
- Marchi, J.M., Muller, G.A., Marcondes, C.B., 2010. Mosquitos (Diptera: Culicidae) de uma Futura Unidade de Conservação em Área de Mata Atlântica no Sul do Brasil. *Entomobrasiliis* 3 (2), 34–37. <http://www.periodico.ebras.bio.br/ojs>.

- Marques, T.C., Bourke, B.P., Laporta, G.Z., Sallum, M.A.M., A.M., 2012. Mosquito (Diptera: Culicidae) assemblages associated with *Nidularium* and *Vriesea* bromeliads in Serra do Mar, Atlantic Forest, Brazil. *Parasit. Vectors* 5 (41). doi:10.1186/1756-3305-5-41.
- Marrelli, M.T., Malafonte, R.S., Sallum, M.A.M., Natal, D., 2007. *Kerteszia* subgenus of *Anopheles* associated with the Brazilian Atlantic rainforest: current knowledge and future challenges. *Malaria J. (Online)* 6, 127. v.
- Matthys, B., Goran, E.K.N., Koné, M., Koudou, B.G., Vounatsou, P., Cissé, G., Tschannen, A.B., Tanner, M., Utzinger, J., 2006. Urban agricultural land use and characterization of mosquito larval habitats in a medium-sized town of Côté d'Ivoire. *Journal of Vector Ecology* 31 (2), 319–334. doi:10.3376/1081-1710(2006)31[319:UALUAC]2.0.CO;2.
- McKinney, M.L., 2002. Urbanization, biodiversity, and conservation. the impacts of urbanization on native species are poorly studied, but educating a highly urbanized human population about these impacts can greatly improve species conservation in all ecosystems. *Bioscience* 52 (10), 883–890.
- Medeiros-Sousa, A.R., Ceretti, W., Urbinatti, P.R., De Carvalho, G.C., De Paula, M.B., Fernandes, A., Matos-Junior, M.O., Orico, L.D., Araujo, A.B., Nardi, M.S., Marrelli, M.T., 2013. Mosquito fauna in municipal parks of São Paulo City, Brazil: a preliminary survey. *J. Am. Mosquito Control Assoc.* 29 (3), 275–280.
- Medeiros-Sousa, A.R., Fernandes, A., Ceretti-Junior, W., Wilke, A.B.B., Marrelli, M.T., 2017. Mosquitoes in urban green spaces: using an island biogeographic approach to identify drivers of species richness and composition. *Sci. Rep.* 7 (1), 17826.
- Montarsi, F., Martini, S., Michelutti, A., Da Rold, G., Mazzucato, M., Qualizza, D., Genaro, D., Di Fant, M., Dal Pont, M., Palei, Capelli, G., 2019. The invasive mosquito *Aedes japonicus japonicus* is spreading in northeastern Italy. *Parasit. Vectors* 12, 120.
- Muller, G.A., Marcondes, C.B., 2006. Bromeliad-associated mosquitoes from Atlantic forest in Santa Catarina Island, southern Brazil (Diptera: Culicidae), with new records for the State of Santa Catarina. *Ilheringia, Sér. Zool.* 96 (3), 315–319.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Da Fonseca, G.A., Kent, J., 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403 (6772), 853.
- Norris, D.E., 2004. Mosquito-borne Diseases as a Consequence of Land Use Change. *EcoHealth* 1, 19–24. doi:10.1007/s10393-004-0008-7.
- Ortega-Morales, A., Garza-Hernández, J.A., González-Álvarez, V.H., Hernández-Triana, L.M., Rodríguez-Pérez, M.A., 2018. First record of *Culex (Microculex) daunstocampa* (Diptera: Culicidae) in Mexico, with notes on *CX. rejector* and *CX. imitator*. *Neotrop. Entomol.* 47 (4), 577–581.
- R Development Core Team, 2018. R - A language and environment for statistical computing. In: R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria Available at: <http://www.R-project.org> Accessed 22 Set 2018.
- Santos, S.C., Pie, M.R., Rocha, T.C., Navarro-Silva, A., 2019. Molecular identification of blood meals in mosquitoes (Diptera: Culicidae) in urban and forested habitats in southern Brazil. *PLoS ONE* 14 (2). e0212517.
- Silva, J.S., Lopes, C.M., Guimarães, A.E., Mello, C.F., Alencar, J., 2017. Diversity of mosquitoes at the Itatiaia National Park, State of Rio de Janeiro, Brazil. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 33 (4), 270–275.
- Sorensen, T., 1948. A method of establishing groups of equal amplitude in plant sociology based on similarity of species and its application to analyses of the vegetation on Danish commons. *Biol. Skr.* 5, 1–34.
- Schäffer, W.B., Prochnow, M., 2002. Atlantic forest. In: Schäffer, W.B., Prochnow, M. (Eds.), *The Atlantic and you: How to preserve, Restore and Benefit from the Most Endangered Brazilian forest*. Aprehavi, Brasília, pp. 12–45.
- Tabarelli, M., Aguiar, A.V., Ribeiro, M.C., Metzger, J.P., Peres, C.A., 2010. Prospects for biodiversity conservation in the Atlantic Forest: lessons from aging human-modified landscapes. *Biol. Conserv.* 143 (10), 2328–2340.
- Vanwambeke, S.O., Lambin, E.F., Eichhorn, M.P., Flasse, S.P., Harbach, R.E., Oskam, L., Somboon, P., van Eeers, S., van Benthem, B.H.B., Walton, C., Butlin, R.K., 2007. Impact of land-use change on dengue and malaria in northern Thailand. *EcoHealth* 4 (1), 37–51. doi:10.1007/s10393-007-0085-5.
- Wilke, A.B.B., Vasques, C., Petrie, W., Caban-Martinez, A.J., Beier, C.J., 2018. Construction sites in Miami-Dade County, Florida are highly favorable environments for vector mosquitoes. *PLoS ONE* 13 (12), e0209625. doi:10.1371/journal.pone.0209625.

## Scientific Note

Using geometric morphometric analysis of wings to identify mosquito species from the subgenus *Microculex* (Diptera: Culicidae)Rafael Oliveira-Christe<sup>1</sup> and Mauro Toledo Marrelli<sup>1,2</sup>✉<sup>1</sup>Institute of Tropical Medicine, University of São Paulo, Av. Dr. Eneas Carvalho de Aguiar 470, São Paulo, SP, Brazil, Mmarelli@usp.br<sup>2</sup>Department of Epidemiology, School of Public Health, University of São Paulo, Av. Dr. Arnaldo 715, São Paulo, SP, Brazil

*Microculex* is a subgenus of *Culex* that occurs in Central and South America (Lane and Whitman 1951). Species from this subgenus are usually found in natural aquatic sites, such as within tree holes, cut bamboos, and bromeliads (Dorville 1996, Cotrim and Galati 1977). In recent years, some species of this subgenus have been found in bromeliads in areas impacted by human action and in artificial larval habitats, indicating a tendency for these species to adapt to areas where there is a loss of vegetation cover. There is no strong evidence that species of the subgenus *Microculex* are vectors of causative agents of diseases as knowledge of their blood-feeding preferences and vectorial capacity is scarce (Oliveira-Christe et al. 2020). The difficulty in identifying *Microculex* species correctly has been reported in several studies (Marques et al. 2012, Marteis et al. 2017) and may be due to the lack of recent taxonomic studies of this group and the fact that the morphological characteristics of adults overlap strongly (Cotrim and Galati 1977).

Correct identification of mosquito species is crucial in epidemiological studies and the development of efficient control strategies (Wilke et al. 2016) and can increase the number of species registered in biodiversity studies. Wing geometric morphometrics has been used successfully as an auxiliary taxonomic tool to identify several genera and subgenera of mosquitoes (Wilke et al. 2016, Demari-Silva et al. 2017). The present study therefore sought to test the hypothesis that wing geometric morphometrics is an effective auxiliary tool for the correct identification and confirmation of some *Microculex* species.

The study was conducted in the Capivari-Monos Environmental Protection Area (EPA), which extends over 251 km<sup>2</sup> in the Atlantic Forest in the extreme south of the city of São Paulo, Brazil. Larvae and pupae of five species of subgenus *Microculex* [*Cx. (Mcx.) pleuristriatus* (N=30), *Cx. (Mcx.) albipes* (N=10), *Cx. (Mcx.) lanei* (N=7), *Cx. (Mcx.) imitator* (N=20), and *Cx. (Mcx.) worontzowi* (N=18)] were collected monthly in bromeliads at one site in the EPA (23° 54.395' S/ 46° 42.486' W) throughout 2018. The larvae and pupae were reared in artificial recipients with water from their natural breeding sites until the adult stage, when they were identified by the morphology of adult and larval exuviae (Lane and Whitman 1951, Cotrim and Galati 1977). The right wing of each adult female mosquito was removed and mounted between a microscope slide and a cover slip and then photographed under 40x magnification, always by the

same observer (R. Oliveira-Christe), with a Leica DFC320 digital camera coupled to a Leica S6 microscope. Eighteen landmarks on each wing image were digitized using TpsDig V1.40 (Dujardin et al. 2010, Oliveira-Christe et al. 2019).

The centroid size (CS) for each species was measured with MorphoJ 1.02. Multivariate regression of the Procrustes coordinates on CS with 100,000 randomizations was conducted to assess the allometric influence of wing size on wing shape. The degree of wing dissimilarity was analyzed by canonical variate analysis (CVA). Cross-validated reclassification was carried out for each species with MorphoJ 1.02 to evaluate the degree of dissimilarity between samples based on Mahalanobis distances. Each individual was reclassified according to the wing shape similarity of each group. Wireframe graphs were plotted in MorphoJ to compare the level of wing deformation between the species. Mean CS differed significantly between species (ANOVA: F (18.87),  $p < 0.01$ ), and after removal of allometry (4.91%,  $p < 0.001$ ) CVA of wing shape showed that the individuals were clustered in three clearly separate groups in the morphospace (Figure 1A). CVA of only members of the *Pleuristriatus* Group showed wing shape variation for the three species, which clustered in three separate groups (Figure 1B). The variation in Mahalanobis distance between *Microculex* species was 2.4004–6.3171. All of these comparisons were statistically significant ( $p < 0.001$ ).

The wireframe graph produced with a scale factor of 10.0 (Figure 2A) reveals variations in all the landmarks, with clear, high heterogeneity in landmarks 1 and 2. The entire wing edge (landmarks 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) and interior wing landmarks (landmarks 12, 13, 14, 15) showed considerable variation. For a better individual comparison of species, *Cx. (Mcx.) imitator* was compared with *Cx. (Mcx.) worontzowi* only, and then *Cx. (Mcx.) pleuristriatus*, *Cx. (Mcx.) albipes*, and *Cx. (Mcx.) lanei* were compared with each other and another wireframe was constructed. The variation in landmarks between *Cx. (Mcx.) imitator* and *Cx. (Mcx.) worontzowi* is shown in Figure 2B. The heterogeneity can be seen in landmarks 1, 9, 10, and 11, and when these are compared with the general wireframe this heterogeneity is evident. In the wireframe analysis performed with only *Cx. (Mcx.) pleuristriatus*, *Cx. (Mcx.) albipes*, and *Cx. (Mcx.) lanei* (Figure 2C), a great variation in the general wireframe, particularly in landmarks 1, 2, 9, 16, 17, and 18, can be observed. Landmarks 11 and 12 do not show any variation.

Cross-validated reclassification was able to identify

Table 1. Cross-validated reclassification scores (%) for the five *Microculex* species.

		Group 2				
		<i>Cx.(Mcx.) imitator</i>	<i>Cx.(Mcx.) worontzowi</i>	<i>Cx.(Mcx.) pleuristriatus</i>	<i>Cx.(Mcx.) albipes</i>	<i>Cx.(Mcx.) lanei</i>
Group 1	<i>Cx.(Mcx.) imitator</i>	X	<b>94</b>	<b>80</b>	<b>75</b>	71
	<i>Cx.(Mcx.) worontzowi</i>	<b>100</b>	X	<b>83</b>	55	44
	<i>Cx.(Mcx.) pleuristriatus</i>	<b>90</b>	<b>83</b>	X	60	<b>86</b>
	<i>Cx.(Mcx.) albipes</i>	55	55	72	X	<b>85</b>
	<i>Cx.(Mcx.) lanei</i>	<b>90</b>	71	<b>85</b>	70	X

species accurately when these were compared one by one (Table 1). In five comparisons of Group 1 vs Group 2 (species in each row vs species in each column in Table 1) the values were higher than 75%, and in one comparison [*Cx. (Mcx.) imitator* X *Cx. (Mcx.) worontzowi*] the species were distinguished with an accuracy of 100%. In six comparisons of Group 2 vs Group 1 the values were higher than 75%, and when *Cx. (Mcx.) worontzowi* and *Cx. (Mcx.) imitator* were compared the accuracy was 94%. These values indicate a difference in wing-shape patterns between females of the last two species. In contrast, some comparisons resulted in lower values, e.g., *Cx. (Mcx.) worontzowi* X *Cx. (Mcx.) lanei* (44%), indicating a similar wing-shape pattern.

Females from the subgenus *Microculex* are particularly difficult to identify by classical taxonomy (Lane and Whitman 1951). Auxiliary tools, such as wing geometric morphometrics, are very useful in this field, and our results confirm their effectiveness in distinguishing members of subgenus *Microculex*.

In the CVA morphospace of the five species studied here,

three separate groups can be observed. The singularity of *Cx. (Mcx.) imitator* and *Cx. (Mcx.) worontzowi* in relation to *Cx. (Mcx.) pleuristriatus*, *Cx. (Mcx.) albipes*, and *Cx. (Mcx.) lanei* in the Pleuristriatus Group can also be observed (Figure 1B). The CVA of the Pleuristriatus Group alone shows a clear separation between the three species of this group studied here. Since these species belong to the same group and adults are morphologically identical when classified by dichotomous keys, this finding may contribute to taxonomic studies of this group. Although the larvae of species in the Pleuristriatus Group studied here provide more reliable characteristics for traditional morphological identification (Cotrim and Galati 1977), this process is more laborious and requires that each adult be correctly associated with its respective larva, as in the present study.

Cross-validation scores, which in most comparisons exceeded 70%, underline the applicability of this technique to the identification of morphologically similar species. While *Cx. (Mcx.) imitator* and *Cx. (Mcx.) worontzowi* can be distinguished with relative accuracy using the bristle pattern

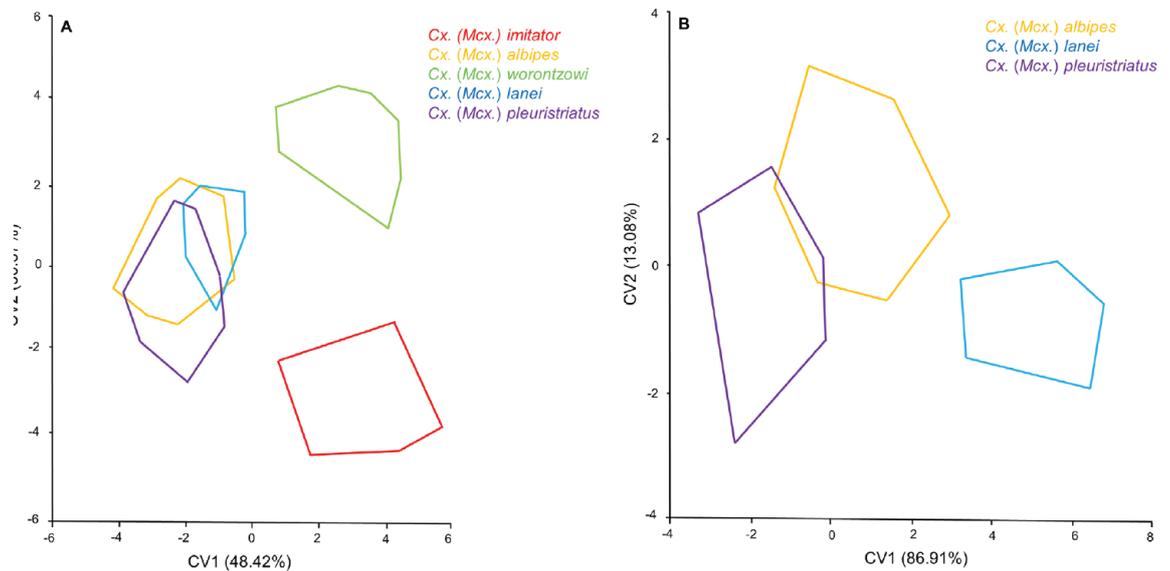


Figure 1. Morphospace produced by CVA of wing shape of *Microculex* species. **A.** Comparison of CVA for the five species of subgenus *Microculex*. **B.** Comparison of the three species in the Pleuristriatus Group.

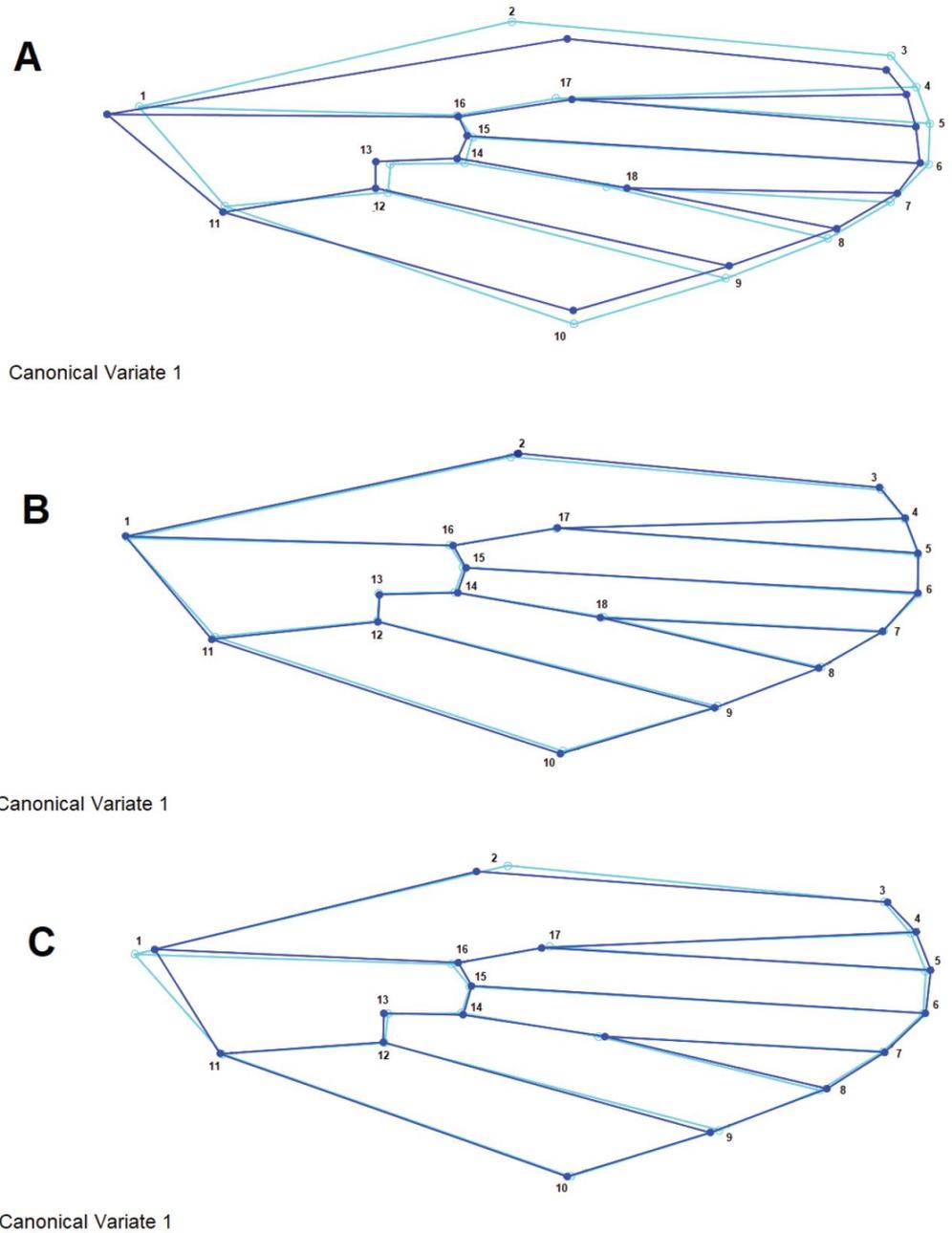


Figure 2. Superimposed Canonical Variate 1 wireframe graphs (Scale Factor 10.0). The light blue lines represent the mean wing shape variation for the species and the dark blue lines represent the shape variation based on CV1. **A.** *Cx. (Mcx.) imitator*, *Cx. (Mcx.) worontzowi*, *Cx. (Mcx.) pleuristriatus*, *Cx. (Mcx.) albipes* and *Cx. (Mcx.) lanei*. **B.** *Cx. (Mcx.) imitator*, and *Cx. (Mcx.) worontzowi*. **C.** *Cx. (Mcx.) pleuristriatus*, *Cx. (Mcx.) albipes* and *Cx. (Mcx.) lanei*.

in the mesonotum and the presence/absence of white rings in the tarsomeres (Lane and Whitman 1951), some collection procedures can damage this feature. For species in the Pleuristriatus Group, the bristle pattern overlaps completely (Cotrim and Galatti 1977).

The variation in wing shape in the *Microculex* species in this study, even in the case of species that were to date believed to be morphologically identical, such as *Cx. (Mcx.) pleuristriatus* and *Cx. (Mcx.) albipes*, suggests fixed evolutionary changes as species that diverged recently do not have distinct wing shapes (Gómes and Correa 2017). While the small samples used here for *Cx. (Mcx.) lanei* (7) and *Cx. (Mcx.) albipes* (10) can indicate low reliability in population comparisons (Adams et al. 2012), in taxonomic studies where differences between samples are large and evident, a small number of individuals may be sufficient (Drake and Klingenberg 2010). Although the underlying mechanisms that determine shape variations in wing veins have not been clarified to date, evolutionary adaptations resulting from species-specific ecology or behavior are probably involved (Combes and Daniel 2003). However, there is to date no consensus on which genes have an influence on wing-shape pattern. However, it is reasonable to assume that severe changes in wing-venation pattern may affect mosquito flight. Our results and those of previous studies indicate that these variations can be used for morphological identification of mosquito groups, subgroups, and species (Wilke et al. 2016, Demari-Silva et al. 2017).

Despite the lack of studies showing a preference of *Microculex* species for certain bromeliad species as breeding sites, this group of plants has been reported to be the most effective natural breeding site for these species (Oliveira-Christe et al. 2019). Nevertheless, representatives of the Pleuristriatus Group have been found in artificial breeding sites in recent years, which may point to adaptation of these species to human-impacted environments (Oliveira-Christe et al. 2019). To our knowledge, there is no evidence that any *Microculex* species can be a vector of pathogens affecting humans, but this may be explained by the lack of studies on the taxonomy, blood-feeding habits, and vectorial capacity of these species.

*Microculex* is a subgenus composed of 34 described species (Harbach 2011), most of which are found only in wild environments and some only in low abundance. Only a few species are found in human-impacted environments, suggesting that human impact has an influence on the distribution of species in this subgenus. However, the species used in this experiment are mostly found in altered environments, as reported by Oliveira-Christe et al. (2019), and sampling was adequate for statistical evaluation. The results of the present study indicate that wing geometric morphometrics can successfully be used as an auxiliary tool to identify not only species recognized as vectors of pathogens, but also wild mosquitoes, such as members of the *Microculex* subgenus. The technique could be of benefit to taxonomists as it is easy to use, affordable, and produces concrete results, allowing the number of species identified in biodiversity and epidemiological studies to be increased.

#### Acknowledgments

The authors thank the São Paulo State Research Foundation (FAPESP 2014/50444-5) and Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq-301466/2015-7) for their financial support. ROC holds a Ph.D. scholarship from FAPESP (2017/02342-7). We also wish to express our gratitude to the field teams at the Division for the Control of Endemic Diseases, São Paulo Zoonosis Control Center, and the School of Public Health, University of São Paulo: Ana Maria Ribeiro de Castro Duarte, Luis Felipe Mucci, João Carlos do Nascimento, Paulo Frugoli dos Santos, Luis Milton Bonafé, Antônio Waldomiro de Oliveira, Laércio Molinari, Gabriel Marcelino Neto, Luiz Sposito Jr., Renildo Souza Teixeira, Daniel Pagotto Vendrami, Gabriela Cristina de Carvalho, Ramon Wilk da Silva, Eduardo Evangelista, Amanda Alves Camargo, and Aristides Fernandes.

#### REFERENCES CITED

- Adams, D.C., F.J. Rohlf, and D.E. Slice. 2012. A field come of age: geometric morphometrics in the 21<sup>st</sup> Century. *Italian J. Mammal.* 24: 7-14.
- Combes, S.A. and T.L. Daniel. 2003. Flexural stiffness in insect wings I. Scaling and influence of wing venation. *J. Exp. Biol.* 206: 2979-2987. doi:10.1242/jeb.00523.
- Cotrim, M.D. and E.A.B. Galati. 1977. Revisão da série Pleuristriatus do subgênero *Microculex Theobald*, 1907 (Diptera, Culicidae). *Rev. Bras. Entomol.* 20: 169-205.
- Demari-Silva, B., L.C. Multini, L. Suesdek, T.M.P. Oliveira, M.A.M. Sallum, and M.T. Marrelli. 2017. Wing morphometric and genetic variability between *Culex coronator* and *Culex usquatus* (Diptera: Culicidae) two sibling species of the Coronator Group. *J. Med. Entomol.* 54: 901-908.
- Dorvillé, L.F.M. 1996. Mosquitoes as bioindicators of forest degradation in Southeastern Brazil, a statistical evaluation of published data in the literature. *Stud. Neotrop. Fauna Environ.* 31: 68-78.
- Drake, A.G. and C.P. Klingenberg. 2010. Large scale diversification of skull shape in domestic dogs: disparity and modularity. *Am. Nat.* 175: 289-301.
- Dujardin, J.P., D. Kaba, and A.B. Henry. 2010. The exchangeability of shape. *BMC Res. Notes.* 3: 266.
- Gómes, G.F. and M.M. Correa. 2017. Discrimination of Neotropical *Anopheles* species used on molecular and wing geometric morphometric traits. *Inf. Gen. Evol.* 54: 379-386.
- Harbach, R.E. 2011. Classification within the cosmopolitan genus *Culex* (Diptera: Culicidae): the foundation for molecular systematics and phylogenetic research. *Acta Trop.* 120 (1-2): 1-14.
- Lane, J. and L. Whitman. 1951. The subgenus "*Microculex*" in Brazil (Diptera, Culicidae). *Rev. Bras. Biol.* 11: 341-366.
- Marques, T.C., B.P. Bourke, G.Z. Laporta, and M.A.M. Sallum. 2012. Mosquito (Diptera: Culicidae) assemblages associated with *Nidularium* and *Vriesea* bromeliads in Serra do Mar, Atlantic Forest, Brazil. *Parasit. Vectors* 5:

41. doi:10.1186/1756-3305-5-41.
- Marteis, M.S., D. Natal, M.A.M. Sallum, A.R. Medeiros-Sousa, and R. La Corte. 2017. Mosquitoes of the Caatinga: 2. Species from periodic sampling of bromeliads and tree holes in a dry Brazilian forest. *Acta Trop.* 171: 114-123.
- Oliveira-Christe, R.O., M.T. Marrelli, P.O. Vidal, D.P. Vendrami, and A.B.B. Wilke. 2019. Assessment of the microgeographic population structure of *Aedes fluavittilis* (Diptera: Culicidae) using wing geometric morphometrics. *Entomol. Gen.* 39: 183-191.
- Oliveira-Christe, R., A.R. Medeiros-Sousa, A. Fernandes, W. Ceretti-Júnior, and M.T. Marrelli. 2020. Distribution of *Culex (Microculex)* (Diptera: Culicidae) in forest cover gradients. *Acta Trop.* 202: 105264. doi:10.1016/j.actatropica.2019.105264.
- Wilke, A.B.B., R. Oliveira-Christe, L.C. Multini, P.O. Vidal, R. Wilk-da-Silva, G.C. Carvalho, and M.T. Marrelli. 2016. Morphometric wing characters as a tool for mosquito identification. *PLoS One* 11 (8), e0161643.