**Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública**

**Caracterização de populações de *Anopheles
darlingi* (Diptera: Culicidae) do Brasil por
estruturas da morfologia externa dos ovos, das
asas e por sequências gênicas**

Maysa Tiemi Motoki

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Saúde Pública para
obtenção do título em Doutor em Saúde
Pública**

Área de concentração: Epidemiologia

**Orientadora: Profa. Dra. Maria Anice
Mureb Sallum**

**São Paulo
2012**

**Caracterização de populações de *Anopheles darlingi*
(Diptera: Culicidae) do Brasil por estruturas da
morfologia externa dos ovos, das asas e sequências
gênicas**

Maysa Tiemi Motoki

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Saúde Pública para
obtenção do título em Doutor em Saúde
Pública**

Área de concentração: Epidemiologia

**Orientadora: Profa. Dra. Maria Anice
Mureb Sallum**

**São Paulo
2012**

É expressamente proibida a comercialização deste documento tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da tese.

Dedico este trabalho

*aos meus pais Arthur e Ivone
com gratidão e muito amor,*

*aos meus irmãos Jefferson e
Jacqueline que me acompanham
nesta trajetória e compartilham
comigo este momento de alegria e
satisfação,*

*e à minha querida sobrinha
Maria Clara que está sempre no
meu coração...*

AGRADECIMENTOS

A conclusão deste estudo exigiu não somente os meus esforços como também a cooperação e apoio de muitas pessoas. Este documento comprova tudo isso. Por isso aproveito a oportunidade para agradecer a todas as pessoas que foram fundamentais para este estudo...

Em primeiro lugar, agradeço à Profa. Dra. Maria Anice Mureb Sallum, minha orientadora também nesta jornada, por me orientar por todos esses anos (quase 8 anos!), pela oportunidade de viver intensamente a experiência da especialização, do mestrado e do doutorado, pela disponibilidade e muita paciência nas horas de dúvidas, pelo incentivo constante. Os valiosos ensinamentos intelectuais e morais serão lembrados, continuamente, durante toda a minha vida;

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de doutorado concedida (Processo 2007/07573-5) e apoio financeiro pelo Projeto Temático (Processo 05/53973-0); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (processo CNPq BPP 300351/2008-9 para MAMS);

Ao Pesquisador Dr. Eduardo Bergo pelos ensinamentos no trabalho de campo e principalmente, por colaborar nas coletas dos espécimes utilizados neste estudo;

Ao Prof. Dr. Lincoln Suesdek, pela participação no exame de qualificação e agora no exame de defesa, pela valiosa colaboração nos manuscritos de morfometria geométrica de asas e morfometria de ovos, pela leitura criteriosa e sugestões na realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Paulo Ribolla, pela participação no exame de qualificação, pelos comentários e sugestões, pela contribuição no meu projeto de doutorado;

Ao Prof. Dr. Mauro T. Marrelli, membro da banca examinadora, pelas estimadas sugestões e palavras de apoio durante todos esses anos;

Ao Dr. Alexandre Peixoto, membro da banca examinadora, pela leitura crítica deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Ricardo Lourenço de Oliveira, membro da banca examinadora, pelos comentários e sugestões na elaboração deste trabalho;

À Profa. Dra. Jan Conn pela disponibilidade e oportunidade concedida em finalizar as análises moleculares em seu laboratório - Griffin Laboratory em

Albany, Estados Unidos; pelas discussões e questionamentos que me incentivaram a pensar num contexto maior sobre a importância dos mosquitos;

Aos coordenadores, professores e alunos do XIII Seminário Laveran & Deane sobre Malária 2008. Agradeço pela oportunidade da experiência compartilhada, o aprendizado, as críticas, as sugestões e os comentários ajudaram muito na realização deste trabalho. Em especial ao Dr. Cláudio Daniel Ribeiro e às minhas queridas tutoras Dra. Martha Suárez Mutis e Dra. Mércia Eliane de Arruda pela afetuosa atenção durante o seminário;

À profa. Dra. Cecília Moratore por permitir o uso do microscópio eletrônico de varredura no Instituto de Física IF/USP sem o qual este trabalho não seria finalizado;

À Dra. Simone Ladeia (IOC) e Sr. Nelson pelos ensinamentos e boa convivência durante a coleta na região Amazônica, experiência única que “carrego na minha bagagem” com muito carinho;

Aos professores da Faculdade de Saúde Pública, cujos ensinamentos e afetuosa atenção estarão sempre comigo;

Ao prof. Dr. Pedro Gnaspini pelas valiosas aulas de sistemática;

À Sara Bickersmith por todo auxílio durante minha estadia no Griffin Laboratory em Albany;

À Naomi Mckeen pela ajuda no manuseio dos programas no Griffin Laboratory em Albany;

À Viviane do depto internacional da FSP/USP, por me ajudar com as informações para solicitação do visto americano;

Ao Daniel Corujedo Flores pelas fotografias em microscópio eletrônico de varredura (MEV);

À Paloma Vidal e Fabio Almeida (Instituto Butantan) por me auxiliarem nos primeiros passos nas análises de morfometria geométrica da asa;

As secretárias Dora, Palmira, Rita, Valéria e Vanessa pelas orientações prestadas durante todos esses anos e pelos momentos de descontração;

Às secretárias Renilda, Vânia e Cidinha pela prontidão e generosidade em todas as orientações disponibilizadas durante todo período e pelos momentos de descontração;

Ao Paschoal Roberto Peduto e Rodrigo Sportello pela assistência prestada em todos estes anos;

Ao MSc. Aristides Fernandes, Dra. Marcia Bicudo, Dr. Paulo Roberto Urbinatti, Rosa, Dr. Walter Cerretti pelos ensinamentos, auxílios e pelas boas conversas de descontração;

Ao Dr. Brian Bourke, por me auxiliar nos primeiros passos nas análises de genética de populações, pelas discussões e pela amizade;

Ao MSc. Gabriel Laporta pela prontidão em me ajudar na montagem dos mapas utilizados no manuscrito e na tese, pela boa convivência durante todos esses anos;

À Dra. Rossana Veronica Mendonza Lopez, sempre disponível em me ajudar nas interpretações das análises estatísticas e principalmente pela amizade;

À amiga MSc. Sandra Nagaki por me ajudar na montagem das figuras dos manuscritos, por estar sempre pronta a me ouvir, pelo carinho e amizade;

À MSc. Tatiane Porangaba por me ajudar sempre que precisei no laboratório de sistemática molecular;

Às amigas MScs. Agda de Oliveira, Bruna Demari, Edlaine Vilela, Fabiana Tavares, Rosário Avellaneda pelo carinho nos momentos difíceis, pela afetuosa atenção e principalmente pela amizade;

Ao pessoal do laboratório Caio Moreira, Denise Sant'ana, Dulce Galati Rosa, Ivy Luiz de Sá, Leonardo Suveges, Dr. Pedro Pedro, MSc. Tatiani Marques, MSc. Paulo Coutinho e mais recente Luana por me auxiliar quando precisei, pela boa convivência e por proporcionar momentos alegres de descontração;

Aos amigos, Francis W. Vanini, Vanessa Bastos, Claudionor Spinelli, Elisa Anze, Juliana Alves, Leandro Machado de Moura, Natália Marangão, Rafael Casati que são tão importantes na minha vida;

Ao Martin pelo inestimável apoio e por todo incentivo principalmente na finalização da minha tese;

Por fim agradeço aos meus pais e irmãos; meus exemplos de vida, minha base, pela simplicidade que encaram a vida, os fazem tão especiais. Pela dedicação, incentivo e apoio nas minhas escolhas e em tudo o que faço...

RESUMO

Motoki, MT. Caracterização de populações de *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) do Brasil por estruturas da morfologia externa dos ovos, das asas e por sequências gênicas [tese de doutorado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2012.

Introdução - A malária é uma das principais doenças humanas do mundo e afeta principalmente as populações pobres em regiões tropicais e subtropicais onde as condições ambientais são favoráveis tanto para a proliferação dos agentes etiológicos como dos mosquitos vetores. No Brasil, *An. darlingi* é considerado vetor primário de plasmódios humanos. Devido à importância médica, esse inseto tem sido objeto de campanhas de controle populacional. No entanto, não foi considerada a ocorrência de microevolução em *An. darlingi* e consequentemente, a possibilidade de populações diferentes apresentarem características biológicas distintas. **Objetivo** – Verificar a presença de variabilidade genética e morfológica em populações de *An. darlingi* no Brasil. **Metodologia** - Foram analisados e comparados 26 atributos da morfologia externa de ovos de nove populações, bem como a morfometria geométrica da forma alar de espécimes de 10 localidades diferentes de *Anopheles darlingi*. Além disso, foram empregadas sequências do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade I (COI) para analisar a estrutura populacional de *An. darlingi*. **Resultados e Conclusão** – Apesar dos atributos dos ovos apresentarem variação, somente as amostras de Tocantins e Pará foram diferenciadas das demais populações. As variações nas estruturas externas dos ovos são provavelmente adaptativas, com influência de fatores ambientais, como temperatura, umidade e disponibilidade de alimento para as fêmeas. A comparação da morfometria geométrica da asa demonstrou que existe maior

similaridade entre as populações da costa (estados do Espírito Santo e Rio de Janeiro) e do interior (estados de São Paulo e Paraná) da Mata Atlântica e diferenciação das demais populações, do cerrado (estados de Goiás e Tocantins), do norte do rio Amazonas (estados do Amazonas e Amapá), e do sul do rio Amazonas (estados de Mato Grosso e Pará). As análises de COI demonstraram diferenciação das populações da costa da Mata Atlântica em relação às demais populações do Brasil central, Amazônia e Mata Atlântica do interior. O padrão da diversidade de haplótipos de COI, os testes de neutralidade e a distribuição de diferenças pareadas indicaram recente expansão demográfica. A distância geográfica, as ecorregiões e fatores ambientais podem provavelmente limitar a dispersão da espécie, tendo alguma influência sobre a estrutura populacional de *An. darlingi*.

Palavras-chave: genética de populações, *An. darlingi*, geometria da asa, microscópio eletrônico de varredura, exocório do ovo, citocromo oxidase subunidade I

ABSTRACT

Motoki, MT. Caracterização de populações de *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) do Brasil por estruturas da morfologia externa dos ovos, das asas e por sequências gênicas / Characterization of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) populations from Brazil by external morphological structure of eggs, wings and gene sequences [thesis]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2012.

Introduction – Malaria is a major human disease that primarily affects poor persons in tropical and subtropical regions where environmental conditions are favorable to the proliferation of the etiological agent as well as vector mosquitoes. In Brazil, *Anopheles darlingi* is considered a primary vector of human plasmodia and has been the target of control campaigns because of its medical importance. However, the occurrence of microevolution in *An. darlingi* was not considered and, consequently, the possibility of different populations exhibit distinct biological characteristics. **Objective** – Verify the presence of morphological and genetic variability in Brazilian *Anopheles darlingi* populations. **Methods** – Twenty six attributes of external egg morphology were analyzed and compared in nine populations. Similarly, the geometric morphometry of wing shape was evaluated in ten *An. darlingi* localities. In addition, the mitochondrial gene *cytochrome oxidase subunit I* (COI) was employed to analyze the population structure of *An. darlingi*. **Results and Conclusion** - Although, egg attributes showed variation, only samples from Tocantins and Pará were differentiated from other populations. Variation in external egg structure is arguably adaptive in light of environmental factors such as temperature, humidity and food availability for females. Comparisons of wing geometric morphometry indicated that there is greater similarity between Coastal (Espírito Santo and Rio de Janeiro states) and Inner (São Paulo and Paraná states)

populations of the Atlantic Forest, and differentiation of those from (Goiás and Tocantins states) and regions both north (Amazonas and Amapá states) and south (Pará and Mato Grosso states) of the Amazon Region. *Cytochrome oxidase I* analyses indicated differentiation between coastal Atlantic Forest populations (Espírito Santo and Rio de Janeiro states) and those from the cerrado, the Amazon and the interior Atlantic Forest. The pattern of COI haplotype diversity, neutrality tests and distribution of pairwise differences suggest a recent demographic expansion. Geographical distance, ecoregions and potentially environmental constraints may limit the species' dispersal and influence the population structure of *An. darlingi*.

Keywords: genetic populations, *Anopheles darlingi*, wing geometry, scanning electron microscope, egg exochorion, cytochrome oxidase I.

ÍNDICE

Capítulo 1. INTRODUÇÃO GERAL	8
1.1. MALÁRIA NO BRASIL	8
1.2. ESPÉCIES VETORAS DO SUBGÊNERO <i>NYSSORHYNCHUS</i> DE <i>ANOPHELES</i>	9
1.3. A ESPÉCIE <i>Anopheles darlingi</i>	10
1.3.1. Diferenciação populacional de <i>An. darlingi</i>	11
1.4. MARCADORES MORFOLÓGICOS E MOLECULARES	14
1.4.1. Micrografia do exocório de ovos	14
1.4.2. Morfometria geométrica da asa	15
1.4.3. DNA mitocondrial e o gene citocromo oxidase subunidade I (COI)	16
JUSTIFICATIVA	18
OBJETIVOS	19
MATERIAIS	20
Capítulo 2. ESTUDO DA MORFOMETRIA DE OVOS	24
2.1. MÉTODOS	24
2.1.1. Preparação dos ovos	24
2.1.2. Medição dos atributos	25
2.1.3. Análise estatística	26
2.1.3.1. Análise descritiva	26
2.1.3.2. Análise de variância (ANOVA)	27
2.1.3.3. Análise de componentes principais (CP)	27
2.1.3.4. Análise discriminante	27
2.2. RESULTADOS – Manuscrito 1: “ Morphometry of the scanning electron microscope of the eggs of nine populations of <i>Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi</i> Root (Diptera: Culicidae)”	28
Capítulo 3. ESTUDO DA GEOMETRIA DAS ASAS	50
3.1. MÉTODOS	50
3.1.1. Preparação das amostras das asas	50
3.1.2. Obtenção das imagens das asas	51
3.1.3. Análise da morfometria geométrica	51
3.2. RESULTADOS – Manuscrito 2: “ Wing shape variation in populations of <i>Anopheles darlingi</i> Root, a major malaria vector in South America”	53

Capítulo 4. ESTRUTURAÇÃO DAS POPULAÇÕES ESTIMADAS PELAS SEQUÊNCIAS DE COI	76
4.1. MÉTODOS	77
4.1.1. Análise molecular	77
4.1.1.1. Extração do DNA genômico	77
4.1.1.2. Amplificação do gene mitocondrial COI	77
4.1.1.3. Purificação e quantificação dos produtos de PCR	77
4.1.1.4. Sequenciamento	78
4.1.1.5. Purificação por cromatografia de gel filtração	78
4.1.1.6. Alinhamento das seqüências	79
4.1.2. Análise das sequências	79
4.1.2.1. Análise filogenética	79
4.1.2.2. Estrutura da variação genética	79
4.1.2.3. Estrutura populacional e demografia histórica	80
4.2. RESULTADOS – Manuscrito 3: “Molecular genetics populations of <i>Anopheles darlingi</i> Root (Diptera: Culicidae) from Brazil”	81
CONSIDERAÇÕES FINAIS	104
REFERÊNCIAS	108

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. MALÁRIA NO BRASIL

A malária é um dos principais problemas de saúde pública que afeta principalmente populações pobres em regiões tropicais e subtropicais do mundo. Isso ocorre devido às condições ambientais, que são favoráveis a proliferação dos agentes etiológicos, protozoários do gênero *Plasmodium* Marchiafava & Celli, bem como dos vetores, mosquitos do gênero *Anopheles* Meigen (DEANE, 1986). A incidência anual da malária, no mundo, é estimada em 300 milhões de casos, a maioria dos quais ocorre em áreas da África localizadas ao sul do deserto do Saara (WHO, 2009).

No Brasil, a malária, é uma das principais doenças parasitárias endêmicas na região Amazônica (Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins) (HIWAT e BRETAS, 2011) onde se concentram 99,6% dos casos. Somente em 2009 foram confirmados mais de 306.000 casos de malária naquela região (PORTAL DA SAÚDE, 2012). A transmissão da doença na Amazônia, durante os últimos cem anos, tem sido favorecida pelas alterações no meio ambiente causada pela atividade humana, como fluxo migratório, aumento das fronteiras agrícolas e agropecuárias, extração de recursos naturais e a intensiva derrubada da mata (SINGER e CASTRO, 2006).

Os agentes etiológicos da malária humana no Brasil são protozoários do gênero *Plasmodium*, a saber: *P. vivax* Grassi e Feletti, *P. falciparum* Welch e com menor frequência por *P. malariae* Stephens (ARRUDA et al., 1986; PORTAL DA SAÚDE, 2012).

Os protozoários são transmitidos ao homem por mosquitos do gênero *Anopheles* e estão classificados em sete subgêneros: *Nyssorhynchus* Blanchard, *Anopheles* Meigen, *Kerteszia* Theobald, *Cellia* Theobald, *Baimaia* Harbach, *Stethomyia* Theobald, *Lophopodomyia* Antunes, mas apenas os três primeiros incluem espécies que são vetores neotropicais do parasita. Dentre eles, o subgênero *Nyssorhynchus* é o que apresenta os principais

vetores de plasmódios humanos no Brasil.

1.2. ESPÉCIES VETORAS DO SUBGÊNERO *NYSSORHYNCHUS* DE *ANOPHELES*

O subgênero *Nyssorhynchus* é subdividido em seções, *Albimanus* (FARAN, 1980), *Argyritarsis* (LINTHICUM, 1988) e *Myzorhynchella* (PEYTON et al., 1992) e inclui espécies que são vetores de plasmódios.

Da Seção *Albimanus*, as principais espécies vetoras são: *An. albimanus* Wiedemann, vetor na América Central e em localidades da América do Sul, situadas ao oeste da Cordilheira dos Andes (LOAIZA et al., 2010); *An. nuneztovari* I.s. Gabaldon tem importância médica em áreas situadas ao oeste da Venezuela, norte da Colômbia, Suriname e Bacia do Rio Amazonas (FARAN, 1980); *An. aquasalis* Curry é vetor na Venezuela, em Trinidad e Tobago e em áreas situadas em regiões costeiras no Brasil (DEANE et al., 1948; RUBIO-PALIS et al., 1992; FORATTINI, 1962; 2002). *An. oswaldoi* I.s. Peryassú foi considerado vetor no estado do Acre (BRANQUINHO et al., 1993; 1996).

Da Seção *Argyritarsis*, as espécies *An. deaneorum* Rosa-Freitas, *An. janconnae* Wilkerson and Sallum e *An. marajoara* Galvão and Damasceno foram consideradas vetores potenciais ou locais de plasmódios humanos (KLEIN et al., 1991a; 1991b; CONN et al., 2002; PÓVOA et al., 2006). Recentemente, PÓVOA et al. (2006) demonstraram que *An. albitarsis* E (= *An. janconnae* Wilkerson and Motoki) está envolvida na dinâmica da transmissão da malária em Boa Vista, Roraima. No Brasil e em áreas da América Latina, *An. darlingi* Root é considerado o vetor primário (LINTHICUM, 1988; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA et al., 1989; MANGUIN et al., 2008).

Não há evidência epidemiológica das espécies da seção *Myzorhynchella* que demonstrem o envolvimento delas como vetor de patógenos (NAGAKI et al., 2010).

1.3. A ESPÉCIE *An. darlingi*

Anopheles darlingi pertence à Subfamília Anophelinae, Família Culicidae, Ordem Diptera, Classe Insecta, Filo Arthropoda. É uma das espécies da seção Argyritarsis. *An. darlingi* foi descrita por ROOT (1926) que tomou como base adultos, larvas e pupas coletados em Caxiribú, próximo à Porto das Caxias, distrito de Itaboraí, Rio de Janeiro. Em 1937, GALVÃO et al. reconheceram diferenças morfológicas na genitália masculina e nos ovos de espécimes de *An. darlingi* coletados em Novo Oriente (conhecida atualmente como Pereira Barreto), São Paulo e descreveram a subespécie *An. darlingi paulistensis*. Em seguida, CAUSEY et al. (1944) consideraram as variações como diferenças morfológicas tipicamente intra-específicas e, por isso, sinonimizaram *An. darlingi* var. *paulistensis* com *An. darlingi*.

Anopheles darlingi tem importância epidemiológica devido à ampla distribuição geográfica, alta densidade, alto grau de antropofilia e endofagia, na maior parte do seu território e pela susceptibilidade à infecção de plasmódios. Como citado anteriormente, a espécie é responsável pela transmissão do *P. falciparum*, *P. vivax* (ARRUDA et al., 1986; OLIVEIRA-FERREIRA et al., 1990); e para *P. malariae* (PORTAL DA SAÚDE, 2012).

De acordo com FORATTINI (2002), *An. darlingi* se desenvolve em coleções hídricas límpidas com certa profundidade, sombreadas com vegetação flutuante ou emergente e pobre em sais e matéria orgânica. Porém, pode ser encontrada em locais com diferentes características (TADEI et al., 1998), como por exemplo, em áreas da região norte os criadouros são expostos à luminosidade, ao contrário do que ocorre ao sul do Brasil, onde as formas imaturas estão presentes em criadouros mais sombreados. Outra característica distinta relaciona-se com as dimensões do criadouro, sendo que na maioria das localidades o mosquito é encontrado em grandes coleções hídricas, como remansos e lagoas, podendo também ser encontrado em poças d'água, marcas de pneus e valas durante estações de chuva (GALVÃO e DAMASCENO, 1944). Adicionalmente, devido à presença humana na Amazônia peruana e também em regiões do Brasil, novos criadouros surgiram em coleções hídricas artificiais constituídas de

barragens através do represamento e também da criação de grande lagos e tanques para piscicultura (TADEI et al., 1991; VITTOR et al., 2009).

O uso intensivo de inseticida como método de controle de mosquitos vetores provocou seleção dos mais resistentes, causando mudanças no comportamento do inseto (VEZENEGHO et al., 2009), como alteração na endofagia e exofagia em algumas regiões da Amazônia (DUARTE et al., 2004). Além disso, o fluxo migratório humano para áreas de transmissão endêmica de malária com a presença de *An. darlingi* tem propiciado tanto o aumento das populações do vetor como a introdução de plasmódios em áreas onde não circulavam (GONÇALVES e ALECRIM, 2004; PÓVOA et al., 2003; CONN et al., 2002).

1.3.1. Diferenciação populacional de *An. darlingi*

Estudos demonstraram que populações de *An. darlingi* tem apresentado algumas diferenças genéticas e comportamentais. Dados sobre as diferenças nas frequências de inversões em cromossomos politênicos entre populações da Amazônia e do sudeste do Brasil sugerem heterogeneidade das populações de *An. darlingi* (KREUTZER et al., 1972). ROSA-FREITAS et al. 1992 analisaram amostras de *Anopheles darlingi* de três localidades do Brasil, Costa Marques (RO), Juturnaíba (RJ) e Dourado (SP) utilizando os marcadores: morfológico (quetotaxia de larvas de quarto estágio e pupas), hábitos comportamentais, isoenzimas e hidrocarbonetos cuticulares. Os autores não observaram diferenças na morfologia, bem como no perfil de isoenzimas. Porém as diferenças significativas observadas no ciclo de atividades de picadas e no grau de endofilia indicaram que *An. darlingi* pode ser um complexo de espécies crípticas. A continuação deste estudo foi desenvolvido por FREITAS-SIBAJEV et al. (1995) utilizando os mesmos marcadores e amostras com a adição do padrão de faixas das asas e de amostras de *An. darlingi* de Cuiabá (MS), Capanema (PA) e Manaus (AM). O mesmo padrão de similaridade na morfologia (quetotaxiade larvas e pupas) e no perfil de isoenzimas, bem como o de diferenciação no ciclo de atividades de picadas e no grau de endofilia foi observado. Em estudo que

comparou espécimes provenientes dos estados de São Paulo, Bahia, Rondônia, Roraima e Acre, empregando o segundo espaçador interno transcrito (ITS2) do DNA ribossômico, MALAFRONTÉ et al. (1999) observaram que as diversas populações possuíam sequências de nucleotídeos relativamente idênticas. Porém, as populações da região sudeste apresentavam divergência genética de 4-5% em relação àquelas de localidades do norte do Brasil. Como consequência, MALAFRONTÉ et al. (1999) consideraram que os resultados corroboravam as diferenças observadas por KREUTZER et al. (1972). No entanto, os resultados de MALAFRONTÉ et al. (1999) diferem daqueles obtidos por MANGUIN et al. (1999) que não observaram variações nas sequências do ITS2 de populações da América do Sul.

Adicionalmente, SANTOS et al. (1999) analisaram 19 *loci* de isoenzimas de 4 populações de *An. darlingi* da Região Amazônica e observaram que essas populações eram geneticamente semelhantes. Entretanto, a população da região Central da Amazônia apresentou grau elevado de polimorfismo em relação às populações marginais. CONN et al. (1999) compararam amostras de *An. darlingi* da Bolívia, Brasil e Venezuela utilizando polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial (RFLP) e observaram correlação significativa entre a variabilidade genética e a distância geográfica das populações. Dessa maneira, sugeriram que a variabilidade genética poderia ocasionar diferenças fenotípicas que exerciam influência tanto na capacidade vetora como no hábito alimentar e longevidade das populações de *An. darlingi*.

Utilizando oito loci de microssatélites, CONN et al. (2006) observaram grau elevado de polimorfismo em todas as populações estudadas e diferenças genéticas significantes entre populações de *An. darlingi* encontradas na região norte e sul do rio Amazonas. Dessa maneira, os autores sugeriram que a distância geográfica poderia ocasionar o isolamento genético das populações. Por outro lado, SCARPASSA e CONN (2007) observaram divergências limitadas entre as populações de *An. darlingi* da região central e norte da Região Amazônica. Vale assinalar que as amostras

dos dois estudos foram coletadas em sistemas diferentes (rio Negro, rio Solimões, rio Madeira) ao longo da bacia do Rio Amazonas que representam compartimentos tectônicos distintos, com características geomorfológicas diferentes. Fragmento do DNA mitocondrial, ND4 de populações de *An. darlingi* coletadas em quatro localidades de Porto Velho (RO), não evidenciaram estrutura populacional significativa, porém foi observada diferença sazonal nos meses de abril e outubro de 2005 (ANGÊLLA et al., 2007). MOUTINHO et al. (2011) observaram diferenças na densidade de *An. darlingi* coletados em quatro momentos distintos de 2008 (maio, julho, setembro e novembro) e em 2009 (fevereiro), bem como diferenças na composição genética entre os espécimes coletados neste período.

ROSSETTI et al. (2005) consideraram que as histórias evolutivas distintas das diversas regiões podem ter influenciado na evolução dos organismos presentes na Amazônia. Os processos evolutivos podem envolver tanto variações alélicas quantitativas como qualitativas e amplificações gênicas que ocorrem dinamicamente em populações. Como resultados desses processos, são originados padrões genotípicos e fenotípicos distintos, cuja persistência depende tanto da atuação da seleção natural como da deriva genética e do fluxo gênico. Dessa maneira, originam-se diferenças nos padrões biológicos das populações de determinada espécie (FUTUYMA, 2005).

A diferenciação genética e fenotípica de populações de determinada espécie podem ser avaliadas por meio da análise de marcadores morfológicos utilizando, por exemplo, características do exocório de ovos (LOUNIBOS et al., 1997), morfometria geométrica das asas (JIRAKANJANAKIT et al., 2007; 2008; MORAIS et al., 2010; AYALA et al., 2011) e por análise de marcadores moleculares como as seqüências de nucleotídeos do DNA nuclear (MIRABELLO e CONN, 2008; LOAIZA et al., 2010; MCKEON et al., 2010), do DNA ribossômico (MALAFRONTTE et al., 1999; NDO et al., 2010; PRAKASH et al., 2010), do DNA mitocondrial (FOLEY et al., 2007; GUTIERREZ et al., 2009; LOAIZA et al., 2010; PEDRO et al., 2010), entre outros.

1.4. MARCADOR MORFOLÓGICO E MOLECULAR

1.4.1. Micrografia do exocório de ovos

Devido as suas características próprias, o exocório dos ovos de Culicidae muitas vezes confere especializações como permeabilidade a trocas gasosas, proteção à dessecação e flutuação (SERVICE, 2004). A descrição morfológica dos ovos por micrografias de varredura utilizando a técnica de microscopia eletrônica de varredura tem permitido a observação e caracterização das estruturas dos ovos de vários culicídeos de interesse médico e possui caracteres de potencial uso taxonômico e filogenético (FORATTINI, 2002; REINERT, 2005).

As estruturas analisadas nos ovos são merísticas como a contagem de tubérculos, morfométricas como as razões matemáticas entre dimensões e também descritivas como a ornamentação do exocório (MORATORE, 2009). A análise morfométrica de caracteres do exocório dos ovos, por micrografias de varredura tem permitido a distinção de espécies crípticas e de populações da mesma espécie (LINLEY et al., 1993a; LINLEY et al., 1993b; LOUNIBOS et al., 1997; SALLUM et al., 2010; NAGAKI et al., 2010; 2011).

Em *An. darlingi*, o estágio de vida que tem recebido menos atenção é o ovo, que foi caracterizado por LINLEY (1992) através de imagens de microscopia eletrônica de varredura obtidas de amostras de uma população da Amazônia colombiana. Em estudo de quatro populações de *An. aquasalis* (duas populações da Venezuela, uma de Suriname e uma do Brasil) foi analisada a morfometria de ovos. Dois grupos distintos foram observados, o primeiro formado pelas duas populações da Venezuela e o segundo formado pelas populações de Suriname e do Brasil (LINLEY et al., 1993b). Em outro estudo, foi possível separar duas populações de *An. aquasalis* da Venezuela de diferentes localidades do estudo anterior (MALDONADO et al., 1997). LINLEY e LOUNIBOS (1993) demonstraram que as características dos exocórios dos ovos de *An. rangeli* e *An. dunhami* podem auxiliar na separação das duas espécies. Nas análises das imagens dos ovos de várias

populações de *An. nuneztovari*, na qual acredita-se que esteja ocorrendo especiação incipiente, LINLEY et al. (1996) observou que a densidade e o tamanho dos tubérculos são características que podem ser úteis para discriminar populações alopátricas.

1.4.2. Morfometria geométrica de asas

Morfometria geométrica é abordagem estatística que começou a ser empregada em taxonomia na década de 1990. Esta metodologia abrange uma série de técnicas que visam descrever e representar a geometria das formas estudadas (MORAES, 2003). Na coleta de dados para a morfometria geométrica é usado “marcos anatômicos”, que são pontos de referência da estrutura corporal em estudo, em geral pontos extremos ou de justaposição de órgãos e tecidos. São tomadas as coordenadas posicionais sobre um plano cartesiano imaginário que circunscreve a estrutura corporal, as quais são posteriormente ordenadas em tabelas de dados. A partir desses dados, podem-se efetuar estudos estatísticos da variação morfométrica, comparar a magnitude das variações, etc (ROHLF, 1993; BOOKSTEIN, 1997; MONTEIRO e REIS, 1999).

Em Culicidae, as características das asas frequentemente correlacionam com as outras características biológicas dos mosquitos ligadas a importância médica, como capacidade de vôo, produção de som alar de corte pré-cópula e até fecundidade, sendo indicado o uso da asa para morfometria geométrica (BROGDON, 1998).

Como exemplos do emprego de morfometria geométrica em taxonomia de insetos, vale assinalar os estudos de MATIAS et al. (2001) e de FRANCOY et al. (2006) com *Rodnius robustus* e *Apis mellifera*, respectivamente. JARAMILLO et al. (2002) empregaram técnicas de análises de morfometria geométrica para comparar espécimes selvagens de *Panstrongylus geniculatus* com outros criados em laboratório. Como resultado, os autores observaram diferenças na cabeça e nas asas que permitiram a separação dos dois grupos. SCHATCHTER-BROIDE et al. (2004) estudaram as asas e observaram diferenças em populações de

Triatoma infestans. Os resultados do estudo de resistência à inseticida realizado por DUJARDIN et al. (2007) sugeriram que a geometria da asa de triatomíneos pode conter informações importantes para identificar possíveis origem de reinfestações de espécimes em áreas tratadas. JIRAKANJANAKIT et al. (2007) observaram diferenças na forma e tamanho alar e, JIRAKANJANAKIT et al. (2008) demonstraram a presença de variação temporal em asas de *Aedes (Stegomyia) aegypti*. As populações de *Culex quinquefasciatus* do Brasil e da Argentina foram separadas pela morfometria da asa, adicionalmente foram observadas diferenças entre as populações do norte e sul do Brasil (MORAIS et al., 2010). A morfometria da asa foi utilizada como diagnóstico na identificação de onze espécies de *Anopheles (Nyssorhynchus)* presentes na Colômbia (CALLE et al., 2008) e de *Culex quinquefasciatus* e *Culex nigripalpus* (VIDAL et al., 2011).

1.4.3. DNA Mitocondrial e o gene citocromo oxidase subunidade I (COI)

As mitocôndrias são organelas citoplasmáticas dos eucariotos envolvidas em processos fisiológicos e patológicos. O DNA mitocondrial é constituído por uma dupla fita circular que contém 37 genes. Destes, dois codificam RNAs ribossômicos, 22 codificam RNAs transportadores e 13 codificam proteínas. E também possui uma região não codificadora denominada região controle ou D-Loop em vertebrados, extremamente rica em adenina e timina, também conhecida como região A+T em invertebrados; é responsável pelo controle da replicação e transcrição do genoma da mitocôndria (CLARY e WOLSTENHOLME, 1985).

O DNA mitocondrial apresenta várias características como possuir múltiplas cópias por célula, seu genoma haplóide de origem materna não sofre processos de recombinação gênica, os íntrons são ausentes em muitos invertebrados, alto grau de polimorfismo, que na maioria dos organismos é de 5 a 10 vezes maior do que os genes nucleares de cópia única. Por esses motivos, sequências do gene mitocondrial são favoráveis para sua utilização em estudos de genética de população, padrões de

evolução e filogenia molecular (HARRISON, 1989; AVISE, 1994; BEHURA, 2006).

Dos 13 genes que codificam proteínas, o gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade I (COI) é um deles, responsável pela produção de uma proteína conservada denominada heme (citocromo c), que é envolvida no transporte de elétrons e translocação de prótons através da membrana (SARASTE, 1990) e no mecanismo de apoptose (morte celular) em diversos organismos (ZHAO et al., 2008).

Sequências do gene COI foram utilizadas em estudo com populações de *An. darlingi* coletadas na América Central e América do Sul e indicaram ser eficientes para inferir hipóteses de relações genéticas (MIRABELLO e CONN, 2006). Dessa maneira, os autores sugeriram que o rio Amazonas poderia ser barreira para o fluxo gênico entre as populações de *An. darlingi*. PEDRO e SALLUM (2009) utilizaram sequências de COI para analisar o histórico filogeográfico de populações de *An. darlingi* de várias localidades da América do Sul. Os autores sugeriram que a diversidade genética está dividida em seis grupos populacionais principais na América do Sul: Colômbia, Amazônia Central, sul do Brasil, sudeste do Brasil e dois grupos do nordeste do Brasil. A Amazônia Central foi considerada como sendo a região de dispersão ancestral do táxon, com evidência de expansão durante o final do Pleistoceno. A população do Rio de Janeiro diferenciou substancialmente das demais, podendo apresentar diferenças genéticas que refletem tanto na competência como na capacidade vetora da espécie.

COI também tem sido usado com a combinação de outros genes. Resultados da análise de COI combinado com ITS2 de populações de *An. nuneztovari* e *An. goeldii* do Brasil, Venezuela e Colômbia demonstraram que são espécies distintas (CALADO et al., 2008). LINTON et al. (2003) definiram espécies do complexo *An. maculipennis* com o emprego de COI e ITS2. A análise da combinação dos genes COI e *white* permitiu a distinção de *An. strodei*, *An. albertoi* e *An. arthuri* (SALLUM et al., 2010).

JUSTIFICATIVA

Cerca de 300 milhões de casos de malária ocorrem anualmente no mundo (WHO, 2009). No Brasil foram confirmados mais de 306.000 casos de malária em 2009, destes 99,6% ocorreram na Região Amazônica (PORTAL DA SAÚDE, 2012). Nesta região, *An. darlingi* é considerado o vetor primário, porém sua participação na dinâmica da transmissão da malária na América Central e no sudeste do Brasil parece não ser significativa.

Sabe-se que a evolução de populações de anofelíneos vetores de plasmódios pode gerar problemas de saúde pública. As variações populacionais podem ser favorecidas tanto pelas condições ambientais como temperatura, regime pluviométrico e disponibilidade de coleções hídricas como pela presença humana (FORATTINI, 2002). Além disso, as variações ocasionadas tanto na composição das espécies como nos padrões biológicos das mesmas podem representar fatores que dificultam os desenhos de medidas de controle de mosquitos vetores.

Variações genéticas de populações de vetores podem afetar a susceptibilidade à infecção por *Plasmodium*, provocar diferenças no grau de antropofilia, e endofagia, no ritmo nictemeral de atividades, na susceptibilidade aos inseticidas, nas taxas de sobrevivência e reprodução, e na epidemiologia da malária em hospedeiro humano. Um maior entendimento da estrutura populacional e dos processos responsáveis pela distribuição das diferenças (capacidade vetora) se faz necessário para auxiliar o controle populacional de vetores e também para a identificação de heterogeneidades nos padrões de transmissão da doença.

OBJETIVOS

GERAL

- Examinar a variabilidade genética e morfológica de populações de *An. darlingi* do Brasil.

ESPECÍFICOS

- ▲ Caracterizar populações de *An. darlingi* pela morfologia externa de ovos;
- ▲ Caracterizar populações de *An. darlingi* pela morfometria geométrica da asa;
- ▲ Estabelecer a estruturação genética de populações de *An. darlingi* do norte, centro oeste, sudeste e sudoeste do Brasil.

Com base nos parâmetros biológicos mencionados, foi testada a seguinte hipótese:

- ★ Existem diferenças na estruturação genética de populações de *An. darlingi* do norte, centro oeste, sudeste e sudoeste do Brasil.

MATERIAIS

COLETA E PROCEDÊNCIA DOS ESPÉCIMES. As amostras de *An. darlingi* que foram empregadas neste estudo (Tabela I; Figura I) foram obtidas durante as coletas de campo realizadas como parte do Projeto Temático Fapesp 05/53973-0.

Foram coletadas fêmeas pousadas nas paredes de Armadilha de Shannon (SHANNON, 1939) e imaturos (larvas e pupas) em criadouros. As fêmeas foram alimentadas com sangue humano em laboratório. No período entre 48 a 60 horas depois do repasto sanguíneo, as fêmeas foram anestesiadas com acetato de etila, identificadas e induzidas a ovipor pela remoção de uma asa. Os insetos foram colocados individualmente em copos de plástico (50 ml) com água destilada até a oviposição. Parte dos ovos, 36 horas após a oviposição, foi preservada em solução alcoólica de Bouin para a obtenção de imagens de estruturas do exocório em microscópio eletrônico de varredura (MEV) para o estudo de ovos. O restante dos ovos foi mantido com água até a eclosão das larvas. As exúvias de larvas foram preservadas em álcool 80% para posterior montagem em lâmina. As pupas foram separadas uma a uma em pequenos copos de plástico com água, tampados e foram mantidas até a eclosão dos adultos. Adicionalmente, larvas e pupas foram coletadas nas mesmas localidades e mantidas em laboratório até a emergência dos adultos.

Foram montadas lâminas de exúvias de larvas de 4º estágio, pupas e genitálias masculinas. Os adultos macho e fêmea foram anestesiados com acetato de etila, parte deles foi fixada com alfinete entomológico e o restante foi mantido em microtubo com sílica ou armazenados em etanol absoluto (-80°C) para posterior utilização nos estudos de asa e/ou de molecular, com remoção de uma das asas e/ou extração de DNA. Cada adulto montado foi associado com suas respectivas lâminas de exúvias de larva e pupa. Foi colocado um código em forma de número, para possibilitar a verificação de cada geração e se é da mesma fêmea ou não.

Pelo menos um adulto macho ou fêmea de cada geração foi utilizado

para identificar a espécie de acordo com LINTHICUM (1988). O material foi depositado na Coleção Entomológica de Referência da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP/USP). Adicionalmente para as análises moleculares foram adicionadas sequências do gene COI de MIRABELLO e CONN (2006) (Tabela I), que estão depositadas no Genbank (DQ298209- DQ298244).

Tabela I. Estados, municípios e localidade das amostras de populações de *An. darlingi* analisadas e os marcadores utilizados no presente estudo.

Estado	Localidade	Coordenada geográfica	Marcadores utilizados		
			Ovo	Asa	COI
AC	Acrelândia	-09.68333 -67.11667	X		X
AM	Barcelos	-01.86667 -62.56667		X	X
AP	Abacate da Pedreira	00.27167 -50.89806	X		
	Macapá	-00.20000 -50.96667	X	X	X
	Tartarugalzinho*	01.31667 -50.96667			X
	Lagoa dos Índios*	-00.03333 -51.18333			X
	Santo Antônio*	-00.09083 -51.20833			X
ES	Sooretama	-19.03333 -40.00000	X	X	X
	Sooretama	-19.28333 -40.08333		X	X
GO	Minaçu	-13.55000 -48.15000		X	X
MG	Frutal	-20.00000 -49.06667			X
MS	Aquidauana	-19.50000 -55.61667			X
MT	Sinop	-11.85000 -55.50000		X	X
	Peixoto Azevedo*	-10.38333 -54.90000			X
PA	Santarém	-02.74653 -54.22697	X		
	Belterra	-02.73333 -54.21667		X	X
	Itaituba*	-04.25000 -55.98333			X
	Tailândia*	-02.95000 -48.98333			X

	Belém*	-01.41667 -49.28333			X
	Invasão Carlos Mariguela*	-01.61667 -48.60000			X
	Peixe-boi*	-01.18333 -47.28333			X
	Mojú*	-01.86667 -48.75000			X
	Capanema*	-01.20000 -47.18333			X
PR	Porto Rico	-22.83333 -53.35000			X
	Guaíra	-24.26667 -54.28333	X	X	X
RJ	Juturnaíba	-22.61667 -42.28333	X	X	X
RO	Porto Velho	-08.75000 -63.90000	X		X
RR	Boa Vista	02.81667 -60.66667			X
SP	Dourado	-22.07417 -48.44472	X	X	X
	Dourado	-22.13333 -48.38333		X	X
	Dourado*	-22.11667 -48.30000			X
TO	Lagoa da Confusão	-10.62194 -49.74028	X	X	X

*amostras adicionadas do estudo de Mirabello e Conn (2006) que estão depositadas no Genbank (DQ298209 - DQ298244)

Figura I. Mapa do Brasil - estados onde as amostras de *An. darlingi* foram coletadas. AC – Acre; AM – Amazonas; AP – Amapá; ES – Espírito Santo; GO – Goiás; MG – Minas Gerais; MS – Mato Grosso do Sul; MT – Mato Grosso; PA – Pará; PR – Paraná; RJ – Rio de Janeiro; RO – Rondônia; RR – Roraima; SP – São Paulo; TO – Tocantins. As informações entre parênteses indicam o marcador (morfológico e/ou molecular) que foi utilizado, a = morfometria da asa; o = morfometria do ovo; c = sequências de COI.

Os resultados aqui obtidos foram organizados por temas, em capítulos. Em cada capítulo foi anexado um manuscrito.

No Capítulo 2 (págs. 29 - 49), são apresentados os resultados do estudo da morfometria de ovos de nove populações de *An. darlingi*; em seguida no capítulo 3 (págs. 54 - 75) os resultados do estudo de morfometria geométrica de asas de 10 populações de *An. darlingi* são apresentados e, por último, um fragmento de COI de populações de *An. darlingi* de 30 localidades do Brasil foi analisado, maiores detalhes estão descritos no capítulo 4 (págs. 82 - 103).

CAPÍTULO 2. ESTUDO DA MORFOMETRIA DE OVOS

A microscopia eletrônica de varredura permite a observação e caracterização de diferentes tipos de materiais, como por exemplo, as estruturas dos ovos de Culicidae. É utilizada como ferramenta em estudos taxonômicos e filogenéticos, pois possibilita o reconhecimento das diferenças ou similaridades das formas de várias estruturas de ovos, permitindo a identificação de muitas espécies de mosquitos (NAGAKI et al., 2010; 2011), e também a comparação entre duas ou mais espécies (LOUNIBOS et al., 1997).

A morfometria das estruturas dos ovos permitiu a distinção de espécies crípticas (LINLEY et al., 1993a; SALLUM et al., 2010) e de populações (LINLEY et al., 1993b; LINLEY et al., 1996). Com base nos estudos de morfometria das estruturas dos ovos de *Anopheles* por meio da micrografia eletrônica, os ovos de nove populações de *An. darlingi* foram analisados. Os objetivos deste estudo foram: 1) verificar se as hipóteses que apontam as diferenças populacionais em *An. darlingi* podem ser corroboradas pela morfometria dos caracteres de micrografias de microscópio eletrônico de ovos; 2) avaliar as variações morfológicas do exocório de ovos de fêmeas obtidas em nove estados do Brasil utilizando o microscópio eletrônico de varredura (MEV); 3) verificar se a diferença no padrão do exocório de ovos de MEV observado pode ser corroborado com as diferentes localidades das populações - Brasil Central, leste da Mata Atlântica e Amazônia.

2.1. MÉTODOS

2.1.1. Preparação dos ovos. As amostras dos ovos das populações de *An. darlingi* (Tabela I) foram visualizadas ao MEV e para a preparação química foi utilizado o seguinte protocolo:

- ① Os ovos preservados em solução Bouin, foram desidratados para

remoção do ácido pícrico em uma série de trocas de álcool 70%, 80%, 90% e 100%, deixando agir no mínimo por 10 minutos em cada concentração.

- ② Em seguida, foi feita secagem do material em aparelho de ponto crítico. Os ovos foram montados em toros especiais para microscopia de varredura e em posições que permitiram a visualização das estruturas dorsais, laterais e ventrais.
- ③ O material foi recoberto por uma camada delgada de carbono para aprimorar a metalização e a qualidade da imagem e depois através de “sputtering”, revestido de ouro.
- ④ Finalmente foi visualizado em MEV como descrito por SALLUM et al. (2010).

Para a obtenção das imagens foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura Jeol 6460LV do Laboratório de Filmes Finos – Departamento de Física Experimental do Instituto de Física da USP.

2.1.2. Medição dos atributos. A partir das imagens digitalizadas, foram medidos, contados ou calculados 26 atributos (Tabela II), 24 associados com a região dorsal do ovo inteiro ou região anterior do tubérculo e 2 com a região ventral do ovo inteiro (Figuras 1 e 2 do manuscrito). O perímetro do convés foi mensurado, assim como o das regiões anterior e posterior do convés. Elas foram mensuradas após a divisão do comprimento do ovo inteiro ao meio. O perímetro e a quantidade de todos os tubérculos (com perímetro $\geq 5 \mu\text{m}$) da região anterior encontrados na área de $300 \mu\text{m}$ foram medidos e contados (Tabela II). O comprimento e a largura dos ovos foram mensurados com auxílio do estereomicroscópio Wild MMS 235® (Heerbrugg, Switzerland), os outros atributos foram medidos com o auxílio do programa Zeiss LSM Image Browser.

Tabela II. Atributos dos ovos

ATRIBUTOS	
Dimensão linear	1. Comprimento do ovo
	2. Largura do ovo
	3. Comprimento/largura
Flutuador	4. Comprimento do flutuador
	5. Comprimento do flutuador / comprimento do ovo
	6. Número de nervuras
	7. Comprimento do flutuador / número de nervuras
Dimensão do convés	8. Perímetro do convés
	9. Comprimento do convés
	10. Perímetro da região anterior do convés
	11. Perímetro da região posterior do convés
	12. Perímetro do convés / comprimento do ovo
	13. Perímetro do convés / largura do ovo
	14. Perímetro do convés / comprimento do convés
	15. Comprimento do convés / comprimento do ovo
	16. Comprimento do convés / largura do ovo
	17. Perímetro da região anterior do convés/perímetro do convés
	18. Perímetro da região posterior do convés/perímetro do convés
Tubérculos da região anterior do convés	19. Perímetro da reg. anterior / perímetro da região posterior do convés
	20. Perímetro da região anterior do convés / comprimento do convés
	21. Perímetro da região posterior do convés / comprimento do convés
Micrópila	22. Número de tubérculos
	23. Média do perímetro dos tubérculos
	24. Média dos perímetros dos tubérculos / número de tubérculos
	25. Perímetro do disco micropilar
	26. Número de setores do disco micropilar

2.1.3. Análise estatística. Foram analisados os atributos de 3 a 5 ovos de cada fêmea. Uma matriz de dados das medidas dos ovos foi elaborada utilizando o programa Excell. Cada caráter medido, contado ou calculado (porcentagem ou razão) foi considerado uma variável e para facilitar os procedimentos no programa, foi criada uma sigla para cada caráter. A matriz de dados foi analisada com o programa SPSS versão 17. Foram realizadas múltiplas análises estatísticas, a saber.

2.1.3.1. Análise descritiva. Conhecida como análise exploratória, esta análise possibilitou verificar a distribuição dos dados (média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e máximo observado).

2.1.3.2. *Análise de Variância (ANOVA)*. É análise estatística que permite comparar as médias das variáveis estudadas. Assim, foi feita a comparação das médias das nove populações de 26 atributos. Considerando-se o nível de significância (α) igual a 5%, adotou-se teste de hipótese de igualdade entre as médias das variáveis para as nove populações ($H: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6 = \mu_7 = \mu_8 = \mu_9$). As medidas “derivadas” são as porcentagens e razões dos atributos medidos ou contados, segundo LINLEY et al. (1993a) essas medidas explicam melhor as diferenças entre as espécies. O tamanho do ovo depende do tamanho da fêmea e também é influenciado por fatores como disponibilidade de alimento e temperatura durante o desenvolvimento larval (STEINWASCHER, 1984). Por este motivo, para ANOVA e análises multivariadas foram utilizadas as medidas “derivadas” para comparar as nove populações de *An. darlingi*. Entre as 14 variáveis consideradas na análise, todas rejeitaram a hipótese H .

2.1.3.3. *Análise de componentes principais (CP)*. É técnica de análise multivariada cujo objetivo principal é obter, a partir das variáveis em estudo, um pequeno número de combinações lineares (componente principal) que retenham o máximo de informações possíveis. Os componentes principais são apresentados em ordem decrescente, do mais explicativo para o menos explicativo e o seu processamento pode ter partida na matriz de variâncias e covariâncias ou na matriz de correlação (HUGH e GAUCH, 1982). CP foi aplicada em 14 atributos dos ovos.

2.1.3.4. *Análise discriminante*. É técnica de análise multivariada que separa populações em grupos com base em suas características mais influentes, e também estabelece regras para alocação de novos elementos (de origem desconhecida) nos grupos anteriormente determinados ou em grupos pré existentes (REIGADA, 2004). Foram analisados 14 atributos dos ovos. Além disso, foi gerado um fenograma baseado na distância Euclideana.

2.2. RESULTADOS

MANUSCRITO 1 – “Morphometry of the scanning electron microscope of the eggs of nine populations of *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* Root (Diptera: Culicidae)”

(manuscrito em elaboração)

Morphometry of the scanning electron microscope of the eggs of nine populations of *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* Root (Diptera: Culicidae)

MAYSA TIEMI MOTOKI^{1*}, LINCOLN SUESDEK^{2,3}, EDUARDO STERLINO BERGO⁴, MARIA ANICE MUREB SALLUM¹

¹ Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, Avenida Dr. Arnaldo 715, CEP 01246-904, São Paulo, Brazil

² Laboratório de Parasitologia, Instituto Butantan, Avenida Vital Brasil 1500, CEP 05503-900, São Paulo, Brazil

³ Instituto de Ciências Biomédicas, Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro, Universidade de São Paulo, CEP 05508-900, São Paulo, Brazil

⁴ Superintendência de Controle de Endemias, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Araraquara, São Paulo, Brazil

*Corresponding author:

Maysa Tiemi Motoki. Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, Avenida Dr. Arnaldo 715, CEP 01246-904, São Paulo, Brazil. Telephone and fax number: 55-11-30617926.

Email: maysatm@usp.br

Email: Lincoln Suesdek <linrocha@butantan.gov.br>

Eduardo Sterlino Bergo <edusteber@uol.com.br>

Maria Anice Mureb Sallum <masallum@usp.br>

Abstract

Morphometric analyses of scanning electron microscope (SEM) of the eggs of *Anopheles darlingi* Root was conducted using individuals collected in nine states from Brazil. Twenty six attributes of eggs were either measured or counted and analyzed employing multivariate statistics. Length and width of the entire egg, as well as of the floats and deck were strongly associated with distinct populations of *An. darlingi*. Discriminant function analysis indicated that SEM eggs from individuals collected in Tocantins and Pará states were distinct from remaining seven populations which include individuals from Acre, Amapá, Espírito Santo, Paraná, Rio de Janeiro, Rondônia and São Paulo states.

Key words: *Anopheles darlingi*, scanning electron microscope, egg attributes, morphometrics, discriminant analysis

Introduction

Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi Root is a species of the Argyratarsis Section (Linthicum 1988) of the subgenus *Nyssorhynchus* of *Anopheles*. It is largely distributed in South and Central America, extending from Southeastern Mexico to Northern Argentina (Forattini 2002). According to Fleming (1986), *An. darlingi* is one of the most anthropophilic and endophilic mosquito species (Deane et al. 1948) of the genus *Anopheles*, and the primary vector of *Plasmodium* species that can infect humans and cause malaria in South America (Arruda et al. 1986; Herrera et al. 1987; Oliveira-Ferreira et al. 1990), and also in the Amazon River basin (Deane 1986). In Brazil, *An. darlingi* was frequently found infected with *Plasmodium* (Arruda et al. 1986), and its geographical distribution is clearly associated with human malaria (Rosa-Freitas et al. 1998).

Although *An. darlingi* is considered a monotypic species (Manguin et al. 1999; Lounibos & Conn 2000), several studies showed heterogeneity in morphology (Kreutzer et al. 1972; Charlwood 1996), behavior (Forattini 1987; Rosa-Freitas et al. 1992; Gama et al. 2009; Moutinho et al. 2011), and in COI mtDNA (Mirabello & Conn 2006; Pedro & Sallum 2009), rDNA ITS2 sequences (Malafronte et al. 1999), and nDNA microsatellite (Conn et al. 2006).

Based on morphological characteristics of adults, larva, pupa and eggs (Root 1926), *Anopheles darlingi* was described using samples collected in Caxiribú, near Porto das Caxias, Itaboraí district, Rio de Janeiro State, Brazil. Galvão et al. (1937) examined male genitalia and eggs of specimens collected in Pereira Barreto (former known as Novo Oriente), São Paulo State, Brazil, and recognized morphological differences with *An. darlingi*. As such Galvão et al. (1937) described as *An. darlingi* var. *paulistensis*. Posteriorly, Causey et al. (1944) considered that the differences were intraspecific morphological variations and thus synonymized *An. darlingi* var. *paulistensis* with *An. darlingi*. Illustrations of the eggs structure were restricted to small drawings (Rozeboom 1942, Causey et al. 1944, Cova Garcia 1946), and are limited to light microscopy images, and so details of the exochorion are not clear. Later, Linley (1992), using scanning electron microscope (SEM) provided a more detailed description of the egg of *An. darlingi*, using the oviposition of three females

collected at human bait in Puerto Ayacucho, Amazonas, Venezuela. Likely, the minor differences observed in characteristics of the SEM eggs were a consequence of the small sample size. Population genetics and evolutionary studies compared several populations of *An. darlingi* employing molecular data, but there are few studies that used morphological characters.

Considering the great medical importance of this species as a primary vector of *Plasmodium* parasites, we employed SEM eggs from several populations from Brazil, including individuals from a location in the vicinities of the type-locality of *An. darlingi*, in Rio de Janeiro. The major objective were: 1) to verify if the hypotheses that pointed for differences among populations of *An. darlingi* could be corroborated by morphometrics characteristics of the scanning electron micrographs (SEM) eggs; 2) to assess morphological variations of the exochorion of the eggs from females obtained in nine states from Brazil, using scanning electron microscope; and 3) to verify if the pattern of the SEM exochorion could corroborate differences among populations from central Brazil, east Mata Atlantic and Amazon.

Materials and Methods

Mosquito collection. Adult female mosquitoes were collected in several localities in Brazil (Table 1). Females were blood-fed and one wing was removed 48 h later to induce oviposition. Part of the eggs were fixed in alcoholic Bouin's solution 36 hours after oviposition for studies of the external morphology of the exochorion, the remaining eggs were maintained in separated vials to obtain progeny broods of adult males and females which were associated with pupal and fourth-instar larval exuviae. Both adult males and females of each progeny were used to identify the species using Linthicum's (1988) key.

Table 1. Specimens ID, sample size, localities and geographic coordinates of *An. darlingi* populations

Specimens females ID	*n	State, Locality	Collection date	Geographic coordinates
AC20(3), AC20(7), AC20(12), AC20(17), AC20(21)	22	Acre, Acrelândia	13 Jul 2006	-09.68333 -67.11667
AP21(3), AP21(12), AP21(13), AP21(16)	18	Amapá, Macapá	26 Jul 2006	-00.20000 -50.96667
AP17(6)	03	Amapá, Abacate da Pedreira	25 Jul 2006	00.27167 -50.89806
ES20(2), ES20(5), ES20(12), ES20(14), ES20(22)	20	Espírito Santo, Linhares	23Oct2007	-19.03333 -40.00000
PA14(1), PA14(2), PA14(3), PA14(5), PA14(7)	24	Pará, Santarém	14 Oct 2008	-2.74653 -54.22697
PR28(6), PR28(12), PR28(13), PR28(21), PR28(29)	19	Paraná, Guaíra	04May2005	-24.26667 -54.28333
RJ01(2), RJ02(4), RJ02(8), RJ02(9), RJ02(16)	22	Rio de Janeiro, Juturnaíba	26Jun2007	-22.63333 -42.30000
RO23(1), RO23(2), RO23(3), RO23(5), RO23(7)	23	Rondônia, Porto Velho	16 Jan 2007	-8.76667 -63.90000
SP66(9), SP69(2), SP69(5), SP73(17), SP73(20)	19	São Paulo, Dourado	05 May 2009	-22.07417 -48.44472
TO1(6), TO5(12), TO7(9), TO12(13), TO12(18)	18	Tocantins, Lagoa da Confusão	23 Jul 2009	-10.62194 -49.74028

*n= total egg samples analyzed from five females of *An. darlingi* of each locality.

Preparation for scanning electron microscopy. Eggs, fixed in Bouin's solution, were dehydrated in ethanol with concentration varying from 70%, 80%, 90% to 100%. This procedure also removes the picric acid contained in the Bouin's solution. Following, eggs were dried by the critical point method, positioned on stubs previously covered with sticky tape, sputter-coated with carbon and then gold, and examined immediately in a Jeol 6460LV scanning electronic microscope as described by Sallum et al. (2010).

Data acquisition. Measurements and counts were made from 3-5 eggs from each females of each population (Table 1). The SEM micrographs were employed to assess 26 attributes (that included 14 attributes of percentages or ratios). Among them, 24 attributes were associated with the dorsal surface of entire eggs (Figure 1A), or the tubercles of the anterior deck (Figure 1B), and 2 attributes were from anterior ventral view (Figure 1C). Length and width of the entire egg were measured from dorsal view, with a Wild stereomicroscope connected to a digital micrometrical ocular Wild MMS 235® (Heerbrugg, Switzerland). The remaining egg attributes were measured using software Zeiss LSM Image Browser. The terminology employed to the eggs was that suggested by Harbach & Knight (1980), and Valle et al. (1999).

Descriptive analysis. Ranges, means and standard deviations of means were calculated for 26 attributes. Normality and homogeneity tests were carried out to assess if data have a normal distribution.

Figura1. Egg of *An. darlingi*. A - dorsal view; B – anterior deck tubercles, dorsal view; C – anterior ventral view

Variance analysis (ANOVA one way). Anova - one way was performed to the 26-attributes data set to verify if there were differences among the means of all attributes ($p \leq 0.05$) of the nine populations. The equality hypothesis ($H: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6 = \mu_7 = \mu_8 = \mu_9$) was tested. For multivariate analysis (principal component analysis and discriminant analysis), we adopted the same rational applied in a previous study by Linley et al. (1993a; b). Fourteen attributes were used: ratio of the egg length/egg width, ratio of float length/egg length, ratio of float length/number of ribs, ratio of deck perimeter/egg length, ratio of deck perimeter/egg width, ratio of deck perimeter/deck length, ratio of deck length/egg length, ratio of deck length/egg width, ratio of anterior deck perimeter/deck perimeter, ratio of posterior deck perimeter/deck perimeter, ratio of anterior/posterior deck perimeter, ratio of anterior deck perimeter/deck length, ratio of posterior deck perimeter/deck length, ratio of anterior deck tubercles perimeter (means)/anterior deck tubercles numbers.

Principal component analysis (PC). PC was applied for the data set of 14 attributes. This is a statistical analysis to convert and to reduce the dimensionality of a data set into a set of values of uncorrelated variables, while retaining as much variation in the data as possible. PC allows assessing the internal structure of the data to best explain the variance in it (Hugh & Gauch 1982).

Discriminant function analysis. Discriminant analysis was carried to verify the segregation of all nine previously determined populations. The procedure begins with a set of observations where both group and the values of the attributes are known and in a model that allows prediction of group when only the attributes are known. Additionally, the procedure can give insight into the relationship between groups and the attributes used to predict them (Johnson & Wichern 1999). Moreover, to support discriminant multivariate analysis results, was generated a phenogram of Euclidean distance. Descriptive and comparative statistical analyses were performed with SPSS version 17 and Statistica 7.0 (StatSoft) softwares.

Results

Simple comparison of populations. There were few visible differences among populations; however, Tocantins population was clearly separated from the remaining populations. In TO population, the float length varied from 40 to 55% of the egg length, while in the others eight populations (AC, AP, ES, PA, PR, RJ, RO, SP) the float length represented 63 - 70% of entire length of egg (Table 2). Coincidentally the number of ribs observed in TO population was the lowest value (range $30-45 \pm 6.26$). With respect of anterior deck tubercles numbers, AC population showed the least amount of tubercles in an area of 300 μm , where only tubercles with a perimeter of $\leq 5 \mu\text{m}$ were measured. In contrast, PA population showed the highest number of tubercles in an area of 300 μm , and also greater tubercles perimeter (Table 2).

Descriptive analysis. Results of both normality and homogeneity tests applied to 26 attributes showed that all attributes had a normal distribution. Anova-one way - All attributes showed mean differences ($p \leq 0.05$) among the nine populations of the *An. darlingi*, therefore, all attributes were considered in the next analyses.

Principal Component Analysis. Fourteen attributes were standardized of the unequally scaled attributes to zero mean and unit variance, to ensure equal weighting in the analysis. Partial tabulation of the results showed that the first principal component accounted for 33 % of the variation and the first five components explaining 87.1 % of the variation (Table 3). Consequently, components 6-14 were discarded. Considering interpretation of the two principal components in detail, plots were made of the appropriate eigen vectors. Component one carried heavy positive weightings for the deck length as a percentage of egg length (G), the deck length as a percentage of egg width (H), deck perimeter as a percentage of egg width (F), deck perimeter as a percentage of egg length (D) and float length as a percentage of egg length (B), along with somewhat smaller loadings for float length for rib (C), posterior deck perimeter as a percentage of deck perimeter (J), anterior deck perimeter as a percentage of deck perimeter (I) and ratio of egg length / egg width (A) (Figure 2). In component two, a heavy positive loading for posterior deck

perimeter as a percentage of deck length (M), anterior deck perimeter as a percentage of deck length (L), ratio of float length / rib (E) ratio of anterior deck tubercle means / tubercles number (N), float length as a percentage of egg length (B), deck perimeter as a percentage of egg length (D) and deck perimeter as a percentage of egg width (F), with somewhat smaller loading for posterior deck perimeter as a percentage of deck perimeter (J), ratio of egg length / egg width (A) and float length for rib (C) (Figure 2).

Figure 2. Plot of the first two principal components based on fourteen attributes of the eggs of nine populations of *An. darlingi*. Variation is indicated between brackets.

Discriminant function analysis. Derivation of discriminant analysis was performed for the same 14 attributes of the eggs. The four functions derived were significant (Table 4), functions 1 and 2 captured 47.2 and 23.7% (total 70.95) of the population differences, respectively. Summary of discriminant function analysis showed discrimination from TO population to the others eight populations, whereas AC, AP, ES, PA, PR, RJ, RO and SP populations overlapped among them (Figure 3). A second step of discriminant function analysis was conducted based on the remaining eight *An. darlingi* populations to check the dissimilarities among them.

Table 2. Attributes of the eggs of nine populations of *An. darlingi* measured from 3-5 eggs from each five females

Attributes	Mean ± standard deviation								
	AC n = 22	AP n = 21	ES n = 20	PA n = 24	PR n = 19	RU n = 22	RO n = 23	SP n = 19	TO n = 18
Linear Dimensions									
EL	425,23 ± 13,18	446,95 ± 17,46	429,8 ± 14,59	434,04 ± 3,23	432,11 ± 7,15	440,27 ± 8,31	432,57 ± 5,66	446,37 ± 16,75	431,11 ± 6,84
EW	177,5 ± 9,09	177,19 ± 13,01	150,8 ± 9,65	161,39 ± 4,30	181,84 ± 7,62	175,09 ± 6,69	171,35 ± 3,28	168,32 ±	159,56 ±
ELWR	2,40 ± 0,14	2,53 ± 0,12	2,86 ± 0,18	2,69 ± 0,07	2,38 ± 0,09	2,52 ± 0,09	2,52 ± 0,02	2,66 ±	2,70 ±
Float Attributes									
FL	274,32 ± 23,26	310,89 ± 6,71	299,54 ± 17,35	290,77 ± 5,74	288,35 ± 14,02	277,11 ± 21,98	289,69 ± 15,06	282,59 ± 13,58	212,30 ± 28,27
FLELP	0,65 ± 0,06	0,70 ± 0,03	0,7 ± 0,05	0,67 ± 0,01	0,67 ± 0,03	0,63 ± 0,05	0,67 ± 0,03	0,63 ± 0,03	0,49 ± 0,07
NR	49 ± 3,40	54 ± 2,96	51 ± 4,50	47 ± 1,12	49 ± 2,73	45 ± 5,36	53 ± 3,06	53 ± 3,31	39 ± 6,26
FLNRR	5,64 ± 0,58	5,73 ± 0,29	5,92 ± 0,62	6,20 ± 0,17	5,95 ± 0,31	6,28 ± 0,83	5,52 ± 0,42	5,40 ± 0,38	5,57 ± 0,55
Deck									
DP	535,09 ± 28,52	567,93 ± 25,45	545,69 ± 29,62	568,70 ± 21,81	566,54 ± 45,66	496,33 ± 37,49	506,23 ± 22,11	536,03 ± 39,01	343,00 ± 36,98
DL	257,86 ± 31,23	259,22 ± 21,27	247,73 ± 26,88	294,41 ± 15,17	261,73 ± 29,37	231,02 ± 24,30	238,62 ± 14,85	250,74 ± 24,63	163,26 ± 20,77
ADP	251,89 ± 27,15	268,23 ± 24,37	253,92 ± 24,11	269,03 ± 22,10	271,68 ± 29,35	242,52 ± 20,35	248,36 ± 16,36	261,49 ± 26,35	178,60 ± 36,55
PDP	286,57 ± 31,41	294,50 ± 23,86	268,78 ± 27,70	291,34 ± 21,91	281,70 ± 32,94	258,35 ± 28,17	256,13 ± 17,28	270,33 ± 27,96	187,18 ± 35,66
DPELP	1,33 ± 0,15	1,27 ± 0,11	1,22 ± 0,13	1,29 ± 0,09	1,28 ± 0,14	1,15 ± 0,11	1,17 ± 0,07	1,20 ± 0,14	0,85 ± 0,17
DPEWR	3,03 ± 0,31	3,22 ± 0,31	3,61 ± 0,32	3,53 ± 0,18	3,11 ± 0,18	2,84 ± 0,26	2,96 ± 0,13	3,2 ± 0,34	2,15 ± 0,22
DPDLR	2,11 ± 0,29	2,20 ± 0,21	2,22 ± 0,23	1,90 ± 0,08	2,12 ± 0,14	2,17 ± 0,09	2,11 ± 0,05	2,12 ± 0,05	2,15 ± 0,08
DLELP	0,6 ± 0,08	0,58 ± 0,05	0,58 ± 0,07	0,68 ± 0,04	0,61 ± 0,07	0,52 ± 0,05	0,55 ± 0,03	0,56 ± 0,06	0,40 ± 0,08
DLEWR	1,46 ± 0,18	1,47 ± 0,14	1,65 ± 0,22	1,83 ± 0,12	1,44 ± 0,14	1,32 ± 0,14	1,39 ± 0,09	1,49 ± 0,17	1,07 ± 0,20
ADPDPP	0,47 ± 0,02	0,47 ± 0,03	0,47 ± 0,04	0,48 ± 0,02	0,49 ± 0,01	0,48 ± 0,02	0,49 ± 0,01	0,49 ± 0,01	0,49 ± 0,02
PDPDPP	0,53 ± 0,03	0,52 ± 0,02	0,49 ± 0,04	0,52 ± 0,02	0,51 ± 0,01	0,52 ± 0,02	0,51 ± 0,01	0,51 ± 0,01	0,51 ± 0,02
ADPPDPR	0,88 ± 0,07	0,91 ± 0,07	0,95 ± 0,04	0,93 ± 0,07	0,97 ± 0,03	0,94 ± 0,07	0,97 ± 0,03	0,97 ± 0,03	0,95 ± 0,06
ADPDLR	0,99 ± 0,12	1,04 ± 0,13	1,03 ± 0,06	0,91 ± 0,06	1,04 ± 0,07	1,05 ± 0,06	1,04 ± 0,02	1,04 ± 0,04	1,05 ± 0,06
PDPDLR	1,12 ± 0,16	1,14 ± 0,13	1,09 ± 0,06	0,99 ± 0,05	1,08 ± 0,08	1,12 ± 0,05	1,07 ± 0,03	1,08 ± 0,02	1,10 ± 0,04
Anterior deck tubercles									
*TN	12 ± 1,89	14 ± 2,26	15 ± 2,02	21 ± 2,55	17 ± 1,32	17 ± 1,96	16 ± 1,17	19 ± 0,67	19 ± 0,99
*TP (mean)	5,92 ± 0,28	5,68 ± 0,26	5,77 ± 0,23	6,06 ± 0,26	5,97 ± 0,22	5,80 ± 0,21	5,77 ± 0,21	5,99 ± 3,14	5,73 ± 6,81
TPMTNR	0,51 ± 0,09	0,42 ± 0,07	0,40 ± 0,05	0,29 ± 0,04	0,35 ± 0,03	0,35 ± 0,04	0,36 ± 0,03	0,32 ± 1,37	0,31 ± 1,45
Micropyla									
MDP	46,01 ± 3,20	47,35 ± 4,17	42,58 ± 5,14	52,42 ± 5,76	52,30 ± 3,90	44,86 ± 3,69	43,26 ± 2,99	45,79 ± 3,14	40,78 ± 6,81
NMD	7 ± 0,55	7 ± 0,66	7 ± 0,79	7 ± 0,62	7 ± 1,00	7 ± 0,83	7 ± 0,60	7 ± 0,67	6 ± 0,99

Abbreviations: EL, egg length; EW, egg width; ELWR, egg length/egg width ratio; FL, float length; FLELP, float length as a % egg length; NR, number of ribs; FLNRR, float length/number of ribs ratio; DP, deck perimeter; DL, deck length; ADP, anterior deck perimeter; PDP, posterior deck perimeter; DPELP, deck perimeter/egg length ratio; DPEWR, deck perimeter/egg width ratio; DPDLR, deck perimeter/deck length ratio; DLELP, deck length as a % egg length; DLEWR, deck length/egg width ratio; ADPDPP, anterior deck perimeter as a % deck perimeter; PDPDPP, posterior deck perimeter as a % deck perimeter; ADPPDPR, anterior deck perimeter/posterior deck perimeter ratio; ADPDLR, anterior deck perimeter/deck length ratio; PDPDLR, posterior deck perimeter/deck length ratio, TN, tubercle numbers; TP, tubercles perimeters mean; TPMTNR, tubercles perimeters mean/tubercles number ratio; MDP, micropylar disk perimeter; NMD, number of micropylar disc. * Number and perimeter in an area of 300 µm

The results indicated that PA population is distinct from the others seven populations (Figure 4). Moreover, the phenogram indicated that populations from Acre, Pará, Rondônia, São Paulo and Paraná are more similar than the remaining populations. TO populations is more dissimilar (Figure 5).

Table 3. Partial tabulation of principal components analysis of fourteen attributes of eggs of nine populations of *An. darlingi*

Attributes / Principal components (% of variance)	1 (32.9)	2 (50.5)	3 (66.2)	4 (78.7)	5 (87.1)
ELWR	0,036	-0,160	-0,142	0,272	0,922
FLELP	0,838	0,338	-0,065	0,115	-0,136
FLNRR	0,270	0,034	-0,214	-0,204	-0,130
DPELR	0,821	0,357	0,282	0,102	-0,182
DPEWR	0,885	0,230	-0,103	0,263	0,243
DPDLR	-0,267	0,681	-0,562	0,335	-0,032
DLELP	0,949	-0,410	0,206	0,012	-0,149
DLEWR	0,942	-0,104	0,145	0,101	0,240
ADPDPP	-0,252	0,029	0,920	0,207	0,046
PDPDPP	-0,113	0,253	0,747	-0,560	0,220
ADPPDPR	-0,167	-0,256	0,232	0,871	-0,199
ADPDLR	-0,473	0,659	0,300	0,491	-0,009
PDPDLR	-0,350	0,884	0,115	-0,171	0,147
TPMTNR	0,266	0,561	-0,293	-0,208	0,026

Abbreviations: ELWR, egg length/egg width ratio; FLELP, float length as a % egg length; FLNRR, float length/number of ribs ratio; DPELR, deck perimeter/egg length ratio; DPEWR, deck perimeter/egg width ratio; DPDLR, deck perimeter/deck length ratio; DLELP, deck length as a % egg length; DLEWR, deck length/egg width ratio; ADPDPP, anterior deck perimeter as a % deck perimeter; PDPDPP, posterior deck perimeter as a % deck perimeter; ADPPDPR, anterior deck perimeter/posterior deck perimeter ratio; ADPDLR, anterior deck perimeter/deck length ratio; PDPDLR, posterior deck perimeter/deck length ratio, TPMTNR, tubercles perimeters mean/tubercles number ratio;

Table 4. Summary of discriminant function analysis of fourteen attributes of *An. darlingi* eggs

Discriminant function	Eigenvalue	% variance	Chi-square	df	p value
1	6.611	47.2	899.151	112	< 0.0001*
2	3.310	23.7	605.853	91	< 0.0001*
3	2.107	15.1	391.275	72	< 0.0001*
4	0.963	6.9	226.327	55	< 0.0001*

*statistically significant p value

Figure 3. Plot of the first two discriminant functions (first step) based on attributes of the eggs of nine populations of *An. darlingi*

Figure 4. Plot of the first two discriminant functions (second step) based on attributes of the eggs of nine populations of *An. darlingi*

Figure 5. Phenogram with Euclidean distance among eggs of nine populations of *An. darlingi*

Discussion

Anopheles darlingi was described based on morphological characteristics of adults, larva, pupa and egg from specimens collected in Rio de Janeiro State, Brazil. Galvão et al. (1937) examined male genitalia and eggs from specimens collected in Pereira Barreto (former known as Novo Oriente), São Paulo State, Brazil, and recognized morphological differences with *An. darlingi*. As such, Galvão et al. (1937) described as *An. darlingi* var. *paulistensis*. Galvão & Barreto (1939) obtained a reduced number of eggs of *An. darlingi* var. *paulistensis* of the same oviposition, but enough to observe variation in corolla and posterior end structures. Among the SEM eggs analyzed herein, we observed variations of both structures in a few specimens (Figures 6A; 6B), with the majority of eggs identified as the “normal” type defined by Galvão & Barreto (1939). Hinton (1938) studied *Anopheles* species eggs and concluded that *Anopheles* is polymorphic in respect to egg structure. The temperature is an important factor for inducing egg polymorphism. For example, Saliternik (1957) observed that in spring, when the temperature is low, females of *An. sacharovi* had rudimentary or small floats. Deane & Causey (1943) stimulated

females of *An. gambiae* to feed on digested blood. After that, females were kept low temperature for digestion, and then the eggs were laid at room temperature. As a result, those authors observed changes with a partial or almost fusion of reticulated, polygonal exochorion over the dorsal portion of the eggs. Changes in egg morphology were also observed in natural populations of four *Anopheles* species. The deck structure of *An. sinensis*, *An. lesteri*, *An. yatsushiroensis* and *An. sineroides* varied in individuals from the summer compared to those collected in the autumn. In all four species, the deck was narrower when the temperature was low, becoming wider when the temperature increased in the autumn (Otsuru & Ohmori 1960). Egg morphological variation was registered in *Aedes aegypti* (Steinwascher 1984), *An. albimanus* (Rodrigues et al. 1992), *An. aquasalis* (Linley et al. 1993b), *An. dirus* complex (Damrongphol & Baimai 1989), *An. gambiae* Complex (Lounibos et al. 1999), *An. nuneztovari* (Linley et al. 1996), *An. punctipennis* (Fritz & Washino 1992), *An. quadrimaculatus* Complex (Linley et al. 1993a) and *Culex quinquefasciatus* (Suman et al. 2009). However no association was made between morphological variation and enviromental/climate factors.

Figure 6. Differentiated structure of egg of *An. darlingi*. A – corolla, B – posterior end

We analyzed eggs from *An. darlingi* populations from different geographical regions that support distinct biomes: Amazon forest northeast of Amazon River basin (AP), Amazon forest south of Amazon River basin (AC, PA, RO), east Atlantic forest (ES, RJ, SP), southwest Atlantic forest (PR) and Cerrado from central Brazil (TO). Considering results of the statistical analyses of 26 attributes examined and

results of discriminant analysis of 14 derived attributes, TO population can be separated from the remaining AC, AP, ES, PA, PR, RJ, RO and SP populations. Considering ratio of the float length and egg length, it becomes evident that a small float length present in TO population clearly distinguishes it from the remaining populations. Results of the second step of discriminant analysis showed PA population distinct from AC, AP, ES, PR, RJ, and RO populations. The former population has the highest anterior deck tubercles number, varying from 17 to 25 ($SD \pm 2.5$), and anterior deck tubercles perimeter mean varying from 5.62 to 6.49 ($SD \pm 0.26$). Similar results were obtained in the Euclidean distance phenogram (Figure 5). PCA indicated that the deck length as a percentage of egg length (G), the deck length as a percentage of egg width (H), deck perimeter as a percentage of egg width (F), deck perimeter as a percentage of egg length (D) and float length as a percentage of egg length (B) (Figure 2) contributed in greater proportion to population distinction. Results showed major differences regarding characteristics of the whole egg (length, width), float and deck that can be distinguishable based on SEM.

Employing a fragment of the maternal inheritance gene cytochrome c oxidase subunit I (COI) of mtDNA, Pedro & Sallum (2009) observed that *An. darlingi* populations from Rio de Janeiro and Espírito Santo form a cluster that is distinct from the others population from north, south-west and mid-west Brazil. Evidence from previous study in *Drosophila* had shown that egg size is a maternal inheritance (Azevedo et al. 1997). Unlike Pedro & Sallum (2009) eggs populations from Espírito Santo and Rio de Janeiro analyzed herein did not clustered. And also ES and RJ are more similar between them than the remaining eggs populations (Figures 5). AC, AP, RO and SP eggs population are more similar, moreover, PR eggs population is little dissimilar than these four last populations (Figure 5). As shown, TO and PA eggs populations were more distinct to the remaining seven populations (Figures 4 and 5).

Many studies showed the great importance of external morphology of eggs to define diagnostic characters to separate species (Sallum et al. 2010; Nagaki et al. 2010; 2011). Herein, variations were observed in some eggs structure of the same oviposition, as well in some egg structure; however is not informative to separate *An.*

darlingi populations. These variations is almost certainly adaptative, because egg morphology was partially dependent upon of the size of the female as well as environment factors such as mainly temperature, humidity and food supply (Steinwascher 1984).

Acknowledgements

We thank Professor Maria Cecilia Salvadori, Instituto de Fisica, Universidade de São Paulo for allowing us to use the scanning electron microscope Jeol 6460LV and Daniel Corugedo Flores for handling the scanning electron microscope. This investigation received financial support from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo FAPESP (Grant 05/53973-0 to MAMS), CNPq (BPP300351/2008-9 to MAMS) for additional financial support. MTM is a doctorate recipient of a FAPESP scholarship (FAPESP no. 2007/07573-5).

References

- Arruda M, Carvalho MB, Nussenzweig RS, Maracic M, Ferreira AW, Cochrane AH 1986. Potential vectors of malaria and their different susceptibility to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in northern Brazil identified by immunoassay. Amer J Trop Med Hyg. 35: 873–881.
- Azevedo RBR, French V, Partridge L 1997. Life-history consequences of egg size in *Drosophila melanogaster*. Amer Nat 150: 250-282.
- Causey OR, Deane LM, Deane MP 1944. An illustrated key to the eggs of thirty species of Brazilian anophelines. with several new descriptions. Am J Hyg 39: 1-7.
- Charlwood JD 1996. Biological variation in *Anopheles darlingi* Root. Mem Inst Oswaldo Cruz 84: 501-514.

- Conn JE, Vineis JH, Bollback JP, Onyabe DY, Wilkerson RC, Póvoa MM 2006. Population structure of the malaria vector *Anopheles darlingi* in a malaria-endemic region of eastern Amazonian Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 74: 798-806.
- Cova Garcia P 1946. Notas sobre los anofelinos de Venezuela y su identificación. *Caud Amar Conf Sanit Panam* 12: 1-208.
- Damrongphol P, Baimai V 1989. Scanning electron microscopic observations and differentiation of eggs of the *Anopheles dirus* complex. *J Am Mosq Control Assoc* 5: 563-568.
- Deane MP, Causey OR 1943. Viability of *Anopheles gambiae* eggs and morphology of unusual types found in Brazil. *Am J Trop Med*. 23: 95-103.
- Deane LM, Causey OR, Deane MP 1948. Notas sobre a distribuição e biologia dos anofelinos das regiões nordestina e amazônica do Brasil. *Rev Serv Esp Saúde Publica*. 4: 827-965.
- Deane LM 1986. Malaria vectors in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 81: 5-14.
- Fleming G 1986. *Biologia y Ecologia de los Vectores de la Malaria*. OPS. Washington DC. 54 pp.
- Forattini OP 1987. Comportamento exofílico de *Anopheles darlingi* Root, em região meridional do Brasil. *Rev Saúde Públ, São Paulo*. 21: 291-304.
- Forattini OP. *Culicidologia médica*. São Paulo: EDUSP. 2002. 2 v.
- Fritz GN, Washino RK 1992. Evidence of seasonal eggs in *Anopheles punctipennis* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 29: 704-706.
- Galvão AA, Lane J, Corrêa R. 1937. Notas sobre os *Nyssorhynchus* de São Paulo V. Sobre os *Nyssorhynchus* do Novo Oriente. *Rev Biol and Hig* 8: 37-45.
- Galvão AA, Barreto MP 1939. Contribuição ao conhecimento dos primeiros estádios dos anofelinos de São Paulo. *Rev Biol Hyg* 9: 110-115.
- Gama RA, Santos RL, Santos FD, Silva IM 2009. Periodicity of capture of the *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) in Porto Velho, Rondônia, Brazil. *Neotrop Entomol* 38: 677-682.

- Harbach RE, Knight 1980. Taxonomists' glossary of mosquito anatomy. Plexus Publishing. Inc.. Marlton. New Jersey.
- Herrera S, Suarez MF, Sanchez GI, Quinones ML, Herrera M 1987. Uso de La técnica inmuno-radiométrica (IRMA) em *Anopheles* de Colombia para La identificación de esporozoitos de *Plasmodium*. Col Med. 18: 2-6.
- Hinton HE 1968. Observations on the biology and taxonomy of the eggs of *Anopheles* mosquitos. Bull Entomol Res 57: 495-515.
- Hugh G, Gauch JR 1982. Multivariate in community ecology. Cambridge University Press. Cambridge. 298 pp.
- Johnson RA, Wichern DW 1999. Applied multivariate statistical analysis. 4th ed. Upper Saddle River. New Jersey: Prentice-Hall. 815 p.
- Kreutzer RD, Kitzmiller JB, Ferreira E 1972. Inversion polymorphism in the salivary gland chromosomes of *Anopheles darlingi* Root. Mosq News 32: 555-565.
- Linley JR 1992. The eggs of *Anopheles atropos* and *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae). Mosq Syst 24: 40-50.
- Linley JR, Kaiser PE, Cockburn AF 1993a. A description and morphometric study of the eggs species of the *Anopheles quadrimaculatus* complex (Diptera: Culicidae). Mosq Syst 25: 124-147.
- Linley JR, Lounibos LP, Conn J 1993b. A description and morphometric analysis of the eggs of four South American populations of *Anopheles (Nyssorhynchus) aquasalis* (Diptera: Culicidae). Mosq Syst 25: 198-214.
- Linley JR, Lounibos LP, Conn J, Duzak D, Nishimura N 1996. A description and morphometric comparison of eggs from eight geographic populations of the South American malaria vector *Anopheles (Nyssorhynchus) nuneztovari* (Diptera: Culicidae). J Am Mosq Contr Assoc 12: 275-292.
- Linthicum KJ 1988. A revision of the *Argyritarsis* Section of the subgenus *Nyssorhynchus* of *Anopheles* (Diptera: Culicidae). Mosq Syst 20: 101-271.

- Lounibos LP, Coetzee M, Duzak D, Nishimura N, Linley JR, Service MW, Cornel AJ, Fontenille D, Mukwaya LG 1999. A description and morphometric comparison of eggs of species of the *Anopheles gambiae* complex. J Am Mosq Contr Assoc 15: 157–185.
- Lounibos LP, Conn JE 2000. Malaria vector heterogeneity in South America. Am Entomol 46: 238-249.
- Malafronte RS, Marrelli MT, Marinotti O 1999. Analysis of ITS2 DNA sequences from Brazilian *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol 36: 631-634.
- Manguin S, Wilkerson RC, Conn JE, Rubio-Palis Y, Dannoff-Burg AD, Roberts DR 1999. Population structure of the primary malaria vector in South America, *Anopheles darlingi*, using isozyme, random amplified polymorphic DNA, internal transcribed spacer 2, and morphologic markers. Am Trop Med Hyg 60: 364-376.
- Mirabello L, Conn JE 2006. Molecular population genetics of the malaria vector *Anopheles darlingi* in Central and South America. Heredity 96: 311-321.
- Moutinho PR, Gil LHS, Cruz RB, Ribolla PEM 2011. Population dynamics, structure and behavior of *Anopheles darlingi* in a rural settlement in the Amazon rainforest of Acre, Brazil. Malaria J 10: 174.
- Nagaki SS, Motta MA, Sallum MAM 2010. Redescription of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *antunesi* Galvão & Amaral and description of a new species of the *Myzorhynchella* Section (Diptera: Culicidae) from Serra da Mantiqueira, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 105: 278-285.
- Nagaki SS, Silva AM, Sallum MAM 2011. Redescription of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *lutzii*, and resurrection of *Anopheles guarani* from the synonymy with *An. lutzii* (Diptera: Culicidae). Ann Entomol Soc Am 104: 374-388.

- Oliveira-Ferreira J, Lourenço-de-Oliveira R, Teva A, Deane LM, Daniel-Ribeiro CT 1990. Natural malaria infection in anophelines in Rondônia State, Brazilian Amazon. *Amer J Trop Med Hyg*. 43: 6-10.
- Otsuru M, Ohmori Y 1960. Malaria studies in Japan after World War II. Part II. The research for *Anopheles sinensis* sibling species group. *Jap J Exp Med* 30: 33-65.
- Pedro PM, Sallum MAM 2009. Geographic impediments to gene flow have moulded the spatial expansion and population structure of the Neotropical malaria vector *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae). *Biol J Linn Soc* 97: 854-866.
- Rodrigues MH, Chavez B, Orozco A, Loyola EG, Martinez-Palomo A 1992. Scanning electron microscopic observations of *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) eggs. *J Med Entomol* 29: 400-406.
- Rosa-Freitas MG, Broomfield G, Priestman A, Milligan PJ, Momen H, Molyneux DH 1992. Cuticular hydrocarbons, isoenzymes and behavior of three populations of *Anopheles darlingi* from Brazil. *J Amer Mosq Control Assoc* 8: 357-366.
- Rosa-Freitas MG, Lourenço-de-Oliveira R, Carvalho-Pinto CJ, Flores-Mendoza C, Silva-do-Nascimento TF 1998. Anophelinae species complexes in Brazil. Current knowledge of those related to malaria transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93: 651-655.
- Root FM 1926. Studies on Brazilian Mosquitoes I. The Anophelines of the *Nyssorhynchus* Group. *Am J Hyg* 6: 684-717.
- Rozeboom LE 1942. Subspecific variations among Neotropical *Anopheles* mosquitoes and their importance in the transmission of malaria. *Am J Trop Med* 22: 235-255.
- Saliternik Z 1957. *Anopheles sacharovi* Favr in Israel. *Riv Parassit* 18: 249-265.
- Sallum MAM, Foster P, Santos CLS, Flores DC, Motoki MT, Bergo ES 2010. 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 Entomol* 47: 504-526.

- Steinwascher K 1984. Egg size variation in *Aedes aegypti*: relationship to body size and other variables. *Am Midl Natur* 112: 76-84.
- Suman DS, Shrivastava AR, Parashar BD, Pant SC, Agrawal OP, Prakash S 2009. Variation in morphology and morphometrics of eggs of *Culex quinquefasciatus* mosquitoes from different ecological regions of India. *J Vector Ecol* 34: 191-199.
- Valle D, Monnerat AT, Soares MJ, Rosa-Freitas MG, Pelajo MM, Valle BS, Lenzi HL, Galler R, Lima JBP 1999. Mosquito embryos and eggs: polarity and terminology of chorionic layers. *J Insect Physiol* 45: 701-708.

CAPÍTULO 3. ESTUDO DA MORFOMETRIA GEOMÉTRICA DAS ASAS

A morfometria geométrica é uma ferramenta que permite a comparação dos padrões corporais considerando simultaneamente várias características de uma estrutura corporal (MONTEIRO e REIS, 1999); auxilia a descrever e localizar mais claramente as regiões de mudanças na forma corpórea e, sobretudo, construir e reconstituir graficamente as diferenças (MORAES, 2003). Para Culicidae, o uso das asas em estudos morfométricos tem permitido investigações como: a comparação entre populações geográficas e espécies crípticas, a avaliação de dimorfismo sexual alar, o estudo de variação temporal em cativeiro e na natureza, a investigação de assimetria alar, a pesquisa de efeitos morfológicos da presença/ausência de inseticidas, a descoberta de caracteres diagnósticos de espécies, entre outros (JIRAKANJANAKIT et al., 2007; 2008).

No presente capítulo, a morfometria geométrica das asas de *An. darlingi* coletadas em 10 localidades de cinco ecorregiões foram comparadas. A seguinte hipótese foi testada: as populações de *An. darlingi* das regiões do interior e da costa da Mata Atlântica diferem das populações do Cerrado, do norte do Rio Amazonas e do Sul do Rio Amazonas.

3.1. MÉTODOS

3.1.1. Preparação das amostras de asas. A asa esquerda de fêmeas de *An. darlingi* foi montada com bálsamo do Canadá entre lâmina e lamínula, e para evidenciar as veias e remover o excesso de escamas das asas, foi feita uma preparação química utilizando o seguinte protocolo:

- Após a remoção, a asa esquerda foi mantida em solução 10% KOH por

12 horas a temperatura ambiente para remoção do excesso de escamas;

- Depois deste período, o KOH foi removido com a lavagem da asa em solução de ácido acético 20%;
- As asas foram coradas com fucsina por 60 minutos;
- E em seguida desidratadas com uma série de trocas de álcool 80%, 90%, 95% e 98%, deixando agir por no mínimo 10 minutos cada concentração, finalmente mantidas em eugenol para montagem em Bálsamo do Canadá.

3.1.2. Obtenção das imagens. As imagens das asas foram capturadas com auxílio de uma câmera digital (Leica DFC320) acoplada a um estéreo microscópio de óptica plana Leica S6 com aumento de 40X. Sobre essas asas foram tomadas as coordenadas posicionais de 18 pontos anatômicos sobre um plano cartesiano. Em seguida, as análises estatísticas foram realizadas. Os métodos de morfometria geométrica seguiram em linhas gerais os empregados por ROCHA (2005).

3.1.3. Análise da morfometria geométrica. Para as análises, os indivíduos de dez populações de *An. darlingi* foram agrupados de acordo com as ecorregiões em que foram coletados: Cerrado (CER), localidades dos estados de Goiás e Tocantins; costa da Mata Atlântica (CAF), localidades dos estados de Espírito Santo e Rio de Janeiro; interior da Mata Atlântica (IAF), localidades dos estados do Paraná e São Paulo; norte do rio Amazonas (NAR), localidades dos estados do Amazonas e Amapá; e sul do rio Amazonas (SAR), localidades dos estados do Mato Grosso e Pará. A maioria das amostras é das mesmas localidades daquelas analisadas por PEDRO e SALLUM (2009), com amostras adicionais de localidades dos estados de Goiás e Tocantins (população CER).

As variáveis canônicas foram empregadas na comparação entre as

populações. A primeira e segunda variável canônica são por definição as mais informativas (MONTEIRO e REIS, 1999), por este motivo foram consideradas para interpretação. Essas duas variáveis foram graficamente plotadas descrevendo as diferenças entre os grupos..

O efeito da alometria dentro de cada um dos três grupos foi estimada pela análise de regressão na forma e no tamanho do centróide das populações. A significância estatística foi estimada por 1.000 testes de permutações. A análise de regressão permite a remoção completa da variação do tamanho e assim os efeitos adversos foram mínimos. A disparidade métrica da forma entre os grupos foi avaliada por 10.000 testes de permutações. Adicionalmente um fenograma de dissimilaridade foi obtido com base na matriz de distância de Procrustes.

Para testar a precisão da classificação morfométrica, cada indivíduo foi reclassificado de acordo com a dissimilaridade da forma da asa de cada grupo. A significância estatística de cada função discriminante e a distância generalizada correspondente foram estimadas em 1.000 testes de permutação.

O tamanho global da asa foi descrito pelo vetor “tamanho de centróide”, que é determinado pela raiz quadrada das somas dos quadrados das distâncias de cada ponto anatômico ao centróide. Os tamanhos de centróide das populações de *An. darlingi* foram comparados com o teste ANOVA.

A digitalização dos pontos anatômicos e análise de dados foram realizadas utilizando os seguintes softwares: TPS (ROHLF, 2001), morphoJ (KLINGENBERG, 2011), PAD e COV (DUJARDIN, 2010 disponível no site <http://www.mpl.ird.fr/morphometrics>). Os gráficos foram gerados com a utilização dos programas Statistica 7.0 (StatSoft Inc. 2002) e TreeView (PAGE, 1996).

3.2. RESULTADOS

MANUSCRITO 2 – “Wing shape variation in populations of *Anopheles darlingi* Root, a major malaria vector in South America”

(manuscrito submetido à revista Infection, Genetics and Evolution)

Wing shape variation in populations of *Anopheles darlingi* Root, a major malaria vector in South America

MAYSA TIEMI MOTOKI^{1*}, LINCOLN SUESDEK^{2,3}, EDUARDO STERLINO BERGO⁴, & MARIA ANICE MUREB SALLUM¹

¹Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, Avenida Doutor Arnaldo 715, CEP 01246-904, São Paulo, Brazil

²Laboratório de Parasitologia, Instituto Butantan, Universidade de São Paulo, Avenida Vital Brazil 1500, CEP 05503-900, São Paulo, Brazil

³Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, CEP 05508-900, São Paulo, Brazil

⁴Superintendência de Controle de Endemias, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Araraquara, São Paulo, Brazil

*Corresponding author:

Maysa Tiemi Motoki. Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, Avenida Dr. Arnaldo 715, CEP 01246-904, São Paulo, Brazil. Telephone and fax number: 55-11-30617926.

Email: maysatm@usp.br

Email: Lincoln Suesdek <linrocha@butantan.gov.br>

Eduardo Sterlino Bergo <edusteber@uol.com.br>

Maria Anice Mureb Sallum <masallum@usp.br>

Abstract

Morphological characteristics of wings were employed to test the hypothesis that *An. darlingi* populations from the inner and coastal regions of Atlantic Forest differ from those populations from Cerrado, South of Amazon River and North of Amazon River - Brazilian ecoregions. Geometric morphometrics of wings were performed using discriminant analysis. The results suggested that individuals from inner and coastal of Atlantic Forest are morphological similar for each other than to Cerrado, South and North of Amazon River populations, consequently, more distinct from those remaining populations.

Keywords: geometric morphometrics, wing shape, *An. darlingi*, malaria vector, ecoregions

1. Introduction

Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi Root is recognized as one of the most anthropophilic species of *Anopheles* in the Americas (Fleming 1986). This species is found throughout South America from the eastern Andes, in Colombia, Venezuela, Bolivia, Peru, Ecuador, Brazil, the Guianas and as far south as northern Argentina (Forattini 1962). In Central America, *An. darlingi* was registered in locations in the Gulf of Mexico, Belize, Guatemala, Honduras (Faran and Linthicum 1981), El Salvador (Manguin et al. 1996) and Panama (Loaiza et al. 2009).

This species is a primary vector of parasites of the genus *Plasmodium*, which can cause malaria in humans, in areas of the Amazon River basin (Deane 1986) as well as in other regions in South and Central Americas (Manguin et al. 1999). It has been found infected with *Plasmodium falciparum* Welch, *P. vivax* Grassi & Feletti and *P. malariae* Laveran (Deane et al. 1948; Arruda et al. 1986).

This mosquito species was described based on the morphological characteristics of adults, larvae and pupae collected in Caxiribú, near Porto das Caxias, Itaboraí District, Rio de Janeiro State, Brazil. Posteriorly, Galvão et al. (1937) examined male genitalia and eggs of individuals from Pereira Barreto municipality (formerly known as Novo Oriente), São Paulo State, Brazil, and observed morphological differences that suggested the presence of more than one species under the name *An. darlingi*. Then, population from Pereira Barreto was described and validated as *An. darlingi* var. *paulistensis*. Later, Causey et al. (1942) considered those morphological differences intraspecific polymorphisms and synonymized *An. darlingi* var. *paulistensis* with *An. darlingi*. Besides morphological heterogeneity, studies on aspects of biology of *An. darlingi* have shown variation among populations from Brazil (Lourenço-de-Oliveira et al. 1989; Forattini 1987; Buralli and Bergo 1988; Klein and Lima 1990; Charlwood 1996), Suriname (Rozendaal 1990), French Guiana (Pajot et al. 1977), Guyana (Rambajan 1984), Colombia (Quiñones and Suarez 1990) and Venezuela (Rubio-Palis 1995). Furthermore, populations of *An. darlingi* from northern and southern Brazil shows polymorphisms in the banding pattern of the fourth-instar larval polytene chromosome (Kreutzer et al. 1972; Tadei et al. 1982), in the cuticular hydrocarbons and isoenzymatic patterns (Rosa-Freitas et al. 1992), in protein profile of the salivary gland (Moreira et al. 2001), and in the sequence of second internal transcribed spacer (ITS2) of

ribosomal DNA (Malafronte et al. 1999), indicating the presence of variation at genetic level .

Considering the large distribution of *An. darlingi* through heterogeneous environments (Charlwood 1996) is intriguing that there is no robust evidence proving that it is a species complex (Mirabello and Conn 2006; Conn et al. 2006; Mirabello et al. 2008). However, results of analyses carried by Mirabello and Conn (2006), using data from the mitochondrial COI gene demonstrated the presence of a significant geographical differentiation between populations from Central and South America, likely because of an ancient evolutionary process. Within the group composed of populations from South America, Mirabello and Conn (2006) detected two clusters that coincide with centers of endemism within the Amazonas / Solimões River basin, the Guyana shield (northern Amazonas) and the South America (Belém, Pará State), with a population expansion that occurred during the Pleistocene. Recently, Pedro and Sallum (2009) showed that population expansion of *An. darlingi* was not homogenous. The presence of geographic barriers of the Amazonas / Solimões River, the Andes and coastal mountains in eastern Brazil led to the presence of at least four subgroups within the South America group. It is worth noting that the population of the type locality of *An. darlingi*, in Rio de Janeiro State, coastal Atlantic Forest, is markedly different from others from Central Brazil and Amazon. Unfortunately, the distributional limits of these subgroups and the importance of landscape, defined by the various ecoregions of Brazil, are unknown. As noted in other groups of animals, i.e., *Glossina palpalis gambiensis* (Bouyer et al. 2007), *Triatoma infestans* (Schachter-Broide et al. 2009; Hernández et al. 2011), song birds (Desrochers 2010), landscape formations may affect genetic structuring of certain species.

Among several available approaches to assess biological significance of species and populations heterogeneity in insects, Dujardin (2008) defended the utility of the wing morphometry. Wing shape has been used as a tool both to define species limit (Dujardin 2008; Vidal et al. 2011) and to assess evolutionary aspects of distinct groups of animals (Dujardin 2008). It can be quantitatively described by geometric morphometrics, a cheap and powerful diagnostic tool that have been employed in several studies of distinct groups of organisms (Corti et al. 1998; Shipunov and Bateman 2005; Arbour et al. 2011; Clemente-Carvalho et al. 2011), including medically important insects (Bouyer et al. 2007;

Dujardin and Slice 2007). Wing morphometric analyses revealed that wing shape of *Aedes aegypti* (Linnaeus) is quantitatively inherited, showing microevolutionary variation patterns across consecutive generations (Jirakanjanakit et al. 2008), among geographically distant populations from different continents (Henry et al. 2010), and also in small geographical scales, within an urban area (Vidal and Suesdek 2011). Consistently, *Culex quinquefasciatus* Say exhibited wing shape variation that were correlated to genetic diversities across distinct eco-geographic regions in South America (Morais et al. 2010), and *Anopheles funestus* showed similar diversity association in Cameroon (Ayala et al. 2011).

In considering that representative populations of the groups recognized by Pedro and Sallum (2009) occur in a large geographic area (> 1 million km²), a great sampling effort would be necessary to perform a more comprehensive population genetic study of *An. darlingi*, and fill gaps in sampling areas of Brazilian Cerrado, Atlantic Forest and other Brazilian ecoregions. In this study, geometric properties of wings were compared between 10 populations of *An. darlingi* from five Brazilian ecoregions to test the hypothesis that *An. darlingi* populations from the inner and coastal regions of Atlantic Forest differ from those populations from Cerrado, South of Amazon River and North of Amazon River.

2. Materials and Methods

2.1. Mosquito sampling - Females of *Anopheles darlingi* were collected in ten localities of five ecoregions (Table 1; Figure 1) in Brazil to obtain parental progenies with adult males and females associated with pupal and fourth-instar larval exuviae. Additionally, larvae and pupae were collected in the same localities and kept in the laboratory until the emergence of adults. At least one adult male or female was used to identify the species using Forattini (2002) identification keys. Wings mounted on microscope slides and pupal and fourth-instar larval exuviae of associated adults are deposited in the Coleção Entomológica de Referência of Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, Brazil (FSP-USP).

For the analyses, individuals from 10 populations were combined based on ecoregions in which they were collected: Cerrado (CER), i.e., localities in Goiás and Tocantins states; Coastal Atlantic Forest (CAF), i. e., Espírito Santo and Rio de Janeiro states; Inner Atlantic Forest (IAF), i. e., Paraná and São Paulo states; North Amazon River (NAR), i. e., Amazonas and Amapá states; and South Amazon River (SAR), i. e., Mato Grosso and Pará states. Most of the samples were from the same localities employed by Pedro and Sallum (2009), with additional samples from Goiás and Tocantins (CER population).

Figure 1. Distribution of sampling localities of *An. darlingi*. Map of Brazil indicating the location of 10 sampling localities. Light gray: Amazon region, above Amazon River correspond North Amazon River and below correspond South Amazon River. Median gray: Cerrado. Dark gray: Coastal and Inner Atlantic Forest.

Table 1. Specimens ID, locality and geographic coordinates of *Anopheles darlingi* populations

Species ID	n	State, Municipality	Geographic coordinates
AM61A1, AM61A2, AM61A4, AM61B1, AM61B2, AM61B3, AM61B4, AM61C1, AM61C2, AM61C3, AM61F1, AM61F2, AM61F3, AM61F4, AM61F5, AM61I1, AM61I2, AM61I3, AM61I4, AM61I5, AM61I6	21	Amazonas, Barcelos	1°52'49"S 62°34'36,1"W
AP1, AP2, AP3, AP4, AP5, AP6, AP7, AP8, AP10, AP11, AP12, AP14, AP15, AP17, AP18, AP19, AP20, AP21, AP22, AP24, AP25, AP26, AP27, AP28, AP29, AP30, AP32, AP33, AP34, AP35	30	Amapá, Macapá	0°12'47.3"S 50°58'59.8"W
ES20(2)13, ES20(3)3, ES20(5)1, ES20(12)15, ES20(14)6, ES20(22)1, ES20(23)4	07	Espírito Santo, Sooretama	19°17'0.41"S 40°05'03.8"W
GO17-1, GO17-2, GO17-3, GO17-4, GO17-5, GO17-6, GO17-7, GO17-8, GO17-9, GO17-10	10	Goiás, Minaçu	13°33'25.8"S 48°09'09.5"W
MT-1, MT-2, MT-3, MT-4, MT-5, MT-6, MT-7, MT-9, MT-11, MT-12, MT-13, MT-14, MT-15, MT-16, MT-17, MT-18, MT-19	17	Mato Grosso, Sinop	11°51'50"S 55°30'14"W
PA14(1)2, PA14(2)4, PA14(3)1, PA14(4)3, PA14(5)2, PA14(6)4, PA14(7)11, PA14(9)7	08	Pará, Belterra	02°44'47.5"S 54°13'37.1"W
PR28(2)12, PR28(4)3, PR28(6)1, PR28(7)1, PR28(9)1, PR28(10)7, PR28(25)3, PR28(26)1, PR28(27)1, PR28(29)2, PR28(32)2, PR28(45)4	12	Paraná, Guaíra	24°16'17"S 54°17'26"W
RJ01(1)5, RJ01(2)1, RJ01(3)5, RJ01(4)7, RJ02(1)5, RJ02(2)1, RJ02(3)8, RJ02(4)2, RJ02(5)2, RJ02(6)3, RJ02(7)15, RJ02(8)2, RJ02(9)3, RJ02(10)3, RJ02(11)3, RJ02(12)1, RJ02(15)7, RJ02(17)4	18	Rio de Janeiro, Juturnaiba	22°37'60"S 42°17'60"W
SP66(1), SP66(9), SP69-1, SP69-2, SP69(2), SP69(3), SP69(4), SP69(5), SP73, SP73(16), SP73(17), SP73(18), SP73(19), SP73(20), SP73(21), SP73(16)3, SP73(17)6, SP73(19)12, SP73(20)8, SP73(21)1	20	São Paulo, Dourado	22°04'27.4"S 48°26'40.9"W
TO1(1), TO1(2), TO1(5), TO3(1), TO5(1), TO5(4), TO5(5), TO5(8), TO5(9), TO5(13), TO5(14), TO5(15), TO5(16), TO5(17), TO5(19), TO5(20), TO7(3), TO7(4), TO7(5), TO7(9), TO12(8), TO12(9), TO12(18)	23	Tocantins, Lagoa da Confusão	10°37'18.5"S 49°44'24.9"W

2.2. *Sample preparation and data collection* - Left wings of females were removed from adult and prepared before being mounted on microscope slides under a cover slip using Canada balsam. After being removed from adults, left wings were individually kept for 12 hours in 10% KOH solution at room temperature to remove most wing scales. Following, KOH was removed by washing the wings in a 20% solution of acetic acid. Wings were dyed with acid fuchsin for 60 minutes and after being dehydrated in ethanol series from 80% to 98% concentration. Dyeing the wings is an important step to make wing nervures more evident. A Leica DFC320 digital camera coupled to a Leica S6 stereomicroscope, with plain lenses, was used to capture the wing images under 40X magnification. These plain lenses avoid image distortion. Coordinates of 18 wing landmarks (Figure 2) were selected and digitized. Pictures of wings dyed with acid fuchsin are deposited in CLIC morphometrics database (<http://www.mpl.ird.fr/morphometrics/clic/index.html>).

Figure 2. Wing of *An. darlingi* showing the 18 landmarks used in the present analysis.

2.3. *Morphometric analyses* – Metric properties based on 18 landmarks after least-squares Procrustes superimposition were compared among groups of populations. Regarding to shape, discriminant canonical analysis was applied to assess differences among populations. Shape metric disparity between groups was evaluated through random permutation tests with 10,000 runs. Additionally, a phenogram of Procrustes distances was obtained. The global size of the wing was described by the isometric estimator “centroid size”. The latter is determined by the square root of the summed squared distances of each

landmark to a centroid point. Centroid sizes of population samples were compared using ANOVA. The allometric effect within each five group of population was examined by regression of Procrustes coordinates of wing centroid size and its statistical significance was determined by 1,000-run permutation tests.

2.4. Classification tests - To test accuracy of cluster recognition based on wing shape using validated classification, each individual was reclassified according to its wing similarity to the average shape of each group. Mahalanobis distances were used to estimate such metric distance. Statistical significance of each discriminant function was estimated by 1,000 permutation tests.

2.5. Softwares - Landmark digitizing was done with tpsDig (v1.40, James Rohlf) and data analyses were performed using software packages morphoJ (Klingenberg 2011), PAD and COV (J.P. Dujardin, available at <http://www.mpl.ird.fr/morphometrics/>). Graphical outputs were generated using Statistica 7.0 (StatSoft Inc. 2002) and TreeView (Page 1996).

3. Results

Wing size. Centroid sizes of population representatives varied from 1.43 mm to 2.00 mm. IAF population showed upper median value of 1.74 mm and mean value of 1.76 mm, followed by CER (median and mean = 1.67 mm); whereas CAF (median = 1.61 mm; mean = 1.62 mm), NAR (median = 1.62 mm; mean = 1.61 mm) and SAR (median = 1.60 mm; mean = 1.61). ANOVA revealed a significant distinction in some comparisons ($p = 0.04$), which is graphically described in Figure 3. Regression analysis of size against shape variables showed a significant ($p = 0.02$), however, slight allometric effect (1.26%). To assess the effect of allometry on the results of shape analyses, a second round of analyses were conducted from which the allometric residue was removed. Results (not shown) were nearly similar to those yielded before removal of allometry. Quantitative phenotypic divergence (Q_{st}) was 0.9100 for centroid size and 0.4476 for shape (first 16 relative warps).

Figure 3. Descriptive statistics of centroid sizes of samples of *An. darlingi*.

Wing shape. Results of metric disparity analyses of 18 landmarks after Procrustes superimposition revealed a significant distinction between the following population groups: CAF x CER ($p=0.004$), IAF x NAR ($p=0.031$), CAF x SAR ($p=0.011$), however, marginally significant between CER x NAR ($p=0.064$), and CAF x IAF ($p=0.057$). The phenogram indicates that CAF and IAF populations are more similar between them than to any remaining populations. Similarly, CER and NAR populations are more similar between them than they are to the remaining populations. SAR is the most dissimilar group (Figure 4). Results of discriminant analysis revealed divergences among groups, however, there are overlapping regions of all groups in the morphospace of canonical variables 1 and 2 (Figure 5). Results of classification are in Table 2

Figure 4. Phenogram of the Procrustes distances among populations samples of *An. darlingi*.

Table 2. Cross-validated reclassification of individuals from the five populational clusters of *An. darlingi*.

	Clusters	CER	CAF	IAF	NAR	SAR	Total(100%)
Reclassification	CER	20(66%)	13(34%)	-	-	-	33
	CAF	09(36%)	16(64%)	-	-	-	25
	CER	29(88%)	-	04(12%)	-	-	33
	IAF	08(25%)	-	24(75%)	-	-	32
	CER	23(70%)	-	-	10(30%)	-	33
	NAR	16(21%)	-	-	35(79%)	-	51
	CER	23(70%)	-	-	-	10(30%)	33
	SAR	08(32%)	-	-	-	17(68%)	25
	CAF	-	14(56%)	11(44%)	-	-	25
	IAF	-	13(41%)	19(59%)	-	-	32
	CAF	-	22(88%)	-	03(12%)	-	25
	NAR	-	06(12%)	-	45(88%)	-	51
	CAF	-	18(72%)	-	-	07(28%)	25
	SAR	-	05(20%)	-	-	20(80%)	25
	IAF	-	-	28(88%)	04(12%)	-	32
	NAR	-	-	09(18%)	42(82%)	-	51
	IAF	-	-	24(75%)	-	08(25%)	32
	SAR	-	-	07(28%)	-	18(72%)	25
	NAR	-	-	-	35(69%)	16(31%)	51
	SAR	-	-	-	09(36%)	16(64%)	25

Figure 5. Graphical presentation of contribution of each canonical variable (CV1 and CV2) yielded by multivariate comparison. Variation is indicated between brackets.

4. Discussion

In mosquitoes and other insects, geometric morphometrics analysis of the wing landmarks is a useful tool for studies regarding aspects of macroevolution and microevolution, and thus for distinguishing both species and populations. For example, wing geometry was applied to identify species of *Rodnius robustus* (Matias et al. 2001), and *Lutzomyia longipalpis* (De la Riva et al. 2001) complexes. The same tool was employed to assess population structuring associated with landscape and habitat isolation (Broide et al. 2004; Bouyer et al. 2007; Ayala et al. 2011), separate laboratory lines of *Ae.*

aegypti (Jirakanjanakit and Dujardin 2005), and identify *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) species (Calle et al. 2002; Calle et al. 2008), and *Culex* (Vidal et al. 2011) species.

Distinctly from wing shape, wing size is a labile trait that is influenced by temperature (Gibert et al. 2004, Polak et al. 2004), relative humidity (Morales-Vargas et al. 2010), and food availability (Jirakanjanakit et al. 2007). Contrasting, wing shape is genetically determined, and thus, has an evolutionary significance (Dujardin 2008; Jirakanjanakit et al. 2008).

Discriminant analyses were performed for each of 10 *An. darlingi* geographical populations (results not shown). Those results indicated slight dissimilarities between all 10 populations although the scores of Mahalanobis and Procrustes distances were not correlated with geographical distances. Consequently, if there is wing micro differentiation among *An. darlingi* populations, geographic distance seems to be an unimportant component.

In considering results previously mentioned, morphometric analyses were carried out to assess the influence of five major Brazilian ecoregions for wing shape and size. Briefly, Cerrado (CER) populations include localities from Goiás and Tocantins states; Coastal Atlantic Forest (CAF) - Espírito Santo and Rio de Janeiro states; Inner Atlantic Forest (IAF) - Paraná and São Paulo states; North Amazon River (NAR) - Amazonas and Amapá states; and South Amazon River (SAR) - Mato Grosso and Pará states.

The phenogram of Procrustes distances carried out with the present wing data set, indicated that populations from Atlantic Forest (CAF and IAF) are more similar to each other than to CER, SAR and NAR populations. According to Pedro and Sallum (2009), *An. darlingi* in Brazil are structured in five main population groups, i.e., Central Amazonia, southern Brazil, southeastern Brazil and two northeast Brazil. Southern Brazil population includes samples from IAF, whereas southeastern Brazil is composed of CAF populations. Similarity between IAF and CAF populations based on wing shape does not corroborate results of Pedro and Sallum (2009) mainly because COI analyses showed that Southern Brazil (IAF) population is genetically closer related to population from Central Amazonia than to southeastern Brazil (CAF). Limited dispersion across IAF and CAF caused by the coastal mountain range may have promoted COI genetic diversity between them, however, did not influence wing shape.

Additionally, the Procrustes distance phenogram showed differentiation between NAR and SAR populations. Similarly, Conn et al. (2006) using information from 8 microsatellite loci from 256 individuals of *An. darlingi* observed significant differentiation between individuals from locations north and south Amazon River, which may be caused by geographical barrier represented by Amazon River (Pedro and Sallum 2009). The wing phenogram also showed that samples from NAR are more similar to those from CER than to SAR. Likely, a higher similarity may be caused by the fact that in Amapá state there are areas of Cerrado and Amazon forest that may influence the dispersion of *An. darlingi* across those biomas, however, promoting dispersion in areas of Cerrado and Amazon Forest. In Amapá state, *An. darlingi* representatives were collected in rural areas of Macapá municipality, in the limit of Cerrado and Amazon Forest. However, *An. darlingi* from Barcelos, Amazon state, were collected in areas of dense Amazon forest with sparse and low human population in rural communities along Negro River. Considering that NAR population contains samples from Amazon Forest and also from an area situated in the limit between Amazon Forest and Cerrado, it would be important increasing sampling size and analyze wing geometry of individuals representatives of those two ecoregions of Amapá state, comparing them with samples from Amazon Forest and CER.

In considering that the phenogram showed similarity between CAF and IAF and a higher differentiation from CER, NAR and SAR, this pattern of similarities and differentiation is in agreement with Brazilian ecoregions. Statistically significant shape disparity were observed for CAF vs CER, IAF vs NAR and CAF vs SAR, suggesting that both geographical distance and ecoregions may represent barriers that promote heterogeneous gene flow among population of *An. darlingi* driving to population differentiation. Nevertheless, Q_{st} values were high for wing size and shape so that the influence of natural selection in producing this evolutionary pattern cannot be discarded.

As previously mentioned, the type-locality of *An. darlingi* is in Rio de Janeiro state. Moreover, *An. darlingi paulistensis* was described based on differences in external morphology of the eggs of specimens from Pereira Barreto, São Paulo state. Despite morphological differences in the egg morphology, *An. darlingi paulistensis* was considered conspecific and thus synonymized with *An. darlingi* by Causey et al. (1942). Contrasting, based on results of ITS2 sequence comparisons, Malafronte et al. (1999) hypothesized that

An. darlingi population from Dourado was not conspecific with *An. darlingi*. Contrasting, Manguin et al. (1999) employing ITS2 sequence data, including from representatives from Dourado, did not corroborate Malafronte et al. (1999) hypothesis. In the present study, it was assumed that IAF population may represent *An. darlingi paulistensis* because population from Dourado (IAF population) is situated in the same ecoregion of holotype locality of *An. darlingi paulistensis*, and CAF includes the holotype locality of *An. darlingi*. Considering that results of analyses did not allow distinction between *An. darlingi* (from CAF) and *An. darlingi* (from IAF), Causey et al. (1942) were likely correct when they transferred *An. darlingi paulistensis* to synonymy of *An. darlingi*.

Ecoregions may represent barriers that limit dispersion and thus have some influence on population structuring of *An. darlingi*. It is plausible to speculate that the importance of ecoregions in determining differences in wing geometry may be mainly because ecological and environmental determinants are distinct among each region. Consequently, there are differences in micro-climate, environmental determinants, vegetation structure and availability of larval habitat that may cause impediments for gene flow among populations from distinct ecoregions. Finally, results of the present study also confirm the usefulness of wing geometry to verify macro-scale population structure in *An. darlingi*.

Acknowledgements

This investigation has financial support from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (Grant 05/50903-0 to MAMS), and CNPq (BPP300300/2008-9 to MAMS). MTM is a doctorate recipient of a FAPESP scholarship (FAPESP no. 2007/07573-5). We are in debt to two anonymous reviewers for comments and suggestions that contributed to improving the previous version of the manuscript; Gabriel Zorelo Laporta for constructing the map used in Figure 1; Albert Leyva for English editing.

References

- Arbour, J.H., Hardie, D.C., Hutchings, J.A., 2011. Morphometric and genetic analyses of two sympatric morphs of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) in the Canadian High Arctic. *Can. J. Zool.* 89, 19-30.
- Arruda, M., Carvalho, M.B., Nussenzweig, R.S., Mararic, M., Ferreira, A.W., Cockhrane, A.H., 1986. Potential vectors of malaria and their different susceptibility to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in northern Brazil identified by immunoassay. *Am. J. Trop. Hyg.* 35, 873-881.
- Ayala, D., Caro-Riaño, H., Dujardin, J.P., Rahola, N., Simard, F., Fontenille, D., 2011. Chromosomal and environmental determinants of morphometric variation in natural populations of the malaria vector *Anopheles funestus* in Cameroon. *Inf. Gen. Evol.* 11, 940-947.
- Bookstein, F.L., 1991. Morphometrics tools for landmark data: Geometry and Biology. Cambridge University Press, New York.
- Bouyer, J., Ravel, S., Dujardin, J.P., Meeus, T., Vial, L., Thévenon, S., Guerrini, L., Sidibé, I., Solano, P. 2007. Population structuring of *Glossina palpalis gambiensis* (Diptera: Glossinidae) according to landscape fragmentation in the Mouhoun river, Burkina Faso. *J. Med. Entomol.* 44, 788-795.
- Broide, J.S., Dujardin, J.P., Kitron, U., Gurtler, R.E., 2004. Spatial structuring of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) populations from northwestern Argentina using wing geometric morphometry. *J. Med. Entomol.* 41, 643-649.
- Buralli, G.M., Bergo, E.S., 1988. Maintenance of *Anopheles darlingi* Root, 1926 colony, in the laboratory. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 3, 157-164.
- Calle, D.A., Quiñones, M.L., Erazo, H., Jaramillo, O. 2002. Morphometric discrimination of females of five species of *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus* from Southern and Northwest Colombia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97, 1191-1195.
- Calle, D.A., Quiñones, M.L., Erazo, H., Jaramillo, O. 2008. Discriminación por morfometría geométrica de once especies de *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) presentes en Colombia. *Biomedica* 28, 371-385.

- Causey, O.R., Deane, L.M., Deane, M.P., 1942. Note clarifying the status of *Anopheles albitarsis* and *An. darlingi*. Proc. Entomol. Soc. Washington 44, 122-126.
- Charlwood, J.D., 1996. Biological variation in *Anopheles darlingi* Root. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 84, 501-514.
- Cheviron, Z., Hackett, S., Capparella, A., 2005. Complex evolutionary history of a Neotropical lowland forest bird (*Lepidothrix coronata*) and its implications for historical hypotheses of the origin of Neotropical avian diversity. Mol. Phyl. Evol. 36, 338-357.
- Clemente-Carvalho, R.B., Klaczko, J., Ivan Perez, S., Alves, A.C., Haddad, C.F., Dos Reis, S.F., 2011. Molecular phylogenetic relationships and phenotypic diversity in miniaturized toadlets, genus *Brachycephalus* (Amphibia: Anura: Brachycephalidae). Mol. Phylogenet. Evol. 61, 79-89.
- Conn, J.E., Vineis, J.H., Bollback, J.P., Onyabe, D.Y., Wilkerson, R.C., Povoas, M.M., 2006. Population structure of the malaria vector *Anopheles darlingi* in a malaria-endemic region of eastern Amazonian Brazil. Am. J. Trop. Med. Hyg. 74, 798-806.
- Conn, J., Rosa-Freitas, M., Luz, S., Momen, H., 1999. Molecular population genetics of the primary neotropical malaria vector *Anopheles darlingi* using mtDNA. J. Am. Mosq. Control Assoc. 15, 468-474.
- Corti, M., Aguilera, M., Capanna, E., 1998. Phylogeny and size and shape changes in the skull of the South American rodent *Proechimys*. Acta Zool. Acad. Scien. Hung. 44, 139-150.
- Deane, L.M., Causey, O.R., Deane, M.P., 1948. Notas sobre a distribuição e biologia dos anofelinos das Regiões Nordeste e Amazônica do Brasil. Ver. Serv. Esp. Saude Publ. 2, 793-808.
- Deane, L.M., 1986. Malaria vectors in Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 81, 5-14.
- De la Riva, J., Le Pont, F., Ali, V., Matias, R., Mollinedo, S., Dujardin, J.P., 2011. Wing geometry as a tool for studying the *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) complex. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 96, 1089-1094.

- Desrochers, A. 2010. Morphological response of songbirds to 100 years of landscape change in North America. *Ecology* 91, 1577-1582.
- Dujardin, J.P., 2010. BAC and PAD softwares. Institut de Recherche Pour le Développement, Montpellier. Available from: <http://www.mpl.ird.fr/morphometrics> (April 2010).
- Dujardin, J.P., 2008. Morphometrics applied to medical entomology. *Infect. Genet. Evol.* 8, 875-890.
- Dujardin, J.P., Slice, D., 2007. Geometric morphometrics. Contributions to medical entomology, in: *Encyclopedia of Infectious Diseases. Modern Technologies*, Chap. 25 ed. Tibayrenc. Wiley, 435-447.
- Dujardin, J.P., Beard, B., Rykman, R., 2007. The relevance of wing geometry in entomological surveillance of triatominae. *Inf. Genet. Evol.* 7, 161-167.
- Faran, M.E., Linthicum, K.J., 1981. A handbook of the Amazonian species of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera: Culicidae). *Mosq. Syst.* 13, 1-81.
- Fleming, G., 1986. *Biologia y Ecologia de los Vectores de la Malaria*. OPS. Washington DC.
- Forattini, O.P., 1962. *Entomologia Médica*, first vol. Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Forattini, O.P., 1987. Exophilic behaviour of *Anopheles darlingi* Root in a southern region of Brazil. *Ver. Saúde Pública* 21, 291-304.
- Forattini, O.P., 2002. *Culicidologia Médica*, second vol. EDUSP, São Paulo.
- Freitas-Sibajev, M.G.R., Conn, J., Mitchell, S., Cockburn, A.F., Seawright, J.A., Momen, H. 1995. Mitochondrial DNA and morphological analyses of *Anopheles darlingi* populations from Brazil. *Mosq. Syst.* 27, 79-85.
- Galvão, A.A., Lane, J., Corrêa, R., 1937. Notas sobre os *Nyssorhynchus* de São Paulo V. Sobre os *Nyssorhynchus* do Novo Oriente. *Rev. Biol. Hig.* 8, 37-45.

- Gibert, P., Capy, P., Imasheva, A., Moreteau, B., Morin, J.P., Pétavy, G., David, J.R., 2004. Comparative analysis of morphological traits among *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*: genetic variability, clines and phenotypic plasticity. *Genetica* 120, 165-179.
- Hayes, F., Sewlal, J., 2004. The Amazon River as a dispersal barrier to passerine birds: effects of river width, habitat and taxonomy. *J. Biog.* 31, 1809-1818.
- Henry, A., Thongsripong, P., Fonseca-Gonzalez, I., Jaramillo-Ocampo, N., Dujardin, J.P., 2010. Wing shape of dengue vectors from around the world. *Infect. Gen. Evol.* 10, 207-214.
- Hernandez, M.L., Abrahan, L.B., Dujardin, J.P., Gorla, D.E., Catalu, S.S. 2011. Phenotypic variability and population structure of peridomestic *Triatoma infestans* in rural areas of the arid Chaco (Western Argentina): spatial influence of macro- and microhabitats. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11, 503-513.
- Jirakanjanakit, N., Leemingsawat, S., Dujardin, J.P., 2008. The geometry of the wing of *Aedes (Stegomyia) aegypti* in isofemale lines through successive generations. *Infect. Genet. Evol.* 8, 414-421.
- Jirakanjanakit, N., Leemingsawat, S., Thongrunkiat, S., Apiwathnasorn, C., Singhanityom, S., Bellec, C., Dujardin, J.P., 2007. Influence of larval density or food variation on the geometry of the wing of *Aedes (Stegomyia) aegypti*. *Trop. Med. Int. Health.* 12, 1354-1360.
- Jirakanjanakit, N., Dujardin, J.P., 2005. Discrimination of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) laboratory lines based on wing species. *Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. H.* 36, 858-861.
- Klein, T.A., Lima, J.B.P., 1990. Seasonal distribution and biting patterns of *Anopheles* mosquitoes in Costa Marques, Rondonia, Brazil. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 6, 700-707.
- Klingenberg, C.P., 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Mol. Ecol. Res.* 11, 353-357.
- Kreutzer, R.D., Kitzmiller, J.B., Ferreira, E., 1972. Inversion polymorphism in the salivary gland chromosomes of *Anopheles darlingi* Root. *Mosq. News* 32, 555-565.

- Loaiza, J., Scott, M., Bermingham, E., Rovira, J., Conn, J., 2009. Short report: *Anopheles darlingi* in Panama. Am. J. Trop. Med. Hyg. 81, 23–26.
- Lourenço-de-Oliveira, R., da Gama Guimarães, A.E., Arlé, M., da Silva, T.F., Castro, M.G., Motta, M.A., Deane, L.M., 1989. Anopheline species, some of their habits and relation to malaria in endemic areas of Rondonia State, Amazon region of Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 84, 501-514.
- Malafronte, R.S., Marrelli, M.T., Marinotti, O. 1999. Analysis of ITS2 DNA sequences from Brazilian *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae). J. Med. Entomol. 36, 631-634.
- Manguin, S., Roberts, D.R., Andre, R.G., Regmankova, E., Hakre, S., 1996. Characterization of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) larval habitats in Belize, Central America. J. Med. Entomol. 33, 205-211.
- Manguin, S., Wilkerson, R.C., Conn, J.E., Rubio-Palis, Y., Dannoff-Burg, A.D., Roberts, D.R., 1999. Population structure of the primary malaria vector in South America, *Anopheles darlingi*, using isozyme, random amplified polymorphic DNA, internal transcribed spacer 2, and morphologic markers. Am. Trop. Med. Hyg. 60, 364-376.
- Matias, A., De la Riva, J.X., Torrez, M., Dujardin, J.P., 2001. *Rhodnius robustus* in Bolivia identified by its wings. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 96, 947-950.
- Mirabello, L., Vineis, J.H., Yanoviak, S.P., Scarpassa, V.M., Póvoa, M.M., Padilla, N., Achee, N.L., Conn, J.E. 2008. Microsatellite data suggest significant population structure and differentiation within the malaria vector *Anopheles darlingi* in Central and South America. BMC Ecol. 8, 3.
- Mirabello, L., Conn, J.E., 2006. Molecular population genetics of the malaria vector *Anopheles darlingi* in Central and South America. Heredity 96, 311-321.
- Morais, S.A., Moratore, C., Suesdek, L., Marrelli, M.T., 2010. Genetic-morphometric variation in *Culex quinquefasciatus* from Brazil and La Plata, Argentina. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 105, 672-676.
- Morales-Vargas, E.R., Ya-Umphun, P., Phumala-Morales, N., Komalamisra, N., Dujardin, J.P., 2010. Climate associated size and shape changes in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations from Thailand. Infect. Genet. Evol. 10, 580-585.

- Moreira, C.K., Marrelli, M.T., Lima, S.P., Marinotti, O. 2011. Analysis of salivary gland proteins of the mosquito *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae). J. Med. Entomol. 38, 763-767.
- Page, R.D.M. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. Comp. Applic. Biosc. 12, 357-358.
- Pajot, F.X., Le Pont, F., Molez, J.F., Degallier, N., 1977. Agressivité d'*Anopheles darlingi* Root, 1926 in Guyane Française Cah ORSTOM. Ver. Entomol. Med. Parasitol. 15, 15-22.
- Pedro, P.M., Sallum, M.A.M. 2009. Spatial expansion and population structure of the neotropical malaria vector, *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae). Biol. J. Linn. Soc. 97, 854-866.
- Polak, M., Kroeger, D.E., Cartwright, I.L., Ponce de Leon, C., 2004. Genotype-specific responses of fluctuating asymmetry and of preadult survival to the effects of lead and temperature stress in *Drosophila melanogaster*. Environ. Pollut. 127, 145-155.
- Quiñones, M.L., Suarez, M.F., 1990. Indoor resting heights of some anophelines in Colombia. J. Am. Mosq. Control Assoc. 6, 602-604.
- Rambajan, I., 1984. Reappearance of *Anopheles darlingi* Root and *vivax* malaria in a controlled area of Guyana, South America. Trop. Geogr. Med. 36, 61-66.
- Rohlf, F.J., 2001. TPS software pack. Stony Brook University, New York. Available from: <http://life.bio.sunysb.edu/morph> (April 2010).
- Rohlf, F.J., 1993. Morphometric tools for landmark data. J. Classification. 10, 133-136.
- Rosa-Freitas, M.G., Broomfield, G., Priestman, A., Milligan, P.J., Momen, H., Molyneux, D.H., 1992. Cuticular hydrocarbons, isoenzymes and behavior of three populations of *Anopheles darlingi* from Brazil. J. Amer. Mosq. Control Assoc. 8, 357-366.
- Rozendaal, J.A., 1990. Epidemiology and control of Malaria in Suriname with special reference to *Anopheles darlingi*. Dordrecht: ICG Printing.

- Rubio-Palis, Y., 1995. Observaciones sobre el patron de actividad hematofagica del vector de malaria *Anopheles darlingi* en las poblaciones del sur de Venezuela. Bol. Dir. Mal. San. Amb. 35, 66-70.
- Schachter-Broide, J., Gurtler, R.E., Kitron, U., Dujardin, J.P. 2009. Temporal variations of wing size and shape of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) populations from northwestern Argentina using geometric morphometry. J. Med. Entomol. 46, 994-1000.
- Shipunov, A.B., Bateman, R.M., 2005. Geometric morphometrics as a tool for understanding *Dactylorhiza* (Orchidaceae) diversity in European Russia. Biol. J. Linnean Soc. 85, 1-12.
- Tadei, W.P., Santos, J.M.M., Rabbani, M.G., 1982. Biologia de Anofelinos Amazônicos. V. Polimorfismo cromossômico de *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae). Acta Amazon. 12, 353-369.
- Vidal, P.O., Suesdek, L. 2011. Comparison of wing geometry data and genetic data for assessing the population structure of *Aedes aegypti*. Infect. Genet. Evol. *in press*, <doi:10.1016/j.meegid.2011.11.013>
- Vidal, P.O., Peruzin, M.C., Suesdek, L., 2011. Wing diagnostic for *Culex quinquefasciatus* and *Culex nigripalpus* (Diptera: Culicidae). Rev. Bras. Entomol. 55, 134-137.

CAPÍTULO 4. ESTRUTURAÇÃO DAS POPULAÇÕES DE *An. darlingi* ESTIMADAS PELAS SEQUÊNCIAS DO GENE COI

Recentemente, devido às favoráveis vantagens quanto à sua estrutura (possui múltiplas cópias por célula, íntrons são ausentes) e evolução (genoma haplóide de origem materna, não sofre processo de recombinação gênica, alto grau de polimorfismo), a análise de sequências do DNA mitocondrial tem sido amplamente utilizada em estudos populacionais, taxonômicos e filogenéticos (HARRISON, 1989; AVISE, 1994). O gene citocromo oxidase subunidade I, um dos 13 genes que codificam proteínas, é o mais utilizado entre as três subunidades do gene citocromo do DNA mitocondrial (BEARD et al., 1993).

Sequências do gene COI foi utilizada em estudos de genética de população, identificação de espécies crípticas, filogenia e filogeografia de diversos grupos da família Culicidae (SALLUM et al., 2002; SCARPASSA e CONN, 2006; SCARPASSA et al., 2008; LOAIZA et al., 2010), provando ser uma ferramenta eficiente. Por esses motivos, sequências do gene COI foram selecionadas para determinar se as diferenças genéticas de *An. darlingi* podem indicar a existência de estruturas populacionais entre as amostras coletadas em 30 diferentes localidades do Brasil. O resultado das análises das sequências de COI de PEDRO e SALLUM (2009) com amostras de *An. darlingi* sugeriu divisão populacional das amostras da América do Sul. Com base neste estudo, a seguinte hipótese foi testada: as populações do leste da Mata Atlântica diferem geneticamente daquelas das regiões norte e oeste do Brasil. Foram utilizadas as mesmas amostras de COI de PEDRO e SALLUM (2009) e espécimes adicionais de outras localidades e sequências de COI mais longas (811 pares de base). Abordamos as perguntas: 1) qual é o nível de diferenciação genética entre as populações? 2) a diferenciação genética pode ser explicada por limites geográficos, fenômenos demográficos e (ou) seleção natural? 3) as sequências e amostras adicionais fornecem melhor inferências filogeográficas e demografia

histórica?

4.1. MÉTODOS

4.1.1. *Análise molecular*

4.1.1.1. *Extração do DNA genômico.* Informações como a lista dos espécimes e a origem das amostras que foram caracterizadas molecularmente estão apresentadas na tabela I. O DNA foi extraído de acordo com o protocolo de sal com proteinase K proposto por SAMBROOK et al. (1989).

4.1.1.2. *Amplificação do gene mitocondrial COI.* Para as reações de polimerização em cadeia (PCR) do gene COI foi adotado o protocolo de PALUMBI (1996) e foi conduzida utilizando os iniciadores recomendados por LUNT et al. (1996):

UEA3: 5'-TATAGCATTCCCACGAATAAATAA-3'

UEA10: 5'- TCCAATGCACTAATC TGCCATATTA-3'

Para cada reação de PCR, foi utilizado 1 µl de DNA de cada amostra, com volume final de 25 µl contendo: 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 5 picomoles de cada iniciador, 200 µM each dNTPs, 2.5 U of Taq polymerase (Invitrogen Platinum® Taq DNA Polymerase), e o restante foi completado com água ultrapura até obter os 25 µl. O ciclo de amplificação consistiu de desnaturação a 95° C por 3 minutos, 35 ciclos a 94° C (40 segundos), 56° C (40 segundos) e 72° C (1 minuto cada), seguidos de 10 minutos a 72° C para extensão final. Os produtos do PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1.5% corados com GelRed™ (Biotium Inc., Hayward, USA).

4.1.1.3. *Purificação e quantificação dos produtos de PCR.* Os produtos foram purificados com PEG/NaCl (20% polietileno glicol 8000/2.5 M NaCl). Nesta etapa, o excesso de iniciadores, dNTP e sais presentes no DNA

amplificado foram eliminados. Adicionou-se aos tubos com os produtos amplificados o mesmo volume de solução PEG/NaCl, a mistura foi incubada a 37° C por 15 minutos; em seguida o material foi centrifugado a temperatura ambiente, em 13.200 rpm por 15 minutos na microcentrífuga Eppendorf, modelo 5415R, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado duas vezes por centrifugação a 4° C, em 13.200 rpm com etanol 80%. O etanol residual foi eliminado por evaporação no concentrador a vácuo Eppendorf, modelo 5301. O DNA foi ressuspendido em água ultrapura e em seguida quantificado por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corados com GelRed™ (Biotium Inc., Hayward, USA). Foi utilizado o marcador “Low mass DNA™ Ladder” (Invitrogen, Carlsbad, CA).

4.1.1.4. Sequenciamento. As sequências de COI foram determinadas após a purificação com PEG/NaCl diretamente dos produtos amplificados. As reações de sequenciamento foram conduzidas em ambas as direções utilizando os mesmos iniciadores empregados na PCR e Big Dye Terminator Kit v. 3.1. (PE Applied Biosystems, Warrington, England). Cada reação de sequenciamento teve volume final de 10 µl contendo: 0,5 µl da mistura de enzima-terminadores fluorescentes (Terminator Ready Reaction Mix); 2 µl de tampão de diluição (Sequence dilution-buffer) composto por 5mM MgCl₂, 200 mM Tris-HCl, pH9.0; 3,6 picomoles de cada iniciador e cerca de 10 ng de cada produto amplificado. O ciclo de sequenciamento consistiu em 25 ciclos de desnaturação a 96° C por 15 segundos, anelamento a 50° C por 15 segundos e extensão a 60° C por 4 minutos, finalizando em 4° C por tempo indeterminado.

4.1.1.5. Purificação por cromatografia de gel filtração. Para a purificação pós-sequenciamento foram utilizadas as microcolunas com Sephadex G50® preparadas no laboratório. 1 g de Sephadex G50® foi hidratada com 15 ml de água ultrapura e mantida em repouso por pelo menos 4 horas. 800 µl de resina hidratada foram transferidas para as microcolunas

apoiadas em tubo de 1,5 ml. A água intersticial foi eliminada por centrifugação por 2 minutos a 300 rpm. Em seguida, as reações de seqüenciamento acrescidas de 10µl de água deionizada foram aplicadas ao topo das colunas que foram novamente centrifugadas a 300 rpm por 2 minutos. Os produtos eluídos foram secos em centrífuga a vácuo e armazenados a -20° C sem o abrigo de luz, até serem submetidos à análise em sequenciador automático ABI 3730 (PE Applied Biosystems).

4.1.1.6. *Alinhamento.* As sequências foram editadas utilizando o programa Sequencher® versão 4.9 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, USA) e alinhadas com CLUSTAL X (LARKIN et al., 2007). Para as análises foram excluídas as regiões dos iniciadores.

4.1.2. Análise das sequências

4.1.2.1. *Análise filogenética.* A relação filogenética entre os haplótipos foi estimada com o programa Mr. Bayes versão 3.1 (HUELSENBECK e RONQUIST, 2001; RONQUIST e HUELSENBECK, 2003). Foi utilizado o melhor modelo de substituição de nucleotídeos determinado pelo programa jModelTest (POSADA, 2008), selecionado com base no Critério de Informação Akaike (AIC). O Markoc Chain Monte Carlo (MCMC) foi realizado com 4.000.000 de gerações, salvando uma árvore a cada 100 gerações. *An. albitarsis* s.s. (Genbank DQ076208) foi utilizada como grupo externo.

4.1.2.2. *Estrutura da variação genética.* A análise de variância molecular (AMOVA) foi utilizada para examinar variações entre as populações com o programa Arlequin 3.0 (EXCOFFIER et al., 2005). Adicionalmente a análise espacial da variância molecular (SAMOVA) versão 1.0 (DUPANLOUP et al., 2002) foi utilizada para agrupar os 811 pares de bases de COI na tentativa de obter populações geneticamente e geograficamente homogêneas. Com a abordagem da AMOVA em K grupos para maximizar a variação entre os grupos, a análise SAMOVA gerou estatística F (F_{SC} , F_{ST} , F_{CT}) e as estimativas

foram computadas para $K = 2-16$ com 1.000 etapas de anelamento simulado para cada 100 séries das condições iniciais de partida.

4.1.2.3. Estrutura populacional e demografia histórica. A análise da relação genealógica entre os haplótipos de COI foi estimada com uma rede de parcimônia estatística determinada pelo programa TCS 1.21 (CLEMENT et al., 2000). As homoplasias foram resolvidas utilizando o algoritmo de estimação segundo CRANDALL e TEMPLETON (1993) e UTHICKE e BENZIE (2003). As diversidades haplotípicas e nucleotídicas foram geradas pelo programa DnaSP versão 5.0 (LIBRADO e ROZAS, 2009). A distribuição de diferenças pareadas (mismatch distribution), utilizada para fazer inferências sobre a história demográfica de populações, é a distribuição da frequência do número observado das diferenças nucleotídicas par-a-par. Foi realizada para distinguir entre as formas: multimodal e unimodal. A forma multimodal é assumida por populações em equilíbrio, enquanto a unimodal por populações que passaram por recente processo de expansão demográfica (SLATKIN e HUDSON, 1991; ROGERS e HARPENDING, 1992; ROGERS, 1995). Para rejeitar a hipótese de expansão demográfica, as diferenças estatisticamente significantes entre as distribuições observadas e as simuladas foram avaliadas com a soma do desvio quadrado (“sum of square deviations” – SSD) (ZARZA et al., 2008).

A hipótese de neutralidade foi examinada usando os testes estatísticos D de TAJIMA (1989) e os teste D e F de FU e LI (1993). O teste D de TAJIMA (1989) é baseado na frequência dos sítios polimórficos e a média do número de diferenças dos nucleotídeos. Os testes D e F propostos por FU e LI (1993) são baseados nos dados moleculares dos polimorfismos. Os testes de neutralidade foram realizados para verificar desvios da neutralidade nas populações avaliadas bem como para fazer inferências sobre a história demográfica das mesmas. Os testes foram gerados pelo programa DnaSP, versão 5.0 (LIBRADO e ROZAS, 2009).

Os processos de extração, amplificação e sequenciamento de DNA foram realizadas no Laboratório de Sistemática Molecular do Departamento de Epidemiologia da FSP-USP. As análises das seqüências do gene COI e parte do manuscrito foram desenvolvidas no Griffin Laboratório do Wadsworth Center, Departamento de Saúde do estado de Nova Iorque, Albany, Estados Unidos.

4.2. RESULTADOS

MANUSCRITO 3 – “Molecular genetics populations of *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) from Brazil”

(Manuscrito em elaboração).

Molecular genetics population of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae)
from Brazil

MAYSA T. MOTOKI^{1*}, JAN E. CONN^{2,3}, SARA A. BICKERSMITH²,
EDUARDO S. BERGO⁴, MARIA A. M. SALLUM^{1*}

¹ Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública, Universidade
de São Paulo, Avenida Dr. Arnaldo 715, CEP 01246-904, São Paulo, Brazil

² Wadsworth Center, Griffin Laboratory, New York State Department of
Health, Slingerlands, NY 12159 USA

³ Department of Biomedical Sciences, School of Public Health, State
University of New York-Albany, Empire Plaza, Albany, NY 12201, USA

⁴ Superintendência de Controle de Endemias, Secretaria de Estado da Saúde
de São Paulo, Araraquara, São Paulo, Brazil

*Corresponding author:

Maysa Tiemi Motoki. Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde
Pública, Universidade de São Paulo, Avenida Dr. Arnaldo 715, CEP 01246-904, São
Paulo, Brazil. Telephone and fax number: 55-11-30617926.

Email: maysatm@usp.br

Email: Jan E. Conn <jconn@wadsworth.org>

Sara A. Bickersmith <sab19@health.state.ny.us>

Eduardo Sterlino Bergo <edusteber@uol.com.br>

Maria Anice Mureb Sallum <masallum@usp.br>

Abstract

Genetics and phylogeography of *Anopheles darlingi* were studied in 30 Brazilian localities to test the hypothesis of the southern Atlantic forest as a barrier to gene flow and to analyze population structure. Statistical parsimony network, diversity measures, neutrality tests and mismatch distribution were employed based on 811 base-pairs of partial sequences of the mtDNA cytochrome oxidase subunit I gene (COI) of 214 specimens. All haplotypes differed by less than 14 mutational steps in statistical parsimony network and showed three major COI clusters that suggested a subdivision from Espírito Santo and Rio de Janeiro from the remaining populations. Additionally, the most ancestral haplotype was distributed in several Amazonian populations. The pattern of the mtDNA haplotype diversity, equilibrium tests and mismatch distribution implicate in demographic expansion.

Keywords: *Anopheles darlingi*, population genetics, COI

Introduction

In Brazil, approximately 310.000 malaria cases were registered in 2009 and is almost exclusively (99.6%) restricted to the region of the Amazon Basin (Portal da Saúde 2009). The Amazon Basin is one of the most species rich regions in the world (Aleixo 2004). This region detains rich flora and fauna of organisms, including mosquitoes (Hutchings et al. 2005; 2011). A number of mechanistic hypotheses were proposed to explain the origin of high species diversity, for example, the mountains (Collins & Dubach 2000) and rivers (Hayes & Sewlal 2004) can prevent to gene flow that conduct to allopatric divergence of reciprocally isolated populations.

The primary vector of human malaria parasites in the Amazon Basin, *Anopheles darlingi* Root (Linthicum 1988) is considered the most anthropophilic and endophagic anopheline in the Americas (Deane et al. 1946). It has been found infected with *Plasmodium falciparum*, *P. vivax* and *P. malariae* (Arruda et al. 1986; Tadei et al. 1998). Many studies detected high plasticity in hematophagic activities (Tadei et al. 1998; Voorham 2002) that resulted in an increase of the vector potential, and control strategies should be locally or regionally focused accordingly.

Anopheles darlingi was described in 1926 based on adults, larvae and pupae collected in Caxiribu, near the Porto das Caxias, Itaboraí District, Rio de Janeiro State Brazil (Root 1926). Galvão et al. (1937) examined male genitalia and eggs of specimens collected in Pereira Barreto (former known as Novo Oriente), São Paulo State, Brazil, and, in recognition of differences with *An. darlingi* described these specimens as *An. darlingi* var. *paulistensis*. Subsequently, Causey et al. (1944) considered these to be typical intraspecific morphological variations, and synonymized *An. darlingi* var. *paulistensis* with *An. darlingi*. Manguin et al. (1999) found that populations collected throughout its geographic range showed low interpopulation variation among several morphological characteristics that were analyzed, including diagnostic characters employed by Linthicum (1988).

The distribution of *Anopheles darlingi* is from southern Mexico to southern Brazil (Forattini 1962). Because of its importance as a human malaria vector, geographic populations of *An. darlingi* have been studied fairly intensively. Consequently, several studies using distinct information showed differences in aspects of biology (Lourenço-de-Oliveira et al. 1989), in polytene chromosome

banding pattern (Kreutzer et al. 1972), in mtDNA (Conn et al. 1999) and in rDNA ITS2 sequences (Malafronte et al. 1999). Recent studies revealed subdivision within South America populations, especially from Brazil (Mirabello & Conn 2006; Mirabello et al. 2008), and suggested that the Amazon River Delta and mountains in southeastern Brazil could be a barrier to gene flow (Pedro & Sallum 2009). Based on this work, the aim of the present study was to test the hypothesis that *An. darlingi* populations east of the Atlantic Forest differ genetically from populations from northern and western Brazil, using additional localities and longer mtDNA *COI* sequences compared with Pedro and Sallum (2009). We addressed the following questions: 1) what is the level of genetic differentiation among populations? 2) Can genetic differentiation be explained by geographic boundaries, demographic phenomena and (or) natural selection? 3) Do the additional sequences and samples provide more fine-scaled phylogeographic and historical demographic inferences?

Materials and Methods

Mosquitoes collection

The samples used in this study (Table 1) were obtained from either link-reared offspring (egg, larva, pupa, and adult) of blood fed females collected in the field or larvae and pupae collected in the field and then maintained in the laboratory to obtain adult males and females associated with larval and pupal exuviae. Freshly emerged mosquitoes were quickly anesthetized with ethyl acetate vapors, and either kept separate in minute plastic vials in silica gel or individually frozen at -80°C . At least one adult male or female of each progeny was used to identify the species using the keys in Linthicum (1988). The samples analyzed herein were pooled with the previous data (only samples from Brazil) of Mirabello and Conn (2006); GenBank accession no. DQ298209 to DQ298244. Immature exuviae and male genitalia of the specimens used for DNA extraction were deposited in the FSP-USP entomological collection as vouchers.

Table 1. *Anopheles darlingi* collection information

Site	State	Locality	Coordinates	Sample size
1	Acre	Acrelândia (AC)	-09.68333 -67.11667	11
2	Amazonas	Barcelos (AM)	-01.86667 -62.56667	15
3	Amapá	Macapa (AP)	-00.20000 -50.96667	11
4*	Amapá	Tartarugalzinho (TAR)	01.31667 -50.96667	05
5*	Amapá	Lagoa dos Indios (LI)	-00.03333 -51.18333	04
6*	Amapá	Santo Antonio (ANT)	-00.09083 -51.20833	06
7	Espírito Santo	Sooretama (SA)	-19.03333 -40.00000	03
8	Espírito Santo	Sooretama (SB)	-19.28333 -40.08333	07
9	Goiás	Minaçu (GO)	-13.55000 -48.15000	10
10	Minas Gerais	Frutal (MG)	-20.00000 -49.06667	04
11	Mato Grosso do Sul	Aquidauana (MS)	-19.50000 -55.61667	04
12	Mato Grosso	Sinop (MT)	-11.85000 -55.50000	05
13*	Mato Grosso	Peixoto de Azevedo (PEX)	-10.38333 -54.90000	05
14	Pará	Belterra (PA)	-02.73333 -54.21667	05
15*	Pará	Itaituba (ITB)	-04.25000 -55.98333	04
16*	Pará	Tailândia (TAI)	-02.95000 -48.98333	05
17*	Pará	Belém (BEL)	-01.41667 -49.28333	06
18*	Pará	Invasão Carlos Mariguela (ARA)	-01.61667 -48.60000	05
19*	Pará	Peixe-boi (PEB)	-01.18333 -47.28333	05
20*	Pará	Mojú (MOJ)	-01.86667 -48.75000	05
21*	Pará	Capanema (CAP)	-01.20000 -47.18333	03
22	Paraná	Porto Rico (RA)	-22.83333 -53.35000	04
23	Paraná	Guaira (RB)	-24.26667 -54.28333	11
24	Rio de Janeiro	Juturnaiba (RJ)	-22.61667 -42.28333	20
25	Rondônia	Porto Velho (RO)	-08.75000 -63.90000	08
26*	Roraima	Boa Vista (BV)	02.81667 -60.66667	05
27	São Paulo	Dourado (SA)	-22.07417 -48.44472	13
28	São Paulo	Dourado (SB)	-22.13333 -48.38333	02
29*	São Paulo	Dourado (DOU)	-22.11667 -48.30000	10
30	Tocantins	Lagoa da Confusão (TO)	-10.62194 -49.74028	13

*data are from Genbank (DQ298209 to DQ298244)

DNA extraction and sequencing

DNA from one adult specimens of each progeny or adult obtained of immature stage from the field was extracted using a standard salting-out method (Sambrook et al. 1989). Template DNA was retained dry at -80°C in the Molecular Systematic Laboratory at Public Health Faculty, Sao Paulo University, Brazil (COI fragments were amplified using the primers UEA3 (5'-TATAGCATTCACGAATAAATAA-3') and UEA10 (5'-TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA-3') (Lunt et al. 1996). Each PCR reaction contained 1 µl DNA; 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 5 picomoles of each primer, 200 mM each dNTPs, 2.5 U of *Taq* polymerase (Invitrogen Platinum® *Taq* DNA Polymerase), and the remaining volume of

ultrapure H₂O up to 25 µL. PCR amplification protocol consisted of a 3-min denaturation at 95 °C and 35 cycles at 94°C (40 sec), 56°C (40 sec) and 72°C (1 min), followed by a 10-min extension at 72°C. PCR amplicons were electrophoresed in 1.5% TAE agarose gels stained with GelRedTM Nucleic Acid Gel Stain (Biotium Inc., Hayward, USA). All sequencing reactions were carried out in both directions using ABI Big Dye Terminator Kit v.3.1 (PE Applied Biosystems, Warrington, England). Sequencing reactions were purified in Sephadex G50® columns (GE Healthcare), analyzed on an ABI Prism 3130 - Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.), and edited using Sequencher® for Windows version 4.9 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, USA) and automatically aligned in CLUSTAL X (Thompson et al. 1997).

Phylogenetic relatedness

Phylogenetic relationships among the haplotypes were estimated with Mr Bayes version 3.1 (Huelsenbeck & Ronquist 2001; Ronquist & Huelsenbeck 2003) using a Bayesian inference (BI) analysis employing the best-fit model of nucleotide substitution of the COI gene, determined with jModelTest (Posada 2008), and selected based on Akaike Information Criterion (AIC). The setting was simultaneous, independent run of the Markov Chain Monte Carlo (MCMC) for 4 million generations, sampling every 1,000 generations with a ‘burnin’ of 25%. *Anopheles albitarsis s.s.* (Genbank DQ076208) was used as the outgroup.

Structure of genetic variation

Analysis of molecular variance (AMOVA) was used to examine population variations among, within, and between collections using the computer program Arlequin 3.0 (Excoffier et al. 2005). Additionally, a spatial analysis of molecular variance (SAMOVA), version 1.0 (Dupanloup et al. 2002) was used to cluster the 811-bp COI sequence data into genetically and geographically homogeneous populations. SAMOVA generates *F* statistics (F_{SC} , F_{ST} , F_{CT}) using the AMOVA approach, into *K* groups to maximize the between group variation. SAMOVA

estimates were computed for $K = 2-16$ with 1,000 simulated annealing steps from each of 100 sets of initial starting conditions.

Population structure and historical demography

A statistical parsimony network estimated genealogical relationships among COI haplotypes using TCS 1.21 (Clement et al. 2000). Homoplasies were resolved using the algorithm estimation rules in Crandall and Templeton (1993) and Uthicke and Benzie (2003). Haplotype and nucleotide diversities were generated using DnaSP version 5.0 (Librado & Rozas 2009). Genetic differentiation was calculated based on Nei (1973; 1975).

The mismatch distribution (simulated in Arlequin) is a frequency distribution of the observed number of pairwise nucleotide differences, and was performed to distinguish between a smooth unimodal distribution and a multimodal, or ragged distribution (Slatkin and Hudson 1991; Rogers and Harpending 1992; Rogers 1995). Statistically significant differences between observed and simulated distributions were evaluated with the sum of square deviations (SSD) to reject the hypothesis of demographic expansion (Zarza et al. 2008). The hypothesis of strict neutrality was examined using the statistics D (Tajima 1989), D and F (Fu and Li 1993). The Tajima D test (1989) is based on the frequencies of segregating sites and the average of number of nucleotide differences. The D and F tests proposed by Fu and Li (1993) are based on molecular polymorphism data. All neutrality tests were calculated using DnaSP, Version 5.0 (Librado & Rozas 2009).

Results

Phylogenetic relatedness

In total, 214 individuals (Table 1) from 30 locations were obtained. The sequences yielded for unambiguous alignment of 811 coding region sites. Sequences were deposited into GenBank (accession nos. XX-XX). The evolutionary model of nucleotide evolution showed that the model TPM3uf+I+G best fit COI gene. We

inferred a phylogenetic tree using a Bayesian analysis of all unique haplotypes. The Bayesian consensus tree (Figure 1) was estimated with 66 parsimoniously informative sites indicated three clades with varying levels of support. Clade 1 (low branch support 65%) comprised haplotypes from a few individuals of most populations (AC, AP, GO, MG, PA, RO, RR), but the majority haplotypes from Central (MS, MT) and south (PR). Clade 2 (branch support 76%) was formed with all Rio de Janeiro and Espírito Santo haplotypes - Southeast region and most haplotypes from North region (Acre, Amazonas, Amapá and Rondônia). Within Clade 2, there is a subdivision (branch support 90%) of Espírito Santo and Rio de Janeiro haplotypes with remaining haplotypes from North region (branch support 100%). Clade 3 which has the higher support (100%) remain the majority haplotypes from Central (GO and TO), Southeast (MG and SP) and North States (AP and RR) and a few haplotypes from Central (MS and MT) and south (PR).

Structure of genetic variation

Hierarchical AMOVA tests were based on Bayesian tree, parsimony network, geographic distribution and Pedro and Sallum (2009) (Table 2). The highest genetic variation (8.28% ($p = 0.00098$)), was observed in groups based on Pedro and Sallum (2009) indicated of the variance was explained by among-groups variation of *An. darlingi* populations. Low genetic variation among group indicates low level of geographical structuring and high gene flow. SAMOVA analysis was not informative because it was not possible to define geographically homogeneous groups; the genetic data were not correlated with geographical distances.

Figure 1. Genealogical tree based on 95 haplotypes from 811-bp sequenced from 214 specimens of *An. darlingi*. Bayesian inference (BI) tree based on COI dataset. *Anopheles albitarsis* s.s. (DQ076208) was the outgroup.

Table 2. Comparative results of molecular variance analysis (AMOVA), using Φ statistics from haplotype frequencies and genetic divergence among populations of *An. darlingi*.

Based on	Source of variation	Total	Fixation index	P value
Bayesian tree	Within populations	76.69	$\Phi_{SC} = 0.23232$	0.00000*
	Among populations	23.21	$\Phi_{ST} = 0.23313$	0.00000*
	Among groups	0.11	$\Phi_{CT} = 0.00106$	0.81232
Geographic distribution	Within populations	86.88	$\Phi_{SC} = 0.134141$	0.00000*
	Among populations	13.46	$\Phi_{ST} = 0.13122$	0.00000*
	Among groups	-0.34	$\Phi_{CT} = -0.00338$	0.55816
Pedro & Sallum (2009)	Within populations	84.94	$\Phi_{SC} = 0.07392$	0.00000*
	Among populations	6.78	$\Phi_{ST} = 0.15063$	0.00000*
	Among groups	8.28	$\Phi_{CT} = 0.08283$	0.00098*
Parsimony network	Within populations	85.26	$\Phi_{SC} = 0.10348$	0.00000*
	Among populations	9.84	$\Phi_{ST} = 0.14742$	0.00000*
	Among groups	4.90	$\Phi_{CT} = 0.04902$	0.00782*

*statistically significant p value

Population structure and demographic history

Of the ninety five haplotypes identified, 21 (22.1%) were shared and 74 (77.9%) were singletons (Table 3). The most common haplotypes were 12 (n = 19) and 81 (n = 14) both from northern Brazil. Localities in Central Brazil and nearby have the highest haplotype diversities (GO, MG, MS, MT, PEX, ITB). Populations in close geographic proximity have the most quantity of shared haplotypes, however, the clusters formed in either Bayesian tree (Figure 1) and parsimony network (Figure 2) did not differ in relation of geographic distribution. The statistical parsimony network illustrates the mutational relationship among *Anopheles darlingi* haplotypes. All haplotypes differed by less than 14 mutational steps, so they could be connected parsimoniously. Three clusters separated by 13 and 8 mutational steps, suggested substantial haplotype partition (Figures 2, 3). The ancestral haplotype inferred was haplotype 3, which is found in Amazonian locations (Acre, Amazonas and Pará). Espírito Santo and Rio de Janeiro haplotypes formed a cluster 1 but just one haplotype (Espírito Santo haplotype number 19) was separated from it by eight mutational steps and grouped in cluster 2 by six mutational steps. Cluster 2 included the ancestral haplotype, the only one Espírito Santo haplotype and the majority of Acre, Amazonas, Amapá, Rondônia and Roraima haplotypes. The remaining

Table 3. Summary of haplotypes and diversity measures

Site	ID	N	Frequency	<i>h</i> (SD)	π
1	AC	11	1, <u>2</u> , 3 (2),4(2),5,6(4)	0.85455 (0.085)	0.01013
2	AM	15	<u>2</u> , 3 (4), <u>7</u> (5),8(2),9,10,11	0.83810 (0.068)	0.00491
3	AP	11	<u>12</u> (9),13,14	0.34545 (0.172)	0.00265
4*	TAR	05	<u>12</u> , <u>80</u> (4)	0.4 (0.237)	0.00740
5*	LI	04	<u>12</u> (3), 80	0.5 (0.265)	0.00925
6*	ANT	06	12 (6)	0 (N/A)	0 (N/A)
7	ESA	03	<u>16</u> (2), <u>20</u>	0.66667(0.314)	0.00411
8	ESB	07	<u>15</u> (2), <u>16</u> (2),17,18,19,	0.90476 (0.103)	0.00787
9	GO	10	21, <u>22</u> , <u>23</u> ,24,25,26,27,28,29,30	1.00000 (0.045)	0.00786
10	MG	04	31, <u>32</u> ,33,34	1.00000 (0.177)	0.00945
11	MS	04	35,36,37,38	1.00000 (0.177)	0.01356
12	MT	06	45 ,39,40,41,42,43,	1.00000 (0.126)	0.01085
13*	PEX	05	45 , 82 , 83 , 84 , 85	1.00000 (0.126)	0.00789
14	PA	06	<u>3</u> ,44, <u>45</u> (2),46,47	0.9 (0.161)	0.00789
15*	ITB	04	3 , 22 , <u>86</u> ,87	1.00000 (0.177)	0.01028
16*	TAI	05	81 (5)	0 (N/A)	0 (N/A)
17*	BEL	06	81 (5), 91	0.33333 (0.215)	0.00041
18*	ARA	05	81,90(2), <u>91</u> (2),	0.8 (0.164)	0.00123
19*	PEB	05	81 , <u>91</u> (4)	0.4 (0.237)	0.00049
20*	MOJ	05	<u>22</u> , <u>91</u> ,92(2),93	0.9 (0.161)	0.00764
21*	CAP	03	81 (2), <u>91</u>	0.66667 (0.314)	0.00082
22	PRA	04	<u>51</u> (2), 53, <u>32</u>	0.83333 (0.222)	0.00575
23	PRB	11	48(2), <u>49</u> (2),50, <u>51</u> (2),52,54,55, <u>56</u>	0.94545 (0.054)	0.00816
24	RJ	20	<u>15</u> (2), <u>16</u> (1) <u>20</u> (2),57(11),58,59,60,61	0.7 (0.109)	0.00276
25	RO	08	<u>2</u> , <u>4</u> , <u>7</u> (3),62(2),63	0.86714 (0.108)	0.01123
26*	BV	05	86 (3),88,89	0.7 (0.218)	0.00715
27	SPA	13	32 (2), <u>49</u> (1), 56 , 64 (3),65,66(1),67, 68 (2),69	0.93590 (0.051)	0.00923
28	SPB	02	66(1), <u>49</u> (1)	1.00000 (0.5)	0.00493
29*	DOU	10	32 , 49 , <u>53</u> (2), 64 (3), 68 ,94,95	0.91111 (0.077)	0.00893
30	TO	13	23 , 45 (2),70,71,72,73,74,75,76,77,78,79	0.98718 (0.035)	0.00727
all		214		0.977 (0.004)	0.01296

*sequences are from Genbank (DQ298209 to DQ298244); Frequency = haplotype frequency, the number in parentheses indicate the frequency of haplotype at that side; underlined numbers are shared haplotype; bold numbers are the haplotype as the same as those in Genbank (DQ298209 to DQ298244); underlined and bold numbers are shared haplotype with sequences from Genbank (DQ298209 to DQ298244); *h* = haplotype diversity; SD = standard deviation; π = nucleotide diversity.

haplotypes comprised a large cluster 3 with populations from all regions except Amazonas, Rio de Janeiro and Espírito Santo. Interestingly, populations from Espírito Santo and Rio de Janeiro shared haplotypes within their populations, but did not share with close localities (São Paulo and Minas Gerais) in Southeast region.

Nei's G_{ST} and N_M were used to examine the pairwise genetic differentiation and gene flow respectively, among the population clusters based on Pedro & Sallum (2009) (Table 4). The highest level of genetic differentiation ($G_{ST}=0.21763$) was detected between Amapá and Southeast (Espírito Santo and Rio de Janeiro States). Only the estimative of gene flow (N_M) between Amapá and Southeast regions

(Espírito Santo and Rio de Janeiro) was below 1. The estimates of gene flow (N_M) were moderate among the remaining populations.

Table 4. Pairwise differentiation (G_{ST} , below the diagonal), and gene flow between population clusters (N_m , above diagonal) based on Pedro and Sallum (2009)

	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	Cluster 4
Cluster 1	*	1.92	4.69	5.22
Cluster 2	0.11532	*	1.57	0.9
Cluster 3	0.13756	0.01674	*	5.22
Cluster 4	0.04573	0.21763	0.04569	*

The Pedro and Sallum (2009) clusters are follows: Cluster 1 includes AC, AM, RO, PA, RR, TO; Cluster 2 includes: AP; Cluster 3 includes: GO, MG, MS, MT, PR, SP; Cluster 4 includes: ES and RJ.

Tajima's (1989) D_T and Fu and Li's (1993) D and F neutrality tests showed for almost data set had negative and significant D and F values, except for clusters 2 and 4, respectively (Table 5) the results allow the rejection of either strict neutrality or population size stability. Cluster 2 is also rejecting the neutral model; where the D_T , D and F were all positive, (just D_T was not significant) indicate possible balancing selection or population subdivision. In contrast, the negative values in clusters 1, 3 and 4 suggest an excess of rare polymorphism consistent with either positive selection or an increase in population size (Akey et al. 2004). The mismatch distribution model for sudden expansion was based on Pedro and Sallum (2009) revealed unimodal distribution for all four clusters (Table 6) indicate population expansion.

The numbers correspond to the haplotypes observed for the 30 sites. The numbers underlined are shared haplotypes; numbers in bold are haplotypes as the same as those in Genbank accession number DQ298209 to DQ298244; numbers underlined and bold are shared haplotype as the same as those in Genbank accession number DQ298209 to DQ298244

Figure 2. Parsimony-based haplotype network of 95 haplotypes from 811-bp of the COI gene sequenced from 214 specimens of *An. darlingi*

Figure 3. Distribution of collection localities of *An. darlingi*. Map of Brazil indicating the location of the 30 collection localities.

Table 5. Summary statistics for polymorphism and neutrality tests of *Anopheles darlingi*

Based on	Clusters	H/n	h (SD)	π (SD)	D_T	F^*	D^*
Pedro & Sallum (2009)	Cluster 1	35/90	0.949(0.011)	0.01085	-1.02332	-2.71883*	-3.11991*
	Cluster 2	04/26	0.443(0.104)	0.00665	1.29194	1.70714*	1.53383**
	Cluster 3	45/68	0.978(0.008)	0.00927	-1.66602	-2.87903*	-2.87613*
	Cluster 4	11/30	0.830(0.052)	0.00459	-0.77775	-1.34392	-1.31399
	total	95/214	0.977(0.004)	0.01296	-1.43018	-3.44272**	-4.18036**

H = unique haplotype, n = individuals samples; h = haplotype diversity; SD = standard deviation; π = nucleotide diversity

D_T = Tajima's D test; F^* = F of Fu and Li's testes; D^* = D of Fu and Li's tests

*p < 0.05; **p < 0.02

Table 6. Pairwise mismatch distribution of *Anopheles darlingi*

Based on	Cluster	SSD (p)	r (p)
Pedro & Sallum et al. (2009)	Cluster 1	0.01482039 (0.28)	0.02300289 (0.08)
	Cluster 2	0.13338671 (0.06)	0.42121657 (0.36)
	Cluster 3	0.00570448 (0.46)	0.00966222 (0.61)
	Cluster 4	0.01299601 (0.51)	0.03386445 (0.61)

Cluster 1 includes AC, AM, RO, PA, RR, TO; Cluster 2 includes: AP; Cluster 3 includes: GO, MG, MS, MT, PR, SP; Cluster 4 includes: ES and RJ.

Discussion

Results of the statistical parsimony network showed three major COI mitochondrial DNA clusters in *An. darlingi* (Figure 2). Cluster one includes populations from Rio de Janeiro and Espírito Santo, strongly supporting the earlier hypothesis of Pedro and Sallum (2009). Fitzpatrick et al (2009) observed a similar pattern between two cryptic species of frogs in northern and southern regions of Atlantic Coastal Forest. Their results indicated that the patterns of haplotype distribution in the states of Rio de Janeiro and Espírito Santo (northern region) have a complex history with potentially multiple northern refugia and subsequent population admixture.

However for *An. darlingi*, the BI analysis only supported this grouping as a subcluster (Figure 1); the whole cluster included samples from the Amazon. Therefore this barrier may be porous. Another possible explanation is that these seemingly geographically restricted haplotypes may be the result of incomplete sampling or a result of climate variation as observed for lineages 1 and 2 of *An. marajoara* (McKeon et al 2010).

In Colômbia, the Andes Mountains were considered to be a partial barrier for *Anopheles marajoara* (Brochero et al. 2010). Nevertheless, geographical barriers such as the Amazon Forest, Atlantic Coastal Forest, mountain ranges and rivers can cause diversification in some species (Fitzpatrick et al. 2009; Pedro & Sallum 2009; Cheviron et al. 2005).

Cluster two, likely including the oldest populations, is restricted to the Amazon region, corroborating an earlier hypothesis of Mirabello and Conn (2006) and Pedro and Sallum (2009). Mitochondrial gene and microsatellite differentiation

was observed in collections from the Amazon River delta, and significant isolation by distance was observed when using microsatellites to compare Amazonian populations of *An. darlingi* (Conn et al. 2006; Mirabello & Conn 2006; Mirabello et al. 2008), suggesting that the Amazon River may have a partial role as a barrier to gene flow. The Amazon River is as a substantial barrier to gene flow for other species including birds (Hayes & Sewlal 2004) and several amphibian species (Cheviron et al. 2005).

Interestingly, cluster three is the most diverse based on geographical distribution of haplotypes. For example, samples AC, AP, PA RO and RR are from the Amazon Forest; GO, MG, MT, MS and TO are from the savannah; and SP and PR are from the Atlantic forest. The detection of shared haplotypes among populations from both sides of a barrier (i.e., different biomes, mountains, rivers) indicates a potentially permeable boundary. A closely related species complex, *Anopheles triannulatus s.l.*, includes a widespread lineage, E, with a very similar distribution to cluster 3 (M. Moreno, personal communication), suggesting environmental climatic changes similarly influenced the distribution of these two species at least for the COI gene (reviewed Loaiza et al. 2011).

The highest level of genetic differentiation ($G_{ST}=0.21763$), and the lowest gene flow ($N_M=0.9$) were detected between northeastern Amazon (Amapá), and southeastern (ES, RJ) haplotypes, several thousand kilometers apart (Table 4). Lack of gene flow combined with high genetic differentiation may be the result of vicariance or an obstruction by natural barriers (i.e., topography or ecoregion that migrating individuals cannot cross) between Amapá and southeast region (ES and RJ). A parallel example of geographic distance was observed in *An. darlingi* populations from Central America and northern Amazon Mirabello and Conn (2006) observed low gene flow between *An. darlingi* populations.

The neutral model was rejected for the total data set for F^* and D^* tests, and for clusters 1 – 3, indicating possible recent population expansion and/or natural selection, except for cluster 4 - Espírito Santo and Rio de Janeiro haplotypes (Table 5). However, the unimodal and statistically insignificant mismatch distribution under the demographic expansion model suggest population expansion for all clusters (Table 6). All of the expansions occurred during the Pleistocene, in common with

early studies of *An. darlingi* in Brazil (Mirabello and Conn 2006) and of *An. albimanus* in Colombia (Gutierrez et al. 2009). These data further support the conclusion of the common driving force of Pleistocene environmental changes in the Neotropics (Loaiza et al. 2011).

The addition of the COI sequences from Genbank (DQ298209 to DQ298244) including those from Amazon region (AP, PA and RR), central (MT) and southeastern (SP) Brazil corroborated our results with those obtained by Pedro and Sallum (2009). There is a barrier in southeastern caused by coastal mountain that prevents gene flow from Espírito Santo and Rio de Janeiro to the remaining Brazilian populations.

In future work it would be interesting to include specimens of *An. darlingi* with less geographical distance from Central and eastern coastal region to assess the observed differences between southeastern Espírito Santo and Rio de Janeiro to the remaining north Amazon forest, Central, which includes area of Cerrado, inner Atlantic Forest and Pantanal and south-west populations from Brazil.

Acknowledgements

This investigation was financially support by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (Grant 05/53973-0), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Técnico e Científico (CNPq BPP 300351/2008-9 to MAMS). MTM is a doctorate recipient of a FAPESP scholarship (FAPESP no. 2007/07573-5); to Naomi McKeon for their great contribution to improvement of the analysis.

References

- Akey JM, Eberle MA, Rieder MJ, Carlson CS, Shriver MD, Nickerson DA, Kruglyak L 2004. Population history and natural selection shape patterns of genetic variation in 132 genes. PLoS Biol 2: 1591-1599.

- Aleixo A 2004. Historical diversification of a *terra-firme* forest bird superspecies: a phylogeographic perspective on the role of different hypotheses of Amazonian diversification. *Evolution* 58: 1303-1317.
- Arruda M, Carvalho MB, Nussenzweig RS, Mararic M, Ferreira AW, Cockhrane AH 1986. Potential vectors of malaria and their different susceptibility to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in northern Brazil identified by immunoassay. *Am J Trop Hyg* 35: 873-881.
- Brochero H, Li C, Wilkerson R, Conn JE, Ruiz-Garcia M 2010. Genetic structure of *Anopheles (Nyssorhynchus) marajoara* (Diptera: Culicidae) in Colômbia. *Am J Med Hyg* 83(3): 585-595.
- Causey OR, Deane LM, Deane MP 1944. Note clarifying the status of *Anopheles albitarsis* and *An. darlingi*. *Proc Entomol Soc Washington* 44: 122-126.
- Cheviron Z, Hackett S, Capparella A 2005. Complex evolutionary history of a Neotropical lowland forest bird (*Lepidothrix coronata*) and its implications for historical hypotheses of the origin of Neotropical avian diversity. *Mol Phylogen Evol* 36: 338–357.
- Clement M, Posada D, Crandall KA 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol Ecol* 9:1657-1659.
- Collins AC, Dubach JM. 2000. Biogeographic and ecological forces responsible for speciation in Ateles. *Int J Primat* 21:421–444.
- Conn J, Rosa-Freitas M, Luz S, Momen H 1999. Molecular population genetics of the primary neotropical malaria vector *Anopheles darlingi* using mtDNA. *J Amer Mosq Control Assoc* 15: 468–474.
- Conn J, Vineis J, Bollback J, Onyabe DY 2006. Population structure of the malaria vector *Anopheles darlingi* in a malaria-endemic region of eastern Amazonian Brazil. *Amer J Trop Med Hyg* 74: 798–806.
- Crandall KA, Templeton AR 1993. Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics* 134: 959-969.

- Deane LM, Causey OR, Deane MP 1946. Studies on Brazilian anophelines from the Northeast and Amazon regions. I. An illustrated key by adult female characteristics for the identification of thirty-five species of Anophelini, with notes on the malaria vectors (Diptera: Culicidae). Am J Hyg Mono Series 18: 1-18.
- Dupanloup I, Schneider S, Excoffier L 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. Mol Ecol 11: 2571-81.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evol Bioinform Online 1: 47-50.
- Fitzpatrick SW, Brasileiro CA, Haddad CFB, Zamudio KR 2009. Geographical variation in genetic structure of Atlantic Coastal Forest frog reveals regional differences in habitat stability. Mol Ecol 1-20.
- Forattini OP 1962. Entomologia Médica Vol 1. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, 662pp.
- Fu YX, Li WH 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. Genetics 133: 693-709.
- Galvão AA, Lane J, Corrêa R 1937. Notas sobre os *Nyssorhynchus* de São Paulo V. Sobre os *Nyssorhynchus* do Novo Oriente. Rev Biol Hig 8: 37-45.
- Gutierrez LA, Naranjo NJ, Cienfuegos AV, Muskus CE, Luckhart S, Conn JE, Correa MM 2009. Population structure analyses and demographic history of the malaria vector *Anopheles albimanus* from the Caribbean and the Pacific regions of Colombia. Malar J 8: 259.
- Hayes FE, Sewlal JAN 2004. The Amazon River as a dispersal barrier to passerine birds: effects of river width, habitat and taxonomy. J Biogeogr 31: 1809-1818.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. Bioinform 17: 754-755.
- Hutchings RSG, Sallum MAM, Ferreira RLM, Hutchings RW 2005. Mosquitoes of the Jau National Park and their potential importance in Brazilian Amazon. Med Vet Entomol 19: 158-199.

- Hutchings RSG, Sallum MAM, Hutchings RW 2011. Mosquito (Diptera: Culicidae) diversity of a forest-fragment mosaic in the Amazon rain forest. *J Med Entomol* 48: 173-187.
- Kreutzer Rd, Kitzmiller JB, Ferreira E 1972. Inversion polymorphism in the salivary gland chromosomes of *Anopheles darlingi* Root. *Mosquito News* 32: 555-565.
- Librado P, Rozas J 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Linthicum KJ 1988. A revision of the *Argyritarsis* Section of the subgenus *Nyssorhynchus* of *Anopheles* (Diptera: Culicidae). *Mosq Syst* 20: 101-271.
- Loaiza JR, Bermingham E, Sanjur OI, Scott ME, Bickersmith AS, Conn JE 2011. Review of genetic diversity in malaria vectors (Culicidae: Anophelinae). *Inf Gen Evol* 12: 1-12.
- Lourenço-de-Oliveira R, da Gama Guimarães AE, Arlé M, da Silva TF, Castro MG, Motta MA, Deane LM 1989. Anopheline species, some of their habits and relation to malaria in endemic áreas of Rondonia State, Amazon region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 84: 501-514.
- Lunt DH, Zhang DX, Szymura JM, Hewlitt GM 1996. The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Mol Biol* 5(3): 153-165.
- Malafronte RS, Marreli MT, Marinotti O 1999. Analysis of ITS2 DNA sequences from Brazilian *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 36(5): 631-634.
- Manguin S, Roberts DR, Andre RG, Regmankova E, Hakre S 1996. Characterization of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) larval habitats in Belize, Central America. *J Med Entomol* 33: 205-211.
- Mckee SN, Lehr MA, Wilkerson RC, Ruiz JF, Sallum MAM, Lima JBP, Póvoa MM, Conn JE 2010. Lineage divergence detected in the malaria vector *Anopheles marajoara* (Diptera: Culicidae) in Amazonian Brazil. *Malar J* 9: 271.
- Mirabello L, Conn JE 2006. Molecular population genetics of the malaria vector

Anopheles darlingi in Central and South America. *Heredity* 96: 311-321.

Mirabello L, Vineis JH, Yanoviak SP, Scarpassa VM, Póvoa MM, Padilla N, Achee NL, Conn JE 2008. Microsatellite data suggest significant population structure and differentiation within the malaria vector *Anopheles darlingi* in Central and South America. *BMC Ecol* 8: 3.

Nei M 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 70: 3321–3323.

Nei M 1975. *Molecular Population Genetics and Evolution*, Vol 40. North Holland Publishing Company: North-Holland.

Pedro PM, Sallum MAM 2009. Geographic impediments to gene flow have moulded the spatial expansion and population structure of the Neotropical malaria vector *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae). *Biol J Linn Soc* 97: 854-866.

Portal da Saúde – Malaria/SVS/MS (2009) www.portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1526 – Access in January/2012.

Posada D 2008. jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol* 25: 1253-1256.

Rogers AR 1995. Genetic evidence for a pleistocene population explosion. *Evolution* 49: 608–615.

Rogers AR, Harpending H 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise differences. *Mol Biol Evol* 9: 552–569.

Ronquist F, Huelsenbeck JP 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformat* 19: 1572-1574.

Root FM 1926. Studies on Brazilian Mosquitoes I. The Anophelines of the *Nyssorhynchus* Group. *Am J Hyg* 6: 684-717.

Sambrook J, Fitch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: a laboratory Manual*. (2ed.). Cold Spring Harbor Press, New York, 1989.

- Slatkin M, Hudson RR 1991. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics* 129: 555–562.
- Tadei WP, Thatcher BD, Santos JM, Scarpassa VM, Rodrigues IB, Rafael MS 1998. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg* 59: 325-335.
- Tajima F 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphisms. *Genetics* 123: 585–595.
- Thompson J, Gibson T, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG 1997. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl Ac Res* 25: 4876 - 4882.
- Uthicke S, Benzie AH 2003. Gene flow and population history in high dispersal marine invertebrates: mitochondrial DNA analysis of *Holothuria nobilis* (Echinodermata: Holothuroidea) populations from the Indo-Pacific. *Mol Ecol* 12: 2635-2648.
- Voorham J 2002. Intra-population plasticity of *Anopheles darlingi* (Diptera, Culicidae) biting activity patterns in the state of Amapá, Brasil. *Rev Saude Publica* 36: 75-80.
- Zarza E, Reynoso VH, Emerson BC 2008. Diversification in the northern neotropics: mitochondrial and nuclear DNA phylogeography of the iguana *Ctenosaura pectinata* and related species. *Mol Ecol* 17:3259-3275.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo caracterizou a variabilidade genética e morfológica de populações de *An. darlingi* de várias localidades do Brasil. Para isso foram empregadas estruturas da morfologia externa de ovos examinados em microscópio eletrônico de varredura, e das asas. Para as análises moleculares, foram empregadas sequências do gene mitocondrial COI.

Dessa maneira, as populações de *An. darlingi* foram caracterizadas através da morfometria de 26 atributos dos ovos de nove populações (AC, AP, ES, PA, PR, RJ, RO, SP, TO) de *An. darlingi* (Capítulo 2). Devido ao tamanho amostral insuficiente para algumas regiões, cada população foi considerada um grupo, pois não seria adequado o agrupamento das mesmas por ecorregiões. Os resultados das análises demonstraram que as amostras representantes de Tocantins e do Pará eram distintas das demais. Foram observadas variações nos atributos analisados dos ovos, porém esta ferramenta não foi informativa para separar as outras sete populações (AC, AP, ES, PR, RJ, RO, SP).

Outro marcador morfológico, a morfometria geométrica da asa permitiu verificar a variabilidade fenotípica de populações de *An. darlingi* coletadas em 10 localidades de cinco ecorregiões do Brasil (Capítulo 3). Inicialmente foi feita análise comparativa da asa de 10 populações, considerando-se cada localidade uma unidade amostral. Foram observadas ligeiras dissimilaridades entre as populações, porém elas não estavam associadas às distâncias geográficas. Nesse sentido, caso exista micro diferenciação da asa entre as populações de *An. darlingi*, o distanciamento físico, possivelmente, não é o fator determinante. Considerando estudos que demonstraram que as variações alares podem estar associadas com a diversidade genética observada entre indivíduos de diferentes ecorregiões na América do Sul (MORAIS et al., 2010) e na África (AYALA et al., 2011), o desenho adotado nas análises foi baseado na combinação de indivíduos de acordo com as ecorregiões brasileiras em que as amostras foram obtidas, Cerrado (CER) – populações de Goiás e Tocantins; costa da Mata Atlântica

(CAF) – populações de Espírito Santo e Rio de Janeiro; interior da Mata Atlântica (IAF) – populações de Paraná e São Paulo; norte do rio Amazonas (NAR) – populações do Amazonas e Amapá; e sul do rio Amazonas (SAR) – populações do Mato Grosso e Pará. Observou-se que as populações da Mata Atlântica (CAF e IAF) são similares entre si e diferenciadas das demais (CER, NAR, SAR). Adicionalmente, CER e NAR são mais parecidas entre si do que das outras populações, e a população SAR é o grupo mais distante.

As análises do fragmento do gene mitocondrial COI apontaram evidências sobre a ocorrência de expansão populacional que ocorreu durante o Pleistoceno (Capítulo 4). As análises de COI foram feitas com base nos haplótipos, e a hipótese testada foi baseada no estudo de Pedro e Sallum (2009). Foi observada baixa estruturação genética e elevado fluxo gênico entre as quinze populações (AC, AM, AP, GO, MG, MS, MT, PA, PR, RO, RR, SP, TO) analisadas de 30 localidades. No entanto, as populações do Espírito Santo e Rio de Janeiro são geneticamente mais próximas, diferenciando-se das demais populações do Brasil. A rede de haplótipos apresentou 3 agrupamentos principais. O agrupamento 1 é formado por representantes do ES e RJ, o agrupamento 2 incluiu populações da Amazônia (AC, AM, AP, RO, RR) e o agrupamento 3, foi o mais diverso baseado na distribuição geográfica dos haplótipos. Este incluiu amostras do AC, AP, PA, RO e RR que pertencem à Floresta Amazônica; GO, MG, MT, MS e TO da região de cerrado; e SP e PR do interior da Mata Atlântica.

Os resultados das análises demonstraram tanto a importância do estudo molecular, bem como do emprego de características morfológicas em estudos sobre a estruturação de populações de *An. darlingi*. O marcador morfológico – morfometria do ovo apesar de não possibilitar a separação das populações de *An. darlingi*, com exceção daquelas de Tocantins e Pará, indicou variações nos atributos analisados, demonstrando que as mesmas podem ser adaptativas, com influência do habitat larvário. Provavelmente, o habitat ocupado pelas formas imaturas de *An. darlingi* não variam ao longo da distribuição geográfica do inseto. Portanto, não foram observadas diferenças significativas nos atributos da morfologia externa dos ovos.

Características da morfologia externa de ovos têm sido empregadas em estudos taxonômicos, para a definição e identificação de complexos de espécies. Como exemplo, vale citar as espécies do complexo Strodei - *An. albertoi*, *An. arthuri* e *An. strodei* que foram definidas pela morfologia externa dos ovos (SALLUM et al., 2010), assim como *An. pristinus* e *An. antunesi* (NAGAKI et al., 2010). Em estudos sobre microevolução, a morfometria dos ovos de 26 atributos do exocório não foi informativa na discriminação das nove populações. Seria importante examinar se outros atributos como, por exemplo, características do endocório, poderiam auxiliar na distinção de populações de *An. darlingi*.

A morfometria geométrica das asas indicou estruturação populacional para *An. darlingi*, demonstrando que os representantes da Mata Atlântica (costa e interior) formam grupo distinto dos demais. As populações do Cerrado e do norte do rio Amazonas e sul do rio Amazonas formaram três agrupamentos morfológicos. Nesse sentido as ecorregiões podem representar barreiras ecológicas que promovem a heterogeneidade do fluxo gênico entre as populações e limitam a dispersão do vetor. Portanto, elas representam algum delimitador ou tem alguma influência na estruturação populacional de *An. darlingi*.

Por outro lado, os resultados das análises das sequências do gene COI evidenciaram a divisão do conjunto gênico de *An. darlingi* e a presença de um agrupamento populacional (costa da Mata Atlântica) que é distinto daqueles encontrados em outras regiões brasileiras. Adicionalmente, a subdivisão entre a maioria das populações da Amazônia e aquela formada por representantes do Cerrado e do interior da Mata Atlântica também foi observada com certa sobreposição das populações da Região Amazônica devido ao alto fluxo gênico. Em trabalhos futuros seria interessante adicionar espécimes de populações de *An. darlingi* geograficamente próximas, ou seja das regiões Central e da costa leste com a finalidade de avaliar as diferenças genéticas observadas entre as populações do Espírito Santo e Rio de Janeiro com as populações da Floresta Amazônica, região Central que inclui região de Cerrado e sudoeste do Brasil

Aparentemente, a pressão seletiva sobre os diferentes marcadores - asa, ovo e sequências de COI - é distinta para *An. darlingi* e, portanto, os resultados das análises realizadas, demonstraram padrões distintos de estruturação para *An. darlingi*. Entretanto, os processos evolutivos dos diferentes marcadores refletem diferenças que indicam que alterações ecológicas (habitats), distâncias geográficas, rio Amazonas, serra costeira (barreiras geográficas), ecorregiões (barreira ecológica) podem dificultar ou impedir o fluxo gênico entre as populações, contribuindo para a variabilidade genética e morfológica do mosquito.

Vale ressaltar, que as diferenças populacionais e o alto fluxo gênico representam aspectos biológicos importantes que devem ser considerados para o planejamento e adoção de medidas de controle do vetor. As diferenças populacionais sugerem que a utilização das metodologias de controle pode ser mais eficiente se forem considerados os diversos perfis das populações do vetor. O alto fluxo gênico indica dispersão dos mosquitos, por este motivo e também pela fácil adaptação da espécie, os métodos de controle devem ser empregados mesmo em localidades onde a população vetora é restrita.

REFERÊNCIAS

- Angêlla AF, Gil LHS, Silva LHP, Ribolla PEM. Population structure of the malaria vector *Anopheles darlingi* in Rondônia, Brazil, based on mtDNA. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102(8):953-958.
- Arruda M, Carvalho MB, Nussenzweig RS, Maracic M, Ferreira AW, Cochrane AH. Potential vectors of malaria and their different susceptibility to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in northern Brazil identified by immunoassay. Amer J Trop Med Hyg. 1986;35:873–881.
- Ayala D, Caro-Riaño H, Dujardin JP, Rahola N, Simard F, Fontenille, D. Chromosomal and environmental determinants of morphometric variation in natural populations of the malaria vector *Anopheles funestus* in Cameroon. Inf Gen Evol. 2011;11:940-947.
- Avise JC. Molecular markers, natural history and evolution. New York: Chapman and Hall; 1994.
- Beard CB, Mills Hamm D, Collins FH. The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae*: DNA sequence, genome organization, and comparisons with mitochondrial sequences of the others insects. Insect Mol Biol. 1993;2:103-124.
- Behura SK. Molecular markers systems in insects: current trends and future avenues. Mol ecol. 2006;15:3087-3113.
- Bookstein FL. Morphometric tools for landmark data: geometry and biology. Cambridge: Cambridge University; 1997.
- Branquinho MS, Lagos CBT, Rocha MR, Natal D, Barata JMS, Cochrane AH, Nardin E, Nusserzweig RS, Kloetzel JK. Anophelines in the State of Acre, Brazil, infected with *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, the variant *P. vivax* VK247 and *P. malariae*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1993;87:391-394.
- Branquinho MS, Araújo MS, Natal D, Marrelli MT, Rocha MR, Taveira FAL,

- Kloetzel JK. *Anopheles oswaldoi* a potential malaria vector in Acre, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1996;90:233.
- Brogdon WG. Measurement of flight tones differentiates among members of *Anopheles gambiae* species complex (Diptera: Culicidae). J Med Entomol 1998;35(5):681-684.
- Calado DC, Foster PG, Bergo ES, Santos CLS, Galardo AKR, Sallum MAM. Resurrection of *Anopheles goeldii* from synonymy with *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae) and a new record for *Anopheles dunhami* in the Brazilian Amazon. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008;103:791-799.
- Calle DA, Quiñones ML, Erazo HF, Jaramillo JO. Morphometric discrimination of females of five species of *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus* from Southern and Northwest Colômbia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97(8):1191-1195.
- Causey OR, Deane LM, Deane MP. Note clarifying the status of *Anopheles albitarsis* and *An. darlingi*. Proc Entomol Soc Washington. 1944;44:122-126.
- Charlwood JD. Biological variation in *Anopheles darlingi* Root. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1996;91:391-398.
- Clary DO, Wolstenholme DR. The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization and genetic code. J Mol Evol 1985;22:252-271.
- Clement M, Posada D, Crandall K. TCS, a computer program to estimate gene genealogies. Mol ecol. 2000;9(10):1657-1660.
- Conn JE, Freitas-Sibajev MGR, Luz SLB, Momen H. Molecular population genetics of the primary malaria vector *Anopheles darlingi* using mtDNA. J Am Mosq Control Assoc. 1999;15:468-474.
- Conn JE, Wilkerson RC, Segura NO, Souza RTL, Schlichting CD, Wirtz RA, Póvoa MM. Emergence of a new Neotropical malaria vector facilitated by

- human migration and changes in land use. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;66(1):18–22.
- Conn JE, Vineis JH, Bollback JP, Onyabe DY, Wilkerson RC, Póvoa MM. Population structure of the malaria vector *Anopheles darlingi* in an endemic region of eastern Amazonian Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;74:798-806.
- Crandall KA, Templeton AR. Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genet.* 1993;134:959-969.
- Deane LM, Causey OR, Deane MP. Notas sobre a distribuição e biologia dos anofelinos das regiões nordestina e amazônica do Brasil. *Rev Serv Esp Saúde Publica.* 1948;4:827-965.
- Deane LM. Malaria vectors in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1986;81:5-14.
- Duarte EC, Gyorkos TW, Pang L, Abrahamowicz M. Epidemiology of malaria in a hypoendemic Brazilian Amazon migrant population: a cohort study. *Am J Trop Med Hyg.* 2004;70:229–237.
- Dujardin JP, Beard CB, Ryckman R. The relevance of wing geometry in entomological surveillance of Triatominae, vectors of Chagas disease. *Inf Genet Evol.* 2007;7:161-167.
- Dujardin JP. BAC and PAD softwares. Institut de Recherche Pour le Développement, Montpellier. <http://www.mpl.ird.fr/morphometrics> (acesso em abril/2010).
- Dupanloup I, Schneider S, Excoffier L. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Mol Ecol.* 2002;11:2571-81.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics.* 1992;131:479-491.
- Faran ME. Mosquito studies (Diptera: Culicidae) XXXIV. A revision of the Albimanus Section of the subgenus *Nyssorhynchus* of *Anopheles*. *Cont*

- Am Entomol Inst. 1980;15:1-215.
- Foley DH, Wilkerson RC, Cooper RD, Volovsek ME, Bryan JH. A molecular phylogeny of *Anopheles annulipenis* (Diptera: Culicidae) sensu lato: The most species-rich anopheline complex. Mol Phyl Evol. 2007;43:283-297.
- Forattini OP. Entomologica médica. São Paulo: Faculdade de Higiene e Saúde Pública, Universidade de São Paulo, Brasil; 1962. v. 1.
- Forattini OP. Culicidologia médica. São Paulo: EDUSP; 2002. v. 2.
- Francoy TM, Prado PRR, Gonçalves LS, Costa LF, Jong D. Morphometric differences in a single wing cell can discriminate *Apis mellifera* racial types. Apidologie. 2006;37:91-97.
- Freitas-Sibajev MG, Conn J, Mitchell SE, Cockburn AF, Seawright JA, Momen H. Mitochondrial DNA and morphological analyses of *Anopheles darlingi* populations from Brazil (Diptera: Culicidae). Mosq Syst. 1995;27:79–99.
- Fu YX, Li WH. Statistical tests of neutrality of mutations. Genetics. 1993;133:693–709.
- Futuyma DJ. Evolution. Sunderland: Sinauer Associates; 2005.
- Galvão AA, Lane J, Corrêa R. Notas sobre os *Nyssorhynchus* de São Paulo V. Sobre os *Nyssorhynchus* do Novo Oriente. Rev Biol and Hig. 1937;8:37-45.
- Galvão ALA, Damasceno R (1944) Observações sobre anofelinos do complexo *Albitarsis* (Diptera, Culicidae). An Fac Med SP. 1944;20:73-87.
- Gonçalves MJF, Alecrim WD. Non planned urbanization as a contributing factor for malaria incidence in Manaus-Amazonas, Brazil. Rev Salud Publica. 2004;6(2): 155-166.
- Gutiérrez LA, Naranjo NJ, Cienfuegos AV, Muskus CE, Luckhart S, Conn JE, Correa MM. Population structure analyses and demographic history of the malaria vector *Anopheles albimanus* Wiedemann (Diptera: Culicidae)

- from the Caribbean and the Pacific regions of Colombia. Malar J. 2009;8,259.
- Harrison RG. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. Trends Ecol Evol. 1989;4: 6-11.
- Hiwat H, Bretas G. Ecology of *Anopheles darlingi* Root with respect to a vector importance: a review. Parasites & Vectors. 2011; 4:177.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. Bioinformatic. 2001;17:754-755.
- Hugh G, Gauch JR. Multivariate analysis in community ecology. New York: Cambridge; 1982.
- Jaramillo NO, Castillo D, Wolff ME. Geometric morphometric differences between *Panstrongylus geniculatus* from field and laboratory. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97(5):667-673.
- Jirakanjanakit N, Leemingsawat S, Thongrungrat S, Apiwathnasorn C, Singhaniyom S, Bellec C, Dujardin JP. Influence of larval density or food variation on the geometry of the wing of *Aedes (Stegomyia) aegypti*. Trop Med Int Health. 2007;12:1354-1360.
- Jirakanjanakit N, Leemingsawat S, Dujardin JP. The geometry of the wing of *Aedes (Stegomyia) aegypti* in isofemale lines through successive generations. Inf Genet Evol. 2008;8:1-8.
- Klein TA, Lima JB, Tang AT. Hybridization evidence supporting separate species status for *Anopheles albitarsis* and *Anopheles deaneorum* (Diptera: Culicidae) in Brazil. J Am Mosq Control Assoc. 1991a;7(2):301-303.
- Klein TA, Lima JB, Tada MS, Miller R. Comparative susceptibility of anopheline mosquitoes in Rondônia, Brazil to infection by *Plasmodium vivax*. Am J Trop Med Hyg. 1991b;45(4):463-470.
- Klingenberg CP.. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. Mol Ecol Res. 2011;11:353-357.

- Kreutzer Rd, Kitzmiller JB, Ferreira E. Inversion polymorphism in the salivary gland chromosomes of *Anopheles darlingi* Root. Mosquito News. 1972;32:555-565.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinf. 2007;23(21):2847-2948.
- Librado P, Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics. 2009; 25: 1451-1452.
- Linley JR. The eggs of *Anopheles atropos* and *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae). Mosq Syst. 1992;24:40-50.
- Linley JR, Kaiser PE, Cockburn AF. A description and morphometric study of the eggs species of the *Anopheles quadrimaculatus* complex (Diptera: Culicidae). Mosq Syst. 1993a;25(2):124-147.
- Linley JR, Lounibos LP, Conn J. A description and morphometric analysis of the eggs of four South American populations of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *aquasalis* (Diptera: Culicidae). Mosq Syst. 1993b;25(3):198-214.
- Linley JR, Lounibos LP. The eggs of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *rangeli* and *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *dunhami* (Diptera: Culicidae). Mosq Syst. 1993; 25(3):157-169.
- Linley JR, Lounibos LP, Conn JE, Duzak D, Nishimura N. A description and morphometric comparison of eggs from eight geographic populations of the South American malaria vector *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *nuneztovari* (Diptera: Culicidae). 1996;12:275-292.
- Linthicum KJ. A revision of the Argyritarsis Section of the subgenus *Nyssorhynchus* of *Anopheles* (Diptera: Culicidae). Mosq Syst. 1988;20(2):101-271.
- Linton YM, Smith L, Koliopoulos G, Voyadjoglou AS, Zounos AK, Harabach

- RE. Morphological and molecular characterization of *Anopheles* (*Anopheles*) *maculipennis* Meigen, type species of the genus and nominotypical member of Maculipennis Complex. Syst Entomol. 2003;28:39-55.
- Loaiza JR, Scott ME, Bermingham E, Rovira J, Conn JE. Evidence for Pleistocene population divergence and expansion of *Anopheles albimanus* in Southern Central America. Am J Trop Med Hyg. 2010;82(1):156-164.
- Lounibos LP, Duzak D, Linley JR. Comparative egg morphology of six species of the Albimanus section of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera: Culicidae). J Med Entomol. 1997;34(2):137-155.
- Lourenço-de-Oliveira R, Guimarães AEG, Arlé M, Silva TF, Castro MG, Motta MA, Deane LM. Anopheline species, some of their habits and relation to malaria in endemic areas of Rondonia state, Amazon region of Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1989;84:501-514.
- Lunt DH, Zhang DX, Szymura JM, Hewlitt GM. The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. Ins Mol Biol. 1996;5(3):153-165.
- Malafronte RS, Marrelli MT, Marinotti O. Analysis of ITS2 DNA sequences from Brazilian *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol. 1999; 36(5):631-634.
- Maldonado V, Finol HJ, Navarro JC. *Anopheles aquasalis* eggs from two Venezuelan localities compared by scanning electron microscopy. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1997;92:487-491.
- Manguin S, Wilkerson RC, Conn JE, Rubio-Palis Y, Dannoff-Burg AD, Roberts DR. Population structure of the primary malaria vector in South America, *Anopheles darlingi*, using isozyme, random amplified polymorphic DNA, internal transcribed spacer 2, and morphologic markers. Am Trop Med Hyg. 1999;60:364-376.

- Manguin S, Carnevale P, Mouchet J, Coosemans M, Julvez J, Richard-Lenoble D, Sircoulon J. Biodiversity of malaria in the world. Montrouge, France. John Libbey Eurotext; 2008.
- Matias A, Riva AJX, Torrez M, Dujardin JP. *Rodnius robustus* in Bolivia identified by wings. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001;96:947-950.
- Mckeon SN, Lehr MA, Kilpatrick CW, Wilkerson RC, Sallum MA, Pereira JB, Póvoa MM, Conn JE. Lineage divergence detected in the malaria vector *Anopheles marajoara* (Diptera: Culicidae) in Amazonian Brazil. Malaria J. 2010;9,271.
- Mirabello L, Conn JE. Molecular population genetics of the malaria vector *Anopheles darlingi* in Central and South America. Heredity. 2006;96:311-321.
- Mirabello L, Conn JE. Population analysis using the nuclear *white* gene detects Pliocene/Pleistocene lineage divergence within *Anopheles nuneztovari* in South America. Med Vet Entomol. 2008;22:109–119.
- Monteiro LR, Reis SF. Princípios de morfometria geométrica. Ribeirão Preto: Holos; 1999.
- Moraes DA. A morfometria geométrica e a “Revolução na morfometria” localizando e visualizando mudanças nas formas dos organismos. Bioletim. 2003;III(3):1-5.
- Morais SA, Moratore C, Suesdek L, Marrelli MT. Genetic-morphometric variation in *Culex quinquefasciatus* from Brazil and La Plata, Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2010;105:672-676.
- Moratore C. Padrões genético-morfológicos em populações de *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) [dissertação de mestrado]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da USP; 2009.
- Moutinho PR, Gil LHS, Cruz RB, Ribolla PEM. Population dynamics, structure and behavior of *Anopheles darlingi* in a rural settlement in the Amazon rainforest of Acre, Brazil. Malaria J. 2011;10:174.

- Nagaki SS, Motta MA, Sallum MAM. Redescription of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *antunesi* Galvão & Amaral and description of a new species of the Myzorhynchella Section (Diptera: Culicidae) from Serra da Mantiqueira, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2010;105:278-285.
- Nagaki SS, Silva AM, Sallum MAM. Redescription of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *lutzii*, and resurrection of *Anopheles guarani* from the synonymy with *An. lutzii* (Diptera: Culicidae). Ann Entomol Soc Am. 2011;104:374-388.
- Ndo C, Antonio-Nkondjio C, Cohuet A, Ayala D, Kengne P, Morlais I, Awono-Ambene PH, Couret D, Ngassam P, Fontenille D, Simard F. Population genetic structure of the malaria vector *Anopheles nili* in sub-Saharan Africa. Malar J. 2010;9,161.
- Oliveira-Ferreira J, Lourenço-de-Oliveira R, Teva A, Deane LM, Daniel-Ribeiro CT. Natural malaria infection in anophelines in Rondônia State, Brazilian Amazon. Amer J Trop Med Hyg. 1990;43:6-10.
- Page RDM. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. Comp. Applic. Biosc. 1996;12:357-358.
- Palumbi SR. Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. In DM Hillis, C. Moritz and BK Mable [eds]. Molecular Systematics., Sunderland, MA: Sinauer; 1996, p.205-247.
- Pedro PM, Sallum MAM. Spatial expansion and population structure of the neotropical malaria vector, *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae). Biol J Linn Soc. 2009;97:854-866.
- Pedro PM, Uezu A, Sallum MAM. Concordant phylogeographies of 2 malaria vectors attest to common spatial and demographic histories. J Heredity. 2010;101(5):618-627.
- Peyton EL, Wilkerson RC, Harbach RE. Comparative analysis of subgenera *Kerteszia* and *Nyssorhynchus* of *Anopheles* (Diptera: Culicidae). Mosq Syst. 1992;24(1):51-69.

- Portal da Saúde – Malaria/SVS/MS (2009) www.portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1526 – Acesso em janeiro/2012.
- Posada D. jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol.* 2008;25:1253-1256.
- Póvoa MM, Conn JE, Schlichting CD, Amaral JC, Segura MN, Silva AN, Santos CC, Lacerda RN, Souza RT, Galiza D, Santa Rosa EP, Wirtz RA. Malaria vectors, epidemiology, and re-emergence of *Anopheles darlingi* in Belém, Pará, Brazil. *J Med Entomol.* 2003;40(4):379-386.
- Póvoa MM, Souza RTL, Lacerda RNL, Rosa ES, Galiza D, Souza, JR, Wirtz RA, Schlichting CD, Conn JE. The importance of *Anopheles albitarsis* E and *Anopheles darlingi* in human malaria transmission in Boa Vista, State of Roraima, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006;101:163-168.
- Prakash A, Sarma DK, Bhattacharyya DR, Mohapatra PK, Bhattacharjee K, Das K, Mahanta J. Spatial distribution and r-DNA second internal transcribed spacer characterization of *Anopheles dirus* Complex species (Diptera: Culicidae) in north-east India. *Acta Trop.* 2010;114,49–54.
- Reigada SMB. Diagnóstico em análise discriminante. [dissertação de mestrado]. São Paulo: Instituto de Matemática e Estatística da USP; 2004.
- Reinert JF. List of species described in the egg stage of tribe Aedini (Diptera: Culicidae) with their literature citations. *J Amer Mosquito Control Assoc* 2005; 21(3):252-262.
- Rocha LS. Caracterização de populações de *Anastrepha sororcula* Zucchi 1979 (Diptera: Tephritidae) por análises cromossômicas, morfométricas e moleculares [tese de doutorado]. São Paulo: Instituto de Biociências da USP; 2005.
- Rohlf FJ. Morphometric tools for landmark data. *J Classification.*

1993;10:133-136.

Rohlf FJ. TPS software pack. Stony Brook University, New York; 2001.
<http://life.bio.sunysb.edu/morph> (Acesso em Abril/2010).

Rogers AR. Genetic evidence for a pleistocene population explosion. *Evolution*. 1995;49:608–615.

Rogers AR, Harpending H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise differences. *Mol Biol Evol*. 1992;9:552–569.

Ronquist F, Huelsenbeck JP. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformat*. 2003;19:1572-1574.

Root FM. Studies on Brazilian Mosquitoes I. The Anophelines of the *Nyssorhynchus* Group . *Am J Hyg*. 1926;6:684-717.

Rosa-Freitas MG, Broomfield G, Priestmann A, Milligan P, Momen H, Molyneux DH. Studies on cuticular components, isoenzymes and behaviour of 3 populations of *Anopheles darlingi* from Brazil. *J Amer Mosq Control Assoc*. 1992;8:357-366.

Rossetti DF, Mann de Toledo P, Góes AM. New geological framework for Western Amazonia (Brazil) and implications for biogeography and evolution. *Quat Res*. 2005;63:78-89.

Rubio-Palis Y, Wirtz RA, Curtis CE. Malaria entomological inoculation rates in western Venezuela. *Acta Trop*. 1992;52:167-174.

Sallum MAM, Schultz TR, Foster PG, Aronstein K, WirtzRA, Wilkerson RC. Phylogeny of Anophelinae (Diptera: Culicidae) based on nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequences. *Syst Entomol*. 2002;27:361-382.

Sallum MAM, Foster P, Santos CLS, Flores DC, Motoki MT, Bergo ES. Ressurrection 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 Entomol*. 2010;47:504-526.

- Sambrook J, Fitsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A laboratory Manual. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Press; 1989.
- Santos JMM, Lobo JA, Tadei WP, Contel EPB. Intrapopulational genetic differentiation in *Anopheles (Nys.) darlingi* Root, 1926 (Diptera: Culicidae) in the Amazon Region. Genet Mol Biol. 1999;22:225-231.
- Saraste M. Structural features of cytochrome oxidase. Quart Rev Biophysics. 1990; 23:331-366.
- Scarpassa VM, Cardoza TB, Junior RPC. Population genetic and phylogeography of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Brazil. Am J Trop Med Hyg. 2008;78:895-903.
- Scarpassa VM, Conn JE. Population genetic structure of the major malaria vector *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) from the Brazilian Amazon, using microsatellite markers. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102(3):319-327.
- Schachter-Broide J, Dujardin JP, Kitron U, Gurtler RE. Spatial structuring of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) population of northwestern Argentina using wing geometric morphometry. J Med Entomol. 2004;41(4): 643-649.
- Service M. Medical entomology for student. 3. ed. Liverpool: School of Tropical Medicine; 2004, 302p
- Shannon R. Methods for collecting and feeding mosquitos in jungle yellow fever studies. Am J Trop Med. 1939;19:131-140.
- Singer B, Castro MC de. Enhancement and suppression of malaria in the Amazon. Am J Trop Med Hyg. 2006;74(1):1-2.
- Slatkin M, Hudson RR. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. Genetics. 1991; 129:555–562.
- Steinwascher K. Egg size variation in *Aedes aegypti*: relationship to body size and other variables. Am Midl Nat. 1984;112:76-84.

- Tadei WP, Pinto RC, Oliveira AEM, Terrazas WCM, Santos JMM, Rodrigues IB, Rafael MS, Lima CP, Lopes NR, Ribeiro JMT. Controle da malária em Manaus: tanques de piscicultura e sua importância na proliferação de *Anopheles darlingi*. Ver Soc Bras Med Trop. 2004;37:261-262.
- Tadei WP, Thatcher BD, Santos JM, Scarpassa VM, Rodrigues IB, Rafael MS. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. Am J Trop Med Hyg. 1998;59:325-335.
- Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphisms. Genetics. 1989;123:585–595.
- Uthicke S, Benzie AH. Gene flow and population history in high dispersal marine invertebrates: mitochondrial DNA analysis of *Holothuria nobilis* (Echinodermata: Holothuroidea) populations from the Indo-Pacific. Mol Ecol. 2003;12:2635-2648.
- Vezenegho SB, Brooke BD, Hunt RH, Coetzee M, Koekemoer LL. Malaria vector composition and insecticide susceptibility status in Guinea Conakry, West Africa. Med Vet Entomol. 2009;23(4):326-34.
- Vidal PO, Peruzin MC, Suesdek L. Wing diagnostic for *Culex quinquefasciatus* and *Culex nigripalpus* (Diptera: Culicidae). Rev Bras Entomol. 2011;55:134-137.
- Vittor A Y, Pan W, Gilman RH, Tielsch J, Glass G, Shields T, Sánchez-Lozano W, Pinedo VV, Salas-Cobos E, Flores S, Patz JA. Linking deforestation to malaria in the Amazon: characterization of the breeding habitat of the principal malaria vector, *Anopheles darlingi*. Am J Trop Med Hyg. 2009;81(1):5–12.
- World Health Organization (2009) www.who.int – Acesso em novembro/2011
- Zarza E, Reynoso VH, Emerson BC. Diversification in the northern neotropics: mitochondrial and nuclear DNA phylogeography of the iguana *Ctenosaura pectinata* and related species. Mol Ecol. 2008;17:3259-3275.

Zhao L, Pridgeon JW, Becnel JJ, Clark GG, Linthicum KJ. Cytochrome c gene and protein expression: developmental regulation, environmental response and pesticide sensitivity in *Aedes aegypti*. J Med Entomol 2008;45:401-408.