**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA**

Estudo taxonômico sobre *Anopheles (Nyssorhynchus)*

***strodei* Root (Diptera: Culicidae)**

Uma abordagem morfológica e molecular

Maria Anice Mureb Sallum

**São Paulo
2010**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA**

Estudo taxonômico sobre *Anopheles (Nyssorhynchus)*

***strodei* Root (Diptera: Culicidae)**

Uma abordagem morfológica e molecular

Maria Anice Mureb Sallum

Tese apresentada para obtenção do título de Livre-Docente, junto à Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, Departamento de Epidemiologia, especialidade Sistemática e Ecologia de Populações de Vetores

**São Paulo
2010**

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.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, TEMÁTICO Processo nº. 2005/53973-0, e Conselho Nacional de Desenvolvimento Técnico e Científico (CNPq BPP 300351/2008-9 Bolsa de Produtividade em Pesquisa, 1D).

Meus sinceros agradecimentos ao colega e amigo Eduardo Sterlino Bergo, Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN), Araraquara, pela participação e contínua colaboração no Projeto Temático, pela escolha dos locais de coleta, obtenção das amostras e incansável suporte em todas as atividades de campo. Sem a colaboração e participação do Eduardo, este projeto não seria possível.

Dra. Cecilia Luisa Simões dos Santos, pela participação do Projeto Temático e pela incansável ajuda para a obtenção das seqüências gênicas.

Professora Dra. Maria Cecilia Salvadori, Instituto de Física, Universidade de São Paulo, por permitir o uso do microscópio eletrônico de varredura Jeol/EO.

Dr. Richard Wilkerson e Judith Stoffer, do Walter Reed Biosystematics Unit, Smithsonian Institution, pelas fotos da genitália masculina do lectótipo de *An. strodei*, o que possibilitou a definição da espécie.

Allan Silva, Secretaria de Estado da Saúde, Paraná; Dr. L. M. Camargo, ICB5 USP, Monte Negro, Rondônia; Beat Baumgartner, Pousada do Sol, Lucélia, São Paulo; V. E. Baumgartner, Fazenda Oroitê, Inúbia Paulista, São Paulo; Dra. Gisela Rita Marques, SUCEN, Taubaté, São Paulo, pelo auxílio que prestaram durante as coletas de campo.

Maysa Tieme Motoki, pela constante e incansável colaboração nas atividades de laboratório. Pela amizade, carisma e alegria, que nunca deixa o cansaço e o desânimo vencerem.

Sandra Sayuri Nagaki, que sempre tão silenciosamente, como uma ninja, está pronta para ajudar no laboratório, mesmo em fins de semana.

Gabriel Zorello Laporta, por estar sempre pronto para ajudar e para discutir métodos de análise filogenética, em especial a Bayesiana.

Tatiani Cristina Marques e Denise Cristina Sant'Ana, que sempre gentilmente, estão prontas para ajudar nas atividades de laboratório.

Gláucia Marconato, pela elaboração das ilustrações à traço das genitálias masculinas das quatro espécies.

Daniel Corugedo Flores, pela colaboração na obtenção das imagens de microscopia eletrônica de varredura dos ovos. Sem as imagens, não teria sido possível desvendar os segredos guardados sob o nome *Anopheles strodei*.

Aos meus queridos irmãos, em especial, Élvia e Roberto, pela confiança, amizade, suporte intelectual, emocional e financeiro que foram fundamentais para a minha vinda e permanência em São Paulo.

À minha filha, Brisa, que com segurança, amor e amizade, nunca me deixou desistir e foi capaz de me mostrar que mesmo em momentos de dúvidas e incertezas somos capazes de seguir em frente.

Aos meus queridos pais, Calil Sallum e Lêda Mureb Sallum, que me ensinaram trabalhar, pensar, estudar, ter disciplina, aceitar desafios, saber conviver com incertezas e medos, não desistir perante dificuldades. Sem o apoio deles eu não seria docente e pesquisadora na Universidade de São Paulo.

Dedicatória

À minha amada filha, Brisa.

Resumo

Sallum MAM. Estudo taxonômico sobre *Anopheles (Nyssorhynchus) strodei* Root (Diptera: Culicidae). Uma abordagem morfológica e molecular. 2010. 140p. Tese de Livre docência. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo.

Anopheles albertoi Unti e *Anopheles arthuri* Unti são retiradas da sinonímia com *Anopheles strodei* Root, e uma forma morfológicamente distinta, adiante designada *Anopheles* CP, do Complexo Strodei de *Anopheles (Nyssorhynchus)* é caracterizada. As genitálias masculinas de *An. arthuri* e *An. albertoi* são descritas e ilustradas pela primeira vez. *Anopheles strodei*, *An. arthuri* e *An. albertoi* foram, inicialmente, separadas com base em imagens dos ovos, obtidas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) e, em seguida, cada tipo de ovo foi associado com caracteres diagnósticos da genitália masculina. A identificação de *Anopheles* CP foi baseada em caracteres morfológicos da genitália masculina, caracterizados e ilustrados no presente trabalho. Os resultados das análises filogenéticas, utilizando dados de seqüências gênicas, foram mais claros sem a inclusão de grupos externos. Neste caso, utilizando tanto os dados do gene nuclear *White*, como do gene *White* combinado com o gene mitocondrial COI, as quatro espécies incluídas no estudo foram, claramente, separadas. Quando *Anopheles quadrimaculatus* Say e *Anopheles stephensi* Liston foram incluídas como grupos externos, os dados combinados dos genes *White* e COI recuperaram o monofiletismo de *An. strodei* e *An. albertoi*, enquanto a posição taxonômica de *An. arthuri* não foi bem resolvida. A única seqüência de *Anopheles* CP apareceu separada dos outros grupos, em todas as análises. A análise Bayesiana dos dados do ITS2 e aquelas realizadas utilizando informações das estruturas secundárias, empregando as estratégias de bootstrap em distância e o “profile neighbor joining”, ambas implementadas no programa ProfDistS, demonstraram o monofiletismo de *An. albertoi*, *An. arthuri* e *Anopheles* CP. *Anopheles strodei* apareceu como espécie polifilética, no entanto, o suporte de bootstrap para o posicionamento do exemplar fora do agrupamento formado por *An. strodei* foi baixo.

Palavras-chave – Microscópio eletrônico de varredura, ovos, gene COI, gene *White*, ITS2, *An. arthuri*, *An. albertoi*, *An. strodei*, espécie nova.

Abstract

Sallum MAM. Taxonomic studies on *Anopheles (Nyssorhynchus) strodei* Root (Diptera: Culicidae). Uma abordagem morfológica e molecular. 2010. 140p. Tese de Livre docência. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo.

Anopheles albertoi Unti and *Anopheles arthuri* Unti are revived from the synonymy with *Anopheles strodei* Root, and a distinct morphological form (herein designated *Anopheles* CP Form) from the Strodei complex of *Anopheles (Nyssorhynchus)* is characterized. The male genitalia of *An. arthuri* and *An. albertoi* are described and illustrated for the first time. *Anopheles strodei*, *An. arthuri* and *An. albertoi* were first distinguished based on scanning electron (SEM) microphotos of the eggs, and then each egg type was associated with diagnostic characters of the male genitalia. Identification of *Anopheles* CP Form was based on morphological characters of the male genitalia, here characterized and illustrated. Molecular phylogenetic analysis was most clear when an outgroup was not included, in which case using the nuclear *white* gene, or the *white* gene in combination with the mitochondrial COI gene, clearly separated these four taxa. When *Anopheles quadrimaculatus* Say and *Anopheles stephensi* Liston were included as outgroups, combined *white* and COI data resolved *An. strodei* and *An. albertoi*, while *An. arthuri* was not well resolved. The single sequence of *Anopheles* CP Form was recovered well separated from other groups in all analyses. Bayesian analysis from the ITS2 sequence data, and those from the secondary structure data, employing ProfDistS distance bootstrap, and ProfDistS profile neighbor joining, recovered the monophyly of *An. albertoi*, *An. arthuri* and *Anopheles* CP Form. *Anopheles strodei* was recovered as a polyphyletic species; however, the placement of one specimen outside the *An. strodei* grouping is poorly supported by bootstrap value.

Key words – scanning electron microscope, eggs, COI gene, *White* gene, ITS2, *An. arthuri*, *An. albertoi*, *An. strodei*, new species.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	15
Mosquitos vetores	20
Impacto na taxonomia de <i>Anopheles</i>	25
Seção Albimanus	27
Complexo Strodei	30
<i>Anopheles</i> (<i>Nyssorhynchus</i>) <i>strodei lato sensu</i>	30
MATERIAL E MÉTODOS	36
Amostras	36
Extração de DNA.....	41
Amplificação de fragmento do DNA ribossômico, incluindo o segundo espaçador interno transcrito do (ITS2).....	42
Amplificação do gene nuclear <i>White</i>	42
Amplificação do gene mitocondrial COI	43
Análise eletroforética dos produtos amplificados	43
Purificação e quantificação dos produtos amplificados para sequenciamento	44
Clonagem de produtos de PCR	44
Reações de sequenciamento de DNA	45
Análise das seqüências.....	46
Seqüências do ITS2	47
DNA Vouchers	49
Análise filogenética	49
RESULTADOS	52
Análise filogenética dos genes <i>White</i> e COI	53
Segundo espaçador interno transcrito (ITS2).....	68
Caracterização das seqüências.....	68
Análises filogenéticas	71
Caracterização morfológica dos ovos	77
Caracterização morfológica da genitália do macho.....	90
DISCUSSÃO	100
Morfologia dos ovos e identificação das espécies.....	101
Genitália masculina e identificação das espécies	105
Análise filogenética	109
REFERÊNCIAS.....	115
ANEXO	130

LEGENDAS

- Figura 1. Topologia gerada na análise filogenética, com enfoque Bayesiano, do gene nuclear de cópia única, *White*, incluindo o íntron situado entre os éxons III e IV. Vinte sítios do íntron foram excluídos das análises porque não foi possível produzir um alinhamento preciso da região. Para as análises, adotou-se esquema de partição de dados pela posição das bases nos códons apresentado na Tabela 3 (esquema A₂), empregando o modelo de evolução de nucleotídeos GTR + G (Tabela 5). Os números sobre os ramos indicam os valores de probabilidade posterior (>70%). Os grupos externos foram excluídos da análise. 57
- Figura 2. Topologia gerada na análise filogenética, com enfoque Bayesiano, da subunidade I do gene citocromo c oxidase (COI) do genoma mitocondrial. Para as análises, foram utilizadas apenas as terceiras posições dos códons e o modelo de evolução GTR + G (Tabela 5). Os números sobre os ramos indicam os valores de probabilidade posterior (>70%). Os grupos externos foram excluídos da análise. ... 59
- Figura 3. Topologia gerada na análise filogenética, com enfoque Bayesiano, do gene nuclear de cópia única, *White*, incluindo o íntron situado entre os éxons III e IV e do gene mitocondrial COI. Vinte sítios do íntron foram excluídos das análises porque não foi possível produzir um alinhamento preciso da região. Para as análises, adotou-se esquema de partição de dados pela posição das bases nos códons apresentado na Tabela 3 (esquema B₃), empregando o modelo de evolução de nucleotídeos HKY + I + G. Os números sobre os ramos indicam os valores de probabilidade posterior (>70%). Os grupos externos foram excluídos da análise. ... 61
- Figura 4. Topologia gerada na análise filogenética, com enfoque Bayesiano, do gene nuclear de cópia única, *White*, incluindo o íntron situado entre os éxons III e IV. Vinte sítios do íntron foram excluídos das análises porque não foi possível produzir um alinhamento preciso da região. Para as análises, adotou-se esquema de partição de dados pela posição das bases nos códons apresentado na Tabela 3 (esquema A₂), empregando o modelo de evolução de nucleotídeos GTR + G (Tabela 5). Os números sobre os ramos indicam os valores de probabilidade posterior (>70%). Os grupos externos foram incluídos na análise. 63
- Figura 5. Topologia gerada na análise filogenética, com enfoque Bayesiano, dos genes nuclear *White* e mitocondrial COI combinados, incluindo o íntron situado entre os éxons III e IV do *White*. Vinte sítios do íntron foram excluídos das análises porque não foi possível produzir um alinhamento preciso da região. Para as análises, adotou-se o esquema de partição de dados pela posição das bases nos códons apresentado na Tabela 3 (esquema B₃), empregando o modelo de evolução de nucleotídeos GTR + G (Tabela 5). Os números sobre os ramos indicam os valores de probabilidade posterior (>70%). Os grupos externos foram incluídos na análise. 65
- Figura 6. Topologia gerada na análise filogenética, com enfoque Bayesiano, do gene mitocondrial COI. Para as análises, foram empregadas somente as terceiras posições dos códons, utilizando o modelo de evolução de nucleotídeos TIM + G (Tabela 5). Os números sobre os ramos indicam os valores de probabilidade posterior (>70%). Os grupos externos foram incluídos na análise. 67
- Figura 7. Topologia gerada na análise, com enfoque Bayesiano, para seqüências de nucleotídeos do segundo espaçador interno transcrito (ITS2) do DNA ribossômico, empregando o modelo de evolução K2P + G, sem grupos externos. 73

- Figura 8. Topologia gerada na análise das estruturas secundárias construídas para seqüências de nucleotídeos do segundo espaçador interno transcrito (ITS2) do DNA ribossômico. A estratégia adotada foi a de bootstrap em distância que está implementada no programa ProfDistS de Wolf et al. (2008). 74
- Figura 9. Topologia gerada na análise das estruturas secundárias construídas para seqüências de nucleotídeos do segundo espaçador interno transcrito (ITS2) do DNA ribossômico. A estratégia adotada foi a “profile neighbor joining” que está implementada no programa ProfDistS de Wolf et al. (2008). 75
- Figura 10. Ovo de *Anopheles (Nyssorhynchus) strodei*. A. Ovo inteiro, extremidade posterior posicionada canto superior direito, vista dorsal. B. Ovo inteiro, extremidade posterior mostrada no canto posterior direito, vista lateral. C. Porção anterior, vista dorsal. D. Porção posterior, vista dorsal. E. Tubérculos do deck, porção central. Escalas, em micras. 78
- Figura 11. Ovo de *Anopheles (Nyssorhynchus) strodei*. A. Córion externo, superfície ventral. B. Córion externo, superfície ventral, mostrando detalhes dos poros nas células coriônicas. C. Flutuadores, vista dorsal. D. Limites dos flutuadores com o plastrão ventral, vista ventrolateral. E. Colar da micrópila. F. Orifício da micrópila. Escalas, em micras. 80
- Figura 12. Ovo de *Anopheles (Nyssorhynchus) albertoi*. A. Ovo inteiro, extremidade anterior no canto superior esquerdo, vista dorsal. B. Ovo inteiro, extremidade anterior no canto superior direito, vista lateral. C. Ovo inteiro, extremidade anterior no canto superior esquerdo, vista ventral. D. Extremidade anterior, vista dorsal. E. Extremidade posterior, vista dorsal. Escalas, em micras. 81
- Figura 13. Ovo de *Anopheles (Nyssorhynchus) albertoi*. A. Área dorsal mediana, mostrando o deck e a franja dorsal. B. Área mediana, mostrando detalhes do deck e da franja, vista dorsal. C. Detalhes do exocório externo, superfície ventral. D. Detalhe da porção mediana do deck e da franja, vista dorsal. E. Micrópila, vista ventrolateral. Escalas, em micras. 82
- Figura 14. Ovo de *Anopheles (Nyssorhynchus) arthuri*. A. Ovo inteiro, extremidade anterior no canto superior esquerdo, vista dorsal. B. Ovo inteiro, extremidade anterior no canto superior direito, vista lateral. C. Porção anterior, vista dorsal. D. Porção posterior, vista dorsal. E. Tubérculos do deck, área central. Escalas, em micras. 84
- Figura 15. Ovo de *Anopheles (Nyssorhynchus) arthuri*. A. Córion externo, superfície ventral. B. Flutuadores, vista dorsal. C. Flutuadores, vista lateral. D. Córion externo, superfície ventral, mostrando detalhes dos poros nas células coriônicas. E. Colar da micrópila. F. Micrópila. Escalas, em micras. 86
- Figura 16. Ovo de *Anopheles (Nyssorhynchus)* forma CP. A. Ovo inteiro, extremidade anterior no canto superior esquerdo, vista dorsal. B. Ovo inteiro, extremidade anterior no canto inferior direito, vista lateral. C. Porção anterior, evidenciando a região anterior do deck, envolvida pela franja, formando uma coroa, vista dorsal. D. Porção posterior, evidenciando a região posterior do deck, envolvida pela franja, formando uma coroa, vista dorsal. E. Flutuadores, vista dorsal. Escalas, em micras. 88
- Figura 17. Ovo de *Anopheles (Nyssorhynchus)* forma CP. A. Região central do deck, evidenciando os tubérculos e as bordas dorsais dos flutuadores, vista dorsal. B.

- Detalhe dos tubérculos da porção anterior do deck, da região envolvida pela coroa, vista dorsolateral. C. Plastrão, mostrando as células coriônicas, vista ventral. D. Detalhe de uma célula coriônica, mostrando detalhes dos poros, superfície ventral. Escalas, em micras..... 89
- Figura 18. Ovo de *Anopheles (Nyssorhynchus)* forma CP. A. Flutuador, vista lateral. B. Plastrão, mostrando detalhe das células coriônicas e da junção do plastrão com o flutuador, vista laterodorsal. C. Plastrão, mostrando as células coriônicas ao redor da micrópila, pólo anterior, vista ventral. D. Micrópila. Escalas, em micras. 90
- Figura 19. Genitália masculina do lectótipo de *Anopheles (Nyssorhynchus) strodei*. A. Gonocoxito e claspete ventral, vista ventral. B. Detalhe do claspete ventral, vista ventral. C. Claspete ventral, vista dorsal. D. Detalhe do lóbulo basal do claspete ventral, vista ventral. E. Detalhe do lóbulo basal do claspete ventral, vista ventral. 92
- Figura 20. Genitália masculina do topótipo de *Anopheles (Nyssorhynchus) strodei*. A. Claspete ventral, vista ventral, mostrando detalhes do lobo apicolateral, lóbulo basal e placa pré-apical. B. Detalhe do claspete ventral em vista dorsal, mostrando o sulco mediano, e as espículas diminutas que se estendem em direção ao ápice na superfície lateral. C. Gonocoxito, vista geral, em aspecto dorsal. Escalas, em milímetros. Espécimes empregados para elaborar os desenhos MG27-108 e MG30-102. 93
- Figura 21. Genitália masculina de *Anopheles (Nyssorhynchus) albertoi*. A. Claspete ventral, vista ventral, mostrando detalhes do lobo apicolateral, lóbulo basal e placa pré-apical. B. Detalhe do claspete ventral em vista dorsal, mostrando o sulco mediano, e as espículas diminutas que se estendem em direção ao ápice na superfície lateral. C. Gonocoxito, vista geral, em aspecto dorsal. Escalas, em milímetros. Espécime empregado para elaborar o desenho MG07(3)4. 95
- Figura 22. Genitália masculina de *Anopheles (Nyssorhynchus) arthuri*. A. Claspete ventral, vista ventral, mostrando detalhes do lobo apicolateral, lóbulo basal e placa pré-apical. B. Detalhe do claspete ventral em vista dorsal, mostrando o sulco mediano. C. Gonocoxito, vista geral, em aspecto dorsal. Escalas, em milímetros. Espécime empregado para elaborar o desenho MG24_1..... 97
- Figura 23. Genitália masculina de *Anopheles (Nyssorhynchus)* Forma CP. A. Claspete ventral, vista ventral, mostrando detalhes do lobo apicolateral, lóbulo basal e placa pré-apical. B. Detalhe do claspete ventral em vista dorsal, mostrando o sulco mediano, e as espículas diminutas que se estendem em direção ao ápice na superfície lateral. C. Gonocoxito, vista geral, em aspecto dorsal. Escalas, em milímetros. Espécime empregado para elaborar o desenho MG15(6)8, coletado em Coronel Pacheco, Estado de Minas Gerais. 99
- Figura 24. Genitália masculina de um exemplar de *An. arthuri*, identificado como *An. strodei*, procedente do Departamento de Beni, Bolívia, evidenciando os lobos apicolaterais do claspete ventral do falósoma. 108
- Figura 25. Estrutura secundária do segundo espaçador interno transcrito (ITS2) de *Anopheles strodei*, espécime MG27_108, de Coronel Pacheco, Minas Gerais, Brasil, construída com o programa MFold (Zuker, 2003), usando os parâmetros padrões, temperatura 37°C, condições iônicas 1M NaCl. $\Delta_{37}^{\circ} = -60,3$. A seta assinala as duas bases pirimidinas, não pareadas, na Hélice II. O símbolo [assinala as seqüências TGGT na Hélice III..... 131

- Figura 26. Estrutura secundária do segundo espaçador interno transcrito (ITS2) de *Anopheles albertoi*, espécime MG07(12)4, de Frutal, Minas Gerais, Brasil, construída com o programa MFold (Zuker, 2003), usando os parâmetros padrões, temperatura 37°C, condições iônicas 1M NaCl. $\Delta^\circ_{37} = -59,8$. As setas $\searrow$ assinalam as duas bases pirimidinas, não pareadas, na Hélice II e as seqüências TGGT na Hélice III. 132
- Figura 27. Estrutura secundária do segundo espaçador interno transcrito (ITS2) de *Anopheles arthuri*, espécime MG07(18)100, de Frutal, Minas Gerais, Brasil, construída com o programa MFold (Zuker, 2003), usando os parâmetros padrões, temperatura 37°C, condições iônicas 1M NaCl. $\Delta^\circ_{37} = -63,5$. A seta assinala as duas bases pirimidinas, não pareadas, na Hélice II. O símbolo [e a seta $\searrow$ assinalam os nucleotídeos TGGT na Hélice III. 133
- Figura 28. Estrutura secundária do segundo espaçador interno transcrito (ITS2) de *Anopheles arthuri*, espécime PR21_110, Paraná, Brasil, construída com o MFold (Zuker, 2003), usando os parâmetros padrões, temperatura 37°C, condições iônicas 1M NaCl. $\Delta^\circ_{37} = -63,5$. A seta $\searrow$ assinala as duas bases pirimidinas, não pareadas, na Hélice II. O símbolo [assinala as seqüências TGGT na Hélice III. 134
- Figura 29. Alinhamento das seqüências do segundo espaçador interno transcrito (ITS2) do DNA ribossômico, mostrando as regiões conservadas, as hipervariáveis, os sítios que apresentaram heterogeneidade intragenômica e aqueles que permitem a identificação das espécies ($\leftarrow$). 135
- Figura 30. Alinhamento das seqüências do segundo espaçador interno transcrito (ITS2) do DNA ribossômico, mostrando as regiões conservadas, as hipervariáveis, os sítios que apresentaram heterogeneidade intragenômica e aqueles que permitem a identificação das espécies ($\leftarrow$ e $\downarrow$). As setas $\nwarrow$ indicam os motivos TGGT da Hélice III, na estrutura secundária. 136
- Figura 31. Alinhamento das seqüências do segundo espaçador interno transcrito (ITS2) do DNA ribossômico, mostrando as regiões conservadas, as hipervariáveis, os sítios que apresentaram heterogeneidade intragenômica e aqueles que permitem a identificação das espécies ($\leftarrow$). 137
- Figura 32. Alinhamento das seqüências do segundo espaçador interno transcrito (ITS2) do DNA ribossômico, mostrando as regiões conservadas, as hipervariáveis, os sítios que apresentaram heterogeneidade intragenômica e aqueles que permitem a identificação das espécies. 138
- Figura 33. Alinhamento das seqüências do segundo espaçador interno transcrito (ITS2) do DNA ribossômico, mostrando as regiões conservadas, as hipervariáveis, os sítios que apresentaram heterogeneidade intragenômica e aqueles que permitem a identificação das espécies. 139

TABELAS

- Tabela 1. Grupos, subgrupos, complexos e espécies da Seção Albimanus de *Anopheles* (*Nyssorhynchus*), de acordo com a classificação proposta por Faran (1980). Foram incluídas as alterações taxonômicas propostas após 1980. 29
- Tabela 2. Espécies e origem dos exemplares empregados para a obtenção de seqüências dos genes nuclear de cópia única, gene *White*, gene COI do genoma mitocondrial e do segundo espaçador interno transcrito (ITS2) do DNA ribossômico, e dos ovos que foram usados para microscopia eletrônica de varredura de quatro espécies do Complexo Strodei de *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera: Culicidae). 37
- Tabela 3. Esquemas de partição de dados, empregados nas análises filogenéticas, do gene nuclear *White* e do mitocondrial COI para quatro espécies do Complexo Strodei de *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera: Culicidae). 52
- Tabela 4. Caracterização do grupo interno formado por 28 exemplares que foram empregados nas análises filogenéticas dos genes *White* do genoma nuclear e COI do genoma mitocondrial para quatro espécies do Complexo Strodei da Seção Albimanus de *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera: Culicidae). 54
- Tabela 5. Seleção dos modelos de evolução para os genes nuclear *White* e mitocondrial COI separadamente, e combinados COI e *White* para quatro espécies do Complexo Strodei da Seção Albimanus de *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera: Culicidae), com os grupos externos, incluídos e excluídos das análises. *Anopheles* (*Cellia*) *stephensi* e *An. (Anopheles) quadrimaculatus* foram empregados como grupos externos (GE). 55
- Tabela 6. Médias das distâncias P não corrigidas entre seqüências de clones que foram gerados de produtos de PCRs de exemplares de *An. (Nys.) arthuri*. As distâncias foram calculadas com o programa PAUP* versão 4.0 para MacOSX. 70

INTRODUÇÃO

A malária humana é considerada um dos maiores problemas de saúde pública no Brasil e no mundo. A incidência anual da malária, no mundo, é estimada em 300 - 500 milhões de casos clínicos, a maioria dos quais ocorre em áreas da África localizadas ao sul do deserto do Saara. A malária causada pelo *Plasmodium falciparum* Welch é responsável pela morte de aproximadamente um milhão de crianças, 90% das quais ocorrem na África tropical (Webb, 2009). No Brasil, a malária é uma das principais doenças parasitárias endêmicas. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a malária é uma doença tropical negligenciada com prevalência elevada no Brasil, estando incluída na categoria 2. As doenças da categoria 2 são aquelas para as quais existem estratégias de controle, mas a enfermidade persiste. Este é o caso da malária, esquistossomose e tuberculose (Lindoso e Lindoso, 2009).

A eliminação da transmissão da malária humana foi objeto de campanha mundial na segunda metade do século XX. Naquela oportunidade foram empregados inseticidas sintéticos, por exemplo, o dieldrin e o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) para o controle dos insetos vetores de plasmódios. O controle estava centrado na eliminação dos mosquitos adultos que pousavam nas paredes das casas (Webb, 2009). Como consequência, logrou-se o controle da transmissão da malária em países desenvolvidos e áreas mais desenvolvidas de países em desenvolvimento. No entanto, em áreas onde as condições de vida eram precárias, a transmissão continuou intensa. Este é o caso da Amazônia brasileira que detém condições ecológicas ideais para a proliferação de espécies de mosquitos vetores (Tauil, 2006). Acresce considerar que durante o desenvolvimento das campanhas de controle, os mosquitos vetores começaram a

desenvolver resistência aos inseticidas empregados, dificultando ainda mais a eliminação dos insetos (Webb, 2009).

No Brasil, graças à intensa migração humana de áreas não endêmicas para os estados da região Amazônica, a incidência anual da malária aumentou muito, com o recorde registrado em 1999, quando foram notificados aproximadamente 630 mil casos clínicos (Silva-Nunes et al., 2006). Desde 1966, o governo federal, juntamente com os estaduais, passou a adotar estratégias mais agressivas para o controle da malária na Amazônia. Dessa maneira, foram realizadas buscas ativas, mensais, de infectados, sintomáticos e assintomáticos, nas comunidades e estes, tratados imediatamente (Macauley, 2005). Conseqüentemente, a incidência anual da malária diminuiu em cerca de 50%, com exceção do estado de Rondônia (Silva-Nunes et al., 2006).

Como foi apontada por Macauley (2005), a estratégia adotada pelo governo brasileiro seria efetiva para o controle da malária se feita em concordância com outros métodos, ou seja: 1) existência de tratamento efetivo; 2) monitoramento do fluxo migratório para a detecção de infectados; 3) colaboração da população. Obviamente, as medidas de controle proporcionaram redução rápida e acentuada da incidência anual da malária. No entanto, o programa, que estava baseado quase exclusivamente na busca e tratamento de infectados, não se sustentou e a incidência voltou a aumentar, com exceção de algumas localidades. Infelizmente, não foram adotadas outras medidas de controle, por exemplo, do vetor, controle do fluxo migratório humano, melhoria da qualidade de vida das populações, entre outras. Tauil (2006) considerou que tanto a abordagem multi-setorial (emprego racional de inseticidas para controle de mosquitos adultos, redução, eliminação ou limpeza de criadouros, aplicação adequada de larvicidas), como a participação da população, são fundamentais para o sucesso de qualquer campanha de controle de doenças transmitidas por vetores, entre elas a

malária. O Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária do governo brasileiro está dividido em nove componentes (Coura et al., 2006). Como é de se esperar, um dos componentes refere-se ao controle seletivo de vetores. Assim, as medidas a serem adotadas, supostamente, deveriam depender das espécies de mosquitos que estão participando do ciclo de transmissão da malária. Nesse sentido, tornam-se necessários estudos entomológicos tanto para o conhecimento da composição de espécies de determinada localidade, como de aspectos ecológicos e biológicos daquelas que têm potencial vetor. Fica, assim, evidente a necessidade de estudos taxonômicos que propiciem conhecimentos para a identificação correta das espécies.

Singer e Castro (2006) comentaram que a transmissão da malária na Amazônia, durante os últimos cem anos, tem sido favorecida pelas alterações no meio ambiente que foram causadas pela atividade humana, como fluxo migratório, aumento das fronteiras agrícolas e agropecuárias, extração de recursos naturais e a intensiva derrubada da mata. Os autores assinalaram o fenômeno denominado “fronteira da malária” que opera em três escalas espaciais, dentro de padrão temporal. Nesse contexto, consideraram aspectos ecológicos do vetor primário na Amazônia que é o *An. darlingi* Root. Dessa maneira, as atividades humanas podem favorecer tanto a instalação de habitat adequados para a proliferação do vetor como a maior exposição do homem às picadas do inseto. Além disso, os autores consideraram que o ciclo bimodal de atividade de picadas, nos crepúsculos vespertino e matutino, está relacionado com a fase de alteração do ambiente. Vittor et al. (2006) examinaram o impacto causado pela destruição da floresta primária na população de *An. darlingi* de uma área situada na Amazônia Peruana. Assim, constatou-se que a taxa de picada por *An. darlingi* era 278 vezes maior em áreas que estavam sendo devastadas e em desenvolvimento associado com a construção de rodovias do que naquelas preservadas. É interessante assinalar que em

contraste com áreas bastante devastadas, como é o caso da região de Dourado, no Estado de São Paulo, onde o *An. darlingi* apresenta pico bimodal de atividade, ou seja, nos crepúsculos vespertino e matutino (Forattini, 1987), na região estudada por Vittor et al. (2006), o inseto apresentou pico unimodal, no período que compreende das 21 às 23 horas. Outra observação importante foi em relação aos habitat das formas imaturas de *An. darlingi*. Os autores coletaram larvas e pupas, predominantemente, em poças grandes e em lagoas para a criação de peixes, com vegetação nas margens. De fato, o vetor era pouco abundante em áreas de floresta quase intocada, evidenciando que as formas imaturas não estavam se criando em locais dentro da mata. De acordo com Singer e Castro (2006), a malária aumenta rapidamente em áreas de assentamento recente. Após seis - oito anos de ocupação, o ambiente tende a se tornar menos variável (em relação ao processo de migração e condições ecológicas) e a incidência da enfermidade é menor, ou seja, a transmissão da malária se torna mais estável e em menor proporção. Com o processo de ocupação do solo e a conseqüente urbanização, as condições ambientais podem se tornar inadequadas ao vetor, *An. darlingi*, no entanto, podem ser favoráveis para outras espécies de anofelinos. Nesse sentido, Vasconcelos et al. (2006) consideram que mesmo havendo redução da umidade relativa do ar em áreas desmatadas da região Amazônica, a disponibilidade de habitat para a criação de imaturos e a elevação da temperatura poderão favorecer a proliferação de espécies de *Anopheles*, que possuem grande capacidade de adaptação ao meio ambiente. Boëte e Paul (2006) apontam a possibilidade de que mudanças, na composição de espécies e de genótipos dentro de populações dos vetores, como resultado de medidas de controle, podem ter forte impacto na dinâmica da transmissão da malária. Nesse sentido, Póvoa et al. (2003), em estudo realizado na cidade de Belém, Pará, observou mudança na composição de espécies de *Anopheles* Meigen, com a reemergência de *An. darlingi* que

foi acompanhada de aumento de casos de malária causada por *P. vivax* Grassi & Feletti e a diminuição daqueles por *P. falciparum*. Acresce considerar o trabalho de Conn et al. (2002) que evidenciou a participação do *An. marajoara* Galvão & Damasceno na dinâmica da transmissão da malária à medida que o bioma da floresta Amazônica foi devastado pelas ações antrópicas, dando lugar a áreas para o desenvolvimento da agropecuária. Nesse sentido, o *An. marajoara* foi recentemente incriminado como vetor primário de plasmódios humanos na região nordeste da Amazônia brasileira, no Amapá (Conn et al., 2002). A importância epidemiológica dessa espécie está aumentando com as alterações antrópicas no ambiente florestal que têm favorecido a formação de locais adequados para o desenvolvimento das formas imaturas, dispersão e manutenção da espécie. *Anopheles marajoara* também foi incriminado como vetor primário em Serra do Navio, Amapá (Póvoa et al., 2001). O *An. marajoara* ocorre desde o sudeste do Estado de São Paulo, Brasil até a Costa Rica, na América Central. Esta espécie é membro de complexo que compreende pelo menos seis táxons isomórficos que podem ser separados tanto pelo padrão RAPD-PCR (Wilkerson et al., 1995a,b) como pelas seqüências de nucleotídeos da região denominada ITS2 do DNA ribossômico (Li et al., 2005). Lehr et al. (2005) usou seqüências completas do gene citocromo c oxidase subunidade I (COI) do genoma mitocondrial para levantar hipótese sobre a existência de uma quinta espécie (*Anopheles albitarsis* E), que seria evolutivamente mais próxima de populações de *An. marajoara* do norte do Brasil e da Venezuela. A importância do *An. albitarsis* E como vetor primário da malária, em Boa Vista, foi discutida por Póvoa et al. (2006). Brochero et al. (2007) levantaram a hipótese da existência de mais uma espécie, no complexo *An. albitarsis*, que ocorre na Colômbia (*An. albitarsis* F). Em resumo, tanto a composição de espécies de *Anopheles* como a heterogeneidade genética dos vetores (Póvoa et al., 2006) dos parasitas e os parâmetros vetoriais (Boëte e Paul,

2006), devem ser adequadamente analisados e avaliados para a elaboração de estratégias de controle da malária.

Mosquitos vetores

Os mosquitos (família Culicidae) representam grupo monofilético com distribuição mundial. A reputação desses insetos como pragas e vetores de agentes infecciosos decorre de uma pequena fração de espécies que apresentam acentuada tendência sinantrópica, entre cerca de 3.500 espécies conhecidas. Por causa da importância médica de Culicidae, a maioria dos estudos taxonômicos foi direcionada aos organismos que representam maior interesse ao ser humano. Dessa maneira, poucas espécies são muito estudadas enquanto a maioria é pouco conhecida tanto em aspectos da biologia e da ecologia como da taxonomia. Nesse sentido, existem espécies que foram descritas de maneira incompleta para as necessidades taxonômicas atuais e outras que permanecem não descritas ou mesmo desconhecidas. Paralelamente, não existe proposta atual de classificação para Culicidae que represente os grupos naturais que poderiam facilitar os estudos daqueles intrinsecamente mais interessantes.

Os mosquitos provavelmente tiveram origem na Região Neotropical durante o início do Cretáceo e a subsequente diversificação desses insetos, similar a das formigas, pode estar ligada a evolução das angiospermas. Adicionalmente, devido à associação próxima de mosquitos com fitotelmatas (coleções hídricas em partes de algumas plantas), os mosquitos servem como indicadores da riqueza de espécies em ecossistemas ameaçados como as florestas tropicais. Algumas espécies de mosquitos são empregadas como modelos de especiação críptica. Dessa maneira, as espécies do gênero *Anopheles*, devido à facilidade para a visualização e preparação dos cromossomos politênicos, tornaram-se modelos para estudos de especiação que envolve características morfológicas dos cromossomos. No entanto, tanto a presença de

complexos de espécies crípticas como os fatores associados ao surgimento dos mesmos são praticamente desconhecidos para Culicidae.

Atualmente são reconhecidas aproximadamente 3.490 espécies de Culicidae (Harbach & Howard, 2007). No entanto, estima-se que esse montante represente apenas um quarto ou, no máximo, metade de todas as espécies de mosquitos presentes na natureza (Belkin, 1962; Zavortink, 1990). A maioria das pesquisas sobre Culicidae envolve os grupos de maior importância médica e veterinária ou as espécies que são consideradas pragas urbanas. Os mosquitos que (1) não são atraídos pelo homem e/ou animais domésticos, (2) raramente ocorrem em elevada densidade porque eles se desenvolvem em habitat representados por coleções hídricas pequenas (fitotelmatas), ou (3) estão restritos aos habitat preservados e distantes da população humana, têm recebido menos atenção e por isso são pouco conhecidos. Paralelamente, muitos estudos taxonômicos envolvendo mosquitos foram direcionados para discriminar espécies e não para estabelecer grupos monofiléticos. São poucos os estudos filogenéticos objetivando estimar as relações evolutivas supra-específicas e entre grupos hierárquicos superiores (Harbach, 2007).

A família Culicidae consiste de duas subfamílias, Anophelinae e Culicinae, e está dividida em 11 tribos – Aedeomyiini, Aedini, Culicini, Culisetini, Ficalbiini, Hodgesiini, Mansoniini, Orthopodomyiini, Sabethini, Toxorhynchitini, e Uranotaeniini (Harbach e Kitching, 1998; Harbach, 2007). A proposta de Edwards (1932) forneceu as bases para construção da classificação de Culicidae (Belkin, 1962; Knight e Stone, 1977) que foi amplamente aceita durante o século passado. Sem considerar a proposta de Reinert et al. (2004, 2006, 2008) para dividir a tribo Aedini em 63 gêneros, poucas mudanças foram feitas em Culicidae desde Edwards (1932). Enquanto o número de

espécies reconhecidas subiu de 1.400 para aproximadamente 3.500, o de subgêneros foi elevado de 89 para 145 e o de gêneros, de 30 para 44 (Harbach, 2007).

Os especialistas em Culicidae contam com catálogos de mosquitos que incorporam a história taxonômica das espécies (Knight e Stone, 1977; Knight, 1978; Ward, 1984, 1992; Guimarães, 1997; <http://www.mosquitocatalog.org>). De acordo com os dados disponíveis nos catálogos, nota-se que foram descritas aproximadamente 5.100 espécies das quais 3.490 são aceitas como válidas (Harbach e Howard, 2007). Vale lembrar o reconhecimento de 550 espécies genéticas que ainda não foram formalmente descritas e nem receberam nome em Latim. É interessante assinalar que o número de espécies descritas, por ano, desde a década de 1960 tem sido praticamente constante. Obviamente, devem existir muitas espécies que ainda não foram reconhecidas. Belkin (1962) e Zavortink (1990) estimaram que apenas 25 a 50% de todos os mosquitos são conhecidos. No entanto, Harbach (2007) sugeriu que possam existir de três a cinco vezes mais espécies se considerarmos a presença de complexos de espécies crípticas. Nesse sentido, com base nas descobertas de espécies de *Anopheles*, usando combinação de taxonomia morfológica, citotaxonomia, comportamento e seqüências de DNA, acredita-se que existam aproximadamente 2.000 espécies novas esperando para serem descobertas.

O gênero *Anopheles* tem recebido mais atenção do que qualquer outro grupo de mosquitos em relação aos aspectos de evolução e classificação (Foley et al., 1998; Krzywinski et al., 2001a, 2001b; Sallum et al., 2000, 2002; Collucci e Sallum, 2003; Harbach e Kitching, 2005). A sistemática de Anophelinae atingiu o apogeu dos estudos morfológicos clássicos na década de 1980 e agora está dominada pelo uso de ferramentas moleculares tanto para a solução de relações evolutivas entre espécies como em níveis hierárquicos superiores. A maioria dos estudos filogenéticos de *Anopheles*

envolve níveis inferiores de classificação, principalmente grupos, subgrupos e complexos de espécies que participam do ciclo de transmissão da malária humana. Dessa maneira, o impacto na classificação interna de Anophelinae tem sido pequeno (Harbach, 2004). Vale assinalar, que os resultados de estudos moleculares corroboraram o monofiletismo de múltiplos grupos definidos por caracteres morfológicos, como é o caso dos subgêneros *Nyssorhynchus* Blanchard e *Kerteszia* Theobald (Sallum et al., 2000, 2002).

A identificação das espécies do subgênero *Nyssorhynchus* é dificultada pela presença de polimorfismos e pela sobreposição dos caracteres morfológicos utilizados para a identificação das espécies. As fêmeas adultas são hematófagas e por isso podem estar envolvidas em ciclo de transmissão de agentes infecciosos aos homens e animais. Por esse motivo, elas são mais comumente coletadas em estudos epidemiológicos da malária. No entanto, as fêmeas são difíceis de serem identificadas e, conseqüentemente, a caracterização das espécies envolvidas na dinâmica da transmissão da malária fica comprometida, bem como os programas de controle. O subgênero *Nyssorhynchus* inclui 34 espécies que estão agrupadas em três seções, quatro séries, oito grupos e dois subgrupos. O Grupo Oswaldoi compreende dezoito espécies, sendo que cinco estão envolvidas na transmissão de plasmódios e pelo menos quatro, *An. aquasalis* Curry, *An. benarrochi* Gabaldón, Cova-Garcia & Lopez, *An. oswaldoi* (Peryassu) e *An. nuneztovari* Gabaldón, pertencem a complexos de espécies crípticas. Apesar de serem morfológicamente semelhantes, os membros de complexos de espécies crípticas são distintos em relação à genética, comportamento e competência vetora.

Marrelli et al. (1999) empregaram seqüências de bases nitrogenadas do ITS2 do DNA ribossômico para revisar o status taxonômico de *An. oswaldoi*. Dessa maneira, os autores sugeriram que *An. oswaldoi* compreende complexo de pelo menos quatro

espécies crípticas, entre elas *An. konderi* Galvão & Damasceno. As duas espécies são morfologicamente semelhantes, mas podem ser separadas pela forma de porção apical do edeago da genitália masculina. *Anopheles konderi* foi recentemente removida da sinonímia de *An. oswaldoi* por Flores-Mendoza et al. (2004). Nenhuma análise de DNA foi incluída na redescrição e, assim, a identidade molecular de *An. konderi* empregando espécimes da localidade-tipo precisa ser concretizada. Em revisão recente, Marrelli et al. (2006) demonstraram que uma das seqüências geradas como sendo de *An. oswaldoi* por Marrelli et al. (1999), provavelmente pertence a um indivíduo de *An. evansae* (Brèthes) que foi erroneamente identificado como *An. oswaldoi*. Diferenças morfológicas e comportamentais também sugerem que *An. benarrochi* seja complexo de espécies crípticas. Esta espécie é zoofílica em Rondônia, Brasil (Klein et al., 1991), mas altamente antropofílica em localidades da Colômbia (Quiñones et al., 2006) e do Perú (Aramburú et al., 1999). Vale assinalar que as seqüências do ITS2 de amostras de *An. oswaldoi* coletadas em Yurimaguas, Perú, são idênticas as de *An. benarrochi* (Ruiz et al., 2005) geradas de indivíduos coletados no sul da Colômbia. Estas seqüências são distintas (15.4 – 16.3%) de outras depositadas no GenBank e identificadas como sendo de *An. benarrochi* de Rondônia, Brasil (AF462383 e AF4623834). Marrelli et al. (2006) observaram a existência de múltiplas seqüências de ITS2 que foram geradas e depositadas no GenBank a partir de indivíduos identificados de maneira, provavelmente, incorreta. Infelizmente, não existem espécimes testemunhas da maioria das seqüências depositada no GenBank. Atualmente, este cuidado é adotado quando autores enviam seqüências para o mencionado banco de dados genéticos. Obviamente, se existissem espécimes testemunhas, seria possível reavaliar se as seqüências foram geradas de indivíduos identificados incorretamente ou se são indicativas da existência de complexos de espécies crípticas.

Impacto na taxonomia de *Anopheles*

Como acontece em outros grupos de animais e de vegetais, os taxonomistas de mosquito estão diminuindo e a substituição dos mesmos, com a absorção de indivíduos jovens pelos institutos de pesquisa e universidades, está desacelerada. Acresce considerar que os conhecimentos taxonômicos de Culicidae, em geral, e de *Anopheles*, em particular, evoluíram mais lentamente desde a publicação de três livros de autoria de Oswaldo Paulo Forattini na década de 1960 e com as revisões de Zavortink (1973), Faran (1980), Linthicum (1988). Dessa maneira, as chaves de identificação de espécies neotropicais que vêm sendo utilizadas são aquelas elaboradas pelos autores das revisões mencionadas.

Existem monografias e revisões para vários grupos de Anophelinae. No entanto, para a Região Neotropical, os estudos estão limitados a alguns gêneros *Chagasia* Cruz (Harbach e Howard, 2009), *Anopheles*, subgênero *Nyssorhynchus* (Seção Albimanus, Faran, 1980; Seção Argyritarsis, Linthicum, 1988), subgênero *Kerteszia* (Zavortink, 1973), grupo de espécies, Seção Myzorhynchella (Galvão e Amaral, 1940; Galvão, 1941; Nagaki, 2009), Complexo *Anopheles strodei* Root (Sallum et al., 2010, no prelo) e Complexo *Anopheles albitarsis* (Motoki et al., 2009), entre outros. Os estudos filogenéticos também são em pequeno número e os resultados são ambíguos tanto em relação ao posicionamento de alguns subgêneros de *Anopheles* como a subdivisão dos subgêneros (Sallum et al., 2000, 2002; Harbach e Kitching, 2005; Collucci e Sallum, 2007).

Apesar desses estudos, existe falta significativa de conhecimentos taxonômicos para a maioria dos grupos de Anophelinae, incluindo os subgêneros neotropicais *Stethomyia* Theobald, *Lophopodomyia* Antunes, *Anopheles*, *Kerteszia* e *Nyssorhynchus*.

Os subgêneros *Stethomyia* e *Lophopodomyia* nunca foram revisados e as espécies não estão claramente definidas e foram pouco amostradas. Acrescem considerar as dificuldades encontradas para a identificação das espécies, especialmente por características de fêmeas, que são ocasionadas pela sobreposição de caracteres, polimorfismos e definição morfológica, muitas vezes, inadequada. As principais espécies de vetores são, em geral, as mais estudadas pela taxonomia convencional. Por que a malária é, sem dúvida, a doença mais importante que tem a participação de insetos, os mosquitos do gênero *Anopheles* são os que mais receberam a atenção dos taxonomistas. Os estudos empregando técnicas de citotaxonomia e de genética molecular propiciaram a descoberta de múltiplos complexos de espécies crípticas em *Anopheles*.

Como foi mencionado anteriormente, o subgênero *Nyssorhynchus* de *Anopheles* inclui 34 espécies que foram descritas e receberam nomes. No entanto, existem múltiplos taxa que ainda não foram descritos e validados. Nesse sentido vale assinalar as espécies do complexo *Anopheles albitarsis* que foram reconhecidas por características genéticas e comportamentais e descritas recentemente, *An. oryzalimnetes* Wilkerson & Motoki, *An. janconnae* Wilkerson & Sallum (Motoki et al., 2009) e a *An. albitarsis* F (Brochero et al., 2007) que ainda não foi validada. Outro complexo que merece destaque é o *An. triannulatus* (Neiva & Pinto) que inclui, até o momento, três taxa, *An. triannulatus* s. s., *An. halophyllus* Nascimento & Lourenço-de-Oliveira e *An. triannulatus* C (Silva-do-Nascimento e Lourenço-de-Oliveira, 2007). Vale assinalar o complexo *An. nuneztovari* que é formado pelos citótipos A, B e C. Empregando seqüências de nucleotídeos do segundo espaçador interno transcrito do DNA ribossômico (ITS2), Sierra et al. (2004) demonstraram que o citótipo C é co-específico com o B. O citótipo A foi reconhecido como sendo *Anopheles goeldii* Rozeboom &

Gabaldón, que foi removida da sinonímia de *An. nuneztovari* por Calado et al. (2008). Obviamente, o encontro de complexos de espécies crípticas pode estar relacionado aos estudos intensivos das espécies de maior importância médica. No entanto, devem existir outros complexos dentro de *Nyssorhynchus* que ainda não foram definidos. É o caso de *An. oswaldoi* que parece ser complexo de pelo menos quatro espécies crípticas (Motoki et al., 2007; Sallum et al., 2008). Outros exemplos de complexos de espécies no subgênero *Nyssorhynchus* são *An. benarrochi* (Ruiz et al., 2005; Sallum et al., 2008), *An. konderi* (Sallum et al., 2008), *An. strodei* (Sallum et al., 2010, no prelo) e *An. lutzii* Cruz (Nagaki 2009). Vale assinalar a presença de complexos de espécies no subgênero *Kerteszia*, por exemplo, aquele formado por *An. cruzii* Dyar & Knab (Malafronte et al., 2007).

Seção Albimanus

A Seção Albimanus (Faran, 1980) de *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) inclui 17 espécies válidas e outras que não foram formalmente validadas. É o caso de espécies do Complexo *An. oswaldoi* (Marrelli et al., 1999; Sallum et al., 2008), *An. benarrochi* (Ruiz et al., 2005; Sallum et al., 2008), *An. triannulatus* (Silva-do-Nascimento e Lourenço-de-Oliveira, 2002, 2007) e *An. nuneztovari* (Mirabello e Conn, 2008; Calado et al., 2008) que possivelmente compreendem complexos de espécies crípticas. Faran (1980) considerou a Seção Albimanus grupo monofilético. No entanto, os resultados de análises filogenéticas empregando tanto dados morfológicos (Sallum et al., 2000; Harbach e Kitching, 2005) como moleculares (Sallum et al., 2002), demonstraram que as Seções Albimanus (Faran, 1980), *Argyritarsis* (Linthicum, 1988) e *Myzorhynchella* (Galvão, 1941) não são grupos naturais.

Faran (1980) subdividiu a Seção Albimanus em dois grupos, Albimanus e Oswaldoi. O primeiro inclui somente a *Anopheles albimanus* Wiedemann. O Grupo Oswaldoi é formado pelos Subgrupos Oswaldoi e Triannulatus, sendo que este inclui duas espécies válidas, *An. triannulatus* e *An. halophylus*, e aquele inclui 14 taxa, subdivididos em dois complexos, o Oswaldoi e o Strodei (Tabela 1).

Tabela 1. Grupos, subgrupos, complexos e espécies da Seção Albimanus de *Anopheles* (*Nyssorhynchus*), de acordo com a classificação proposta por Faran (1980). Foram incluídas as alterações taxonômicas propostas após 1980.

Grupo	Subgrupo	Complexo	Espécie	Localidade- tipo
Albimanus	-	-	<i>An. albimanus</i>	Ins. St. Domingo, República Dominicana
Oswaldoi	Oswaldoi	Oswaldoi	<i>An. oswaldoi</i>	Vale do Rio Doce, Espírito Santo, Brasil
			<i>An. konderi</i>	Coari, Amazonas, Brasil
			<i>An. galvaoi</i>	Rio Branco, Acre, Brasil
			<i>An. evansae</i>	Tucuman, Argentina
			<i>An. aquasalis</i>	Zona do Canal, Panamá
			<i>An. ininii</i>	Mines de Saint-Elie, Inini, Guiana Francesa
			<i>An. anomalophyllus</i>	Wenham's Farm, próximo de Almirante, Panamá
			<i>An. rangeli</i>	Puerto Cabello, Carabobo, Venezuela
			<i>An. trinkae</i>	1.5 km ao sul de Puyo, Pastaza, Equador
			<i>An. nuneztovari</i>	San Carlos, Cojedes, Venezuela
			<i>An. goeldii</i>	Belterra, Pará, Brasil
		Strodei	<i>An. strodei</i>	Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil
			<i>An. rondoni</i>	Ladario, Mato Grosso, Rio Paraguai, Brasil
			<i>An. benarrochi</i>	La Ceiba, Trujillo, Venezuela
	Triannulatus	-	<i>An. triannulatus</i>	Rio Cuiabá, Fazenda São João, Mato Grosso, Brasil
		-	<i>An. halophylus</i>	Salobra, Mato Grosso do Sul, Brasil

Complexo Strodei

O Complexo Strodei inclui três espécies válidas (Tabela 1). A *An. strodei* possui cinco sinônimos, a saber: *An. ramosi* Unti, *An. arthuri* Unti, *An. artigasi* Unti, *An. albertoi* Unti e *An. lloydi* Unti. Infelizmente não existem tipos das espécies descritas por Unti, que foram definidas por caracteres da larva de quarto estágio, a *An. ramosi*, ou dos ovos, *An. arthuri*, *An. artigasi*, *An. albertoi* e *An. lloydi*. Nos parágrafos que se seguem, serão descritos maiores detalhes sobre *An. strodei* e as espécies que foram incluídas na sinonímia da mesma.

Anopheles (Nyssorhynchus) strodei lato sensu

Anopheles (Nyssorhynchus) strodei pertence ao Complexo Strodei do subgrupo Oswaldoi de *Anopheles (Nyssorhynchus)*. O Complexo Strodei inclui *An. strodei*, *Anopheles rondoni* (Neiva and Pinto) e *Anopheles benarrochi*. *Anopheles strodei* foi descrita a partir de espécimes coletados no Estado de Minas Gerais, Brasil; Província de Tucumán, Argentina; Assunção, Paraguai; e Stilson's Lake, Zona do Canal, Panamá. Foram incluídos na descrição original, espécimes coletados em Lassance, Ubá e Oliveira, que são três municípios do Estado de Minas Gerais (Root, 1926). O lectótipo de *An. strodei* foi designado por Stone and Knight (1956) e está depositado na Coleção Entomológica do National Museum of Natural History (NMNH), Smithsonian Institution, em Washington, D. C., E. U. A. Trata-se de um adulto macho com a genitália masculina dissecada e montada entre lâmina e lamínula em bálsamo do Canadá. O adulto foi colado ao ápice de um triângulo que está afixado a um alfinete entomológico. A localidade-tipo de *An. strodei* fica próxima da antiga estação ferroviária de Água Limpa, em Juiz de Fora, Estado de Minas Gerais, sudeste do Brasil.

Root (1926) descreveu *An. strodei* empregando caracteres morfológicos externos do adulto macho, larva de quarto estágio e pupa. No entanto, os ovos de *An. strodei* foram descritos posteriormente, por Galvão e Lane (1936). Para isso, os autores utilizaram ovos de espécimes coletados nos arredores da cidade de São Paulo, Estado de São Paulo, Brasil. Dessa maneira, as características dos ovos descritos por Galvão e Lane (1936) foram empregadas em comparações taxonômicas realizadas por múltiplos autores e também para a definição de espécies morfológicamente semelhantes e variedades de *An. strodei*.

Anopheles strodei foi considerada um complexo de espécies por causa das variações observadas na morfologia externa dos ovos (Galvão, 1940). Nesse sentido, Rozeboom (1938) separou os ovos de *An. strodei* do Panamá em três tipos principais, A, B e C, no entanto, foram observadas variações entre eles. Considerando que os ovos foram coletados no mesmo habitat, ao mesmo tempo e que havia variações dentro de cada tipo morfológico, Rozeboom (1938) considerou que somente a morfologia dos ovos não poderia ser empregada como único critério para a definição de raças distintas de espécies do subgênero *Nyssorhynchus*. Galvão (1938) demonstrou a presença de polimorfismos nos ovos de *An. strodei* que foram coletados em estações climáticas distintas em período de três anos em São Paulo. Conseqüentemente, o mencionado autor separou os ovos em dois grupos, Grupo I e II. Os ovos do Grupo I foram definidos como aqueles que possuíam os flutuadores grandes, enquanto os do Grupo II apresentavam flutuadores pequenos. Considerando as variações observadas nos ovos depositados por uma única fêmea, Galvão (1938) propôs a subdivisão dos grupos I e II em tipo uniforme e polimórfico. A seguir, Galvão e Barreto (1938) definiram os ovos do Grupo III que eram provenientes de fêmeas adultas coletadas em Palmeiras e Rio

Preto, dois municípios do Estado de São Paulo, Brasil. Estes ovos poderiam ser reconhecidos facilmente pela ausência de flutuadores.

Considerando as variações observadas nos ovos de *An. strodei* e também nas cerdas palmadas do abdômen das larvas de exemplares identificados como *An. strodei*, Unti (1940, 1941) descreveu cinco subespécies de *An. strodei*, a saber: *An. strodei ramosi*, *An. strodei arthuri*, *An. strodei artigasi*, *An. strodei albertoi* e *An. strodei lloydi*. *Anopheles strodei ramosi* foi definida por caracteres de larvas de quarto estágio que foram coletadas na cidade de Lorena, Vale do Paraíba, Estado de São Paulo. Dessa maneira, Unti (1940) demonstrou que as larvas de *An. strodei ramosi* poderiam ser separadas daquelas de *An. strodei strodei* pelos folíolos das cerdas palmadas dos segmentos abdominais que apresentam o ápice truncado em *An. strodei ramosi*, mas longos e finos em *An. strodei strodei*. *Anopheles strodei arthuri*, *An. strodei artigasi* e *An. strodei albertoi* foram definidas por características dos ovos de fêmeas coletadas no Vale do Paraíba, Estado de São Paulo.

Diferentemente da maioria das espécies de *Anopheles*, cujos ovos são conhecidos, aqueles de *Anopheles strodei albertoi* podem ser facilmente identificados pela ausência de flutuadores. Acresce considerar que os ovos de *An. strodei arthuri* são estreitos, e possuem flutuadores pouco desenvolvidos e fundidos às franjas que envolvem os pólos anterior e posterior dos ovos. *An. strodei artigasi* possui ovos semelhantes aos de *An. strodei arthuri*, entretanto, aqueles podem ser facilmente separados destes por apresentarem os flutuadores fundidos anteriormente e posteriormente, envolvendo e isolando duas áreas do deck, assim a franja forma um colar tanto no pólo anterior como no posterior. Finalmente, *An. strodei lloydi* (Unti, 1941) foi definida por características dos ovos de exemplares do Panamá, que foram definidos como Tipo C por Rozeboom (1938). Mais recentemente, Lounibos et al. (1997) empregaram estruturas da morfologia

externa dos ovos de uma população de *An. strodei* de Bulo Bulo, Cochabamba Dept., Bolívia para definir *An. strodei*. No entanto, comparando os ovos ilustrados por Lounibos et al. (1997) com aqueles de Unti (1941), pode-se levantar a hipótese que os ovos da população de *An. strodei* de Bulo Bulo são mais semelhantes aos de *An. strodei artigasi*, no entanto, estes podem também representar uma variação morfológica de *An. strodei arthuri*.

Ao lado das variações observadas nos ovos, Schreiber e Pompeu Memoria (1957), Guedes et al. (1957), Schreiber e Guedes (1959, 1960, 1961) observaram diferenças nos padrões de bandas dos cromossomos politênicos de indivíduos identificados como *An. strodei*. Schreiber e Guedes (1961) consideraram que as diferenças observadas nos cromossomos poderiam estar relacionadas às variações registradas em estruturas externas dos ovos. Finalmente, Faran (1980) considerou que ele não dispunha de informações suficientes para tratar *An. strodei* como complexo de espécies, e por isso transferiu os taxa descritos por Unti (1940, 1941) para a sinonímia de *An. strodei*.

As espécies do subgênero *Nyssorhynchus* são sabidamente difíceis de serem identificadas usando apenas caracteres morfológicos das fêmeas adultas, pupas e das larvas de quarto estágio. Para resolver os problemas de identificação de espécies, Fritz (1998) avaliou a possibilidade de desenvolver oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos para o segundo espaçador interno transcrito (ITS2) do DNA ribossômico que permitissem separar espécies do subgênero *Nyssorhynchus*. Entre as seqüências geradas para *An. strodei*, não foram observadas variações. A seguir, Fritz et al. (2004) descreveu o primeiro protocolo para separar *An. strodei*, *An. trinkae* Faran, *An. rangeli* Gabaldón, Cova Garcia & Lopez e *An. triannulatus*. Nesse sentido, amplicons de ITS2 com número de pares de bases distinto foram propostos para separar as quatro espécies. Fritz et al. (2004) incluíram nos testes de PCR multiplex indivíduos de duas populações,

geograficamente distantes, de *An. strodei*, ou seja, uma da Bahia e a outra de Carrasco Valley, Cochabamba, Bolívia. Vale assinalar que os espécimes de ambas as populações geraram amplicons com número similar de nucleotídeos, sugerindo que elas poderiam ser coespecíficas.

Considerando que (1) o polimorfismo observado nos ovos e nos cromossomos politênicos das glândulas salivares pode indicar a presença de espécies distintas dentro do que se define como *An. strodei*, (2) vários espécimes que foram preliminarmente identificados como *An. strodei*, de distintas localidades geográficas no Brasil, podem ser separados em quatro grupos morfologicamente distintos com base em caracteres das genitálias masculinas e dos ovos, e (3) amplicons de ITS2 de duas populações geograficamente distantes de *An. strodei* eram idênticas (Fritz et al., 2004), foram testadas as hipóteses que os taxa descritos por Unti (1940, 1941) são válidos, que os indivíduos testados por Fritz et al. (2004) podem pertencer a uma das espécies que estão na sinonímia de *An. strodei* ou mesmo a *An. strodei*, e existe pelo menos uma espécie não descrita no Complexo Strodei. As diferenças morfológicas foram suplementadas com informações geradas nas análises filogenéticas empregando seqüências dos genes citocromo c subunidade I (COI) do genoma mitocondrial e do nuclear *White* de cópia única. Seqüências do gene COI foram empregadas como marcadores moleculares para diferenciar espécies do Complexo *An. albitarsis* (Lehr et al., 2005), em filogenia molecular (Sallum et al., 2002) e em estudos biogeográficos e de genética de populações de *Anopheles* (Pedro e Sallum, 2009). Acresce considerar que um fragmento de 617 pares de bases da região 5' do gene COI foi utilizado como código de barras para separar 37 espécies de mosquitos do Canadá. As seqüências de cada espécie se agruparam em clados que eram distintos de outros formados por indivíduos das demais espécies de Culicidae (Cywinska et al., 2006). Em contraste, Hemmerter et al. (2009)

demonstraram que o emprego de seqüências de COI pode superestimar a diversidade de *Culex* da Austrália. Para minimizar o problema descrito Hemmerter et al. (2009), foram empregadas seqüências do gene nuclear *White*. Este gene tem sido empregado em estudos filogenéticos de Culicidae (Besansky e Fahey, 1997), de Anophelinae (Krzywinski et al., 2001), para caracterizar complexos de espécies crípticas de *Nyssorhynchus* (Merritt et al., 2005; Brochero et al., 2007; Calado et al., 2008) e em estudos de genética de populações e de filogeografia (Mirabello e Conn, 2008).

Existem três seqüências de ITS2 depositadas no banco de dados genéticos de domínio público (GenBank) de espécimes identificados como *An. strodei* (U92354, U92345 e YO9241). Comparando-se estas seqüências com a ferramenta denominada Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul et al., 1990) é possível observar que elas, muito provavelmente, pertencem a duas espécies distintas. Nesse sentido, as seqüências U92354 e U92345 compartilham 91% de similaridade com a YO9241, enquanto U92354 e U92345 são 99% semelhantes. Estas provavelmente pertencem a um mesmo táxon, enquanto a seqüência YO9241 pode representar outra espécie. Seqüências de ITS2 têm sido amplamente empregadas em taxonomia molecular de *Anopheles* (Fritz, 1998; Fritz et al., 2004; Walton et al., 2007; Paredes-Esquivel et al., 2009; Sallum et al., 2008). A maioria dos estudos sobre espécies de Culicidae empregou diferenças observadas nas seqüências lineares do ITS2, sem avaliar a estrutura secundária dessa região.

Comparações realizadas nas estruturas secundárias do ITS2 de organismos eucariotos mostraram que diferenças e identidades em seqüências de ITS2 em regiões altamente conservadas do extremo 5' da hélice III são eventos evolutivos que podem ser empregados para delimitar espécies biológicas (Coleman, 2009). Nesse sentido, Müller et al. (2007) demonstraram que a presença de “Compensatory Base Changes (CBC)” na

hélice III do ITS2 pode ser empregada como evidência de que dois organismos pertencem a espécies diferentes. CBC ocorre quando dois nucleotídeos pareados sofrem mutação, sem alterações na estrutura secundária da molécula (Coleman, 2009). Além disso, Müller et al. (2007) demonstraram que a presença de CBC entre dois organismos pode prever com 93.11% de certeza se eles pertencem a espécies distintas, enquanto a ausência de CBC sugere que em 76.57% dos casos, os organismos são co-específicos.

No presente estudo, as estruturas secundárias de ITS2 foram avaliadas para determinar a presença de CBC na hélice III. Dessa maneira, objetiva-se corroborar a hipótese que a *An. arthuri*, *An. albertoi* e *An. strodei* são espécies válidas e que existe um táxon não descrito no Complexo Strodei de *Anopheles* (*Nyssorhynchus*). As mesmas hipóteses serão testadas empregando dados morfológicos dos ovos, genitálias masculinas e seqüências do gene citocromo c oxidase subunidade I do genoma mitocondrial e do gene nuclear *White*. Paralelamente, objetiva-se avaliar se os espécimes empregados por Fritz (1998), Fritz et al. (2004) e Dannoff-Burg e Conn (Genbank U92354, U92345) pertencem a dois taxa distintos do Complexo Strodei.

Material e Métodos

Amostras

Os espécimes que foram empregados no presente estudo estão relacionados na Tabela 2.

Tabela 2. Espécies e origem dos exemplares empregados para a obtenção de seqüências dos genes nuclear de cópia única, gene *White*, gene COI do genoma mitocondrial e do segundo espaçador interno transcrito (ITS2) do DNA ribossômico, e dos ovos que foram usados para microscopia eletrônica de varredura de quatro espécies do Complexo Strodei de *Anopheles (Nyssorhynchus)* (Diptera: Culicidae).

Coleção	Espécime	UF	Município	Localidade	Latitude	Longitude	Data	Espécie	LE	PE	G	E	Sexo	Coletor
ES09	1	ES	Santa Teresa	Valsugana	19°55'0"S	40°36'0"W	19/01/06	<i>An. strodei</i>	S	S	S	N	M	Natal et al.
ES09	3	ES	Santa Teresa	Valsugana	19°55'0"S	40°36'0"W	19/01/06	<i>An. strodei</i>	S	S	S	N	M	Natal et al.
VP06(6)	4	SP	Pindamonhangaba	Instituto Agrônômico do Estado de São Paulo	22°57'35.1"S	45°27'08.6"W	26/10/06	<i>An. strodei</i>	S	S'	S	S	M	Sallum et al.
VP06(5)	2	SP	Pindamonhangaba	Instituto Agrônômico do Estado de São Paulo	22°57'35.1"S	45°27'08.6"W	26/10/06	<i>An. strodei</i>	S	S	S	S	M	Sallum et al.
VP05	11A	SP	Pindamonhangaba	Instituto Agrônômico do Estado de São Paulo	22°57'35.1"S	45°27'08.6"W	26/10/06	<i>An. strodei</i>	N	S	S	N	M	Sallum et al.
MG27	108	MG	Coronel Pacheco	Fazenda Fortaleza de Sant'Anna	21°35'16"S	43°15'17"W	30/11/08	<i>An. strodei</i>	N	S	S	N	M	Bergo et al.
MG30	102	MG	Coronel Pacheco	Fazenda Fortaleza de Sant'Anna	21°35'16"S	43°15'17"W	1/12/08	<i>An. strodei</i>	N	S	S'	N	M	Bergo et al.
PR29(23)	3	PR	Foz do Iguaçu	Rio Almada	25°28'50"S	54°35'12"W	28/4/08	<i>An. strodei</i>	S	S	S	S	M	Nagaki et al.

Cont. Tabela 2

Coleção	Espécime	UF	Município	Localidade	Latitude	Longitude	Data	Espécie	LE	PE	G	E	Sexo	Coletor
SP27	1	SP	Lucélia	Pousada do Sol	21°37'07.9"S	50°56'24.0"W	3/2/08	<i>An. strodei</i>	S	S	S	N	M	Bergo et al.
SP31	101	SP	Inubia Paulista	Fazenda Oroitê, Rio Lageado	21°40'53.1"S	50°55'11.6"W	4/2/08	<i>An. strodei</i>	N	S	S	N	M	Bergo et al.
SP07	6	SP	Buri		23°48'0"S	48°34'60"W	10/4/06	<i>An. strodei</i>	S	S	S	N	M	Pedro MCP
SP29	121	SP	Lucélia	Pousada do Sol	21°37'07.9"S	50°56'24.0"W	3/2/08	<i>An. strodei</i>	N	S	S	N	M	Bergo et al.
MG07(3)	4	MG	Frutal	Fazenda Brejão, Sítio Paraíso	20°01'31.0"S	49°04'35.4"W	21/11/06	<i>An. albertoi</i>	S	S	S	S	M	Bergo et al.
MG07(7)	10	MG	Frutal	Fazenda Brejão, Sítio Paraíso	20°01'31.0"S	49°04'35.4"W	21/11/06	<i>An. albertoi</i>	S	S	N	N	F	Bergo et al.
MG07(12)	4	MG	Frutal	Fazenda Brejão, Sítio Paraíso	20°01'31.0"S	49°04'35.4"W	21/11/06	<i>An. albertoi</i>	S	S	S	N	M	Bergo et al.
MG03	102	MG	Frutal	Fazenda Cerradão	19°58'52.6"S	49°05'45.7"W	21/11/2006	<i>An. arthuri</i>	N	S	S	N	M	Bergo et al.
MG07(6)	3	MG	Frutal	Fazenda Brejão, Sítio Paraíso	20°01'31.0"S	49°04'35.4"W	21/11/06	<i>An. arthuri</i>	S	S	S	N	M	Bergo et al.
MG07(20)	2	MG	Frutal	Fazenda Brejão, Sítio Paraíso	20°01'31.0"S	49°04'35.4"W	21/11/06	<i>An. arthuri</i>	S	S	S	N	M	Bergo et al.
MG04	102	MG	Frutal	Fazenda Cerradão	19°59'18.5"S	49°05'36.1"W	21/11/06	<i>An. arthuri</i>	N	S	S	N	M	Bergo et al.

Cont. Tabela 2

Coleção	Espécime	UF	Município	Localidade	Latitude	Longitude	Data	Espécie	LE	PE	G	E	Sexo	Coletor
MG07(1)	100	MG	Frutal	Fazenda Brejão, Sítio Paraíso	20°01'31.0"S	49°04'35.4"W	21/11/06	<i>An. arthuri</i>	N	S	S	S	M	Bergo et al.
MG07(18)	100	MG	Frutal	Fazenda Brejão, Sítio Paraíso	20°01'31.0"S	49°04'35.4"W	21/11/06	<i>An. arthuri</i>	N	S	N	S	F	Bergo et al.
MG07(10)	106	MG	Frutal	Fazenda Brejão, Sítio Paraíso	20°01'31.0"S	49°04'35.4"W	21/11/06	<i>An. arthuri</i>	N	S	S	S	M	Bergo et al.
MG24	1	MG	Goianá	Aeroporto, Zona da Mata	21°32'19.81"S	43°12'03.08"W	30/11/08	<i>An. arthuri</i>	S	S	S	N	M	Bergo et al.
SP31	120	SP	Inubia Paulista	Fazenda Oroitê, Rio Lageado	21°40'53.1"S	50°55'11.6"W	4/2/08	<i>An. arthuri</i>	N	S	S	N	M	Bergo et al.
RO8	1	RO	Monte Negro	Gleba Amir Lando, Linha 25	10°16'07.1"S	63°33'19.4"W	10/1/08	<i>An. arthuri</i>	S	S	S	N	M	Bergo et al.
RO8	104	RO	Monte Negro	Gleba Amir Lando, Linha 25	10°16'07.1"S	63°33'19.4"W	10/1/08	<i>An. arthuri</i>	N	S	S	N	M	Bergo et al.
RO8	109	RO	Monte Negro	Gleba Amir Lando, Linha 25	10°16'07.1"S	63°33'19.4"W	10/1/08	<i>An. arthuri</i>	N	S	S	N	M	Bergo et al.
PR21	100	PR	Foz do Iguaçu	-	25°27'16,5"S	54°32'47,5"W	28/2/07	<i>Anopheles</i> CP	N	S	S	N	M	Bergo et al.

S = Sim; N = Não; G = Genitália masculina; M = macho; F = Fêmea; RO = Rondônia; SP = São Paulo; MG = Minas Gerais; PR = Paraná; ES = Espírito Santo.

Larvas e / ou pupas foram coletadas em campo, diretamente de criadouros, representados por coleções hídricas, no solo. Esses animais foram mantidos em laboratório para a obtenção de adultos, machos e fêmeas, associados às exúvias da larva de quarto instar e / ou da pupa. Paralelamente, foram capturadas fêmeas, no campo, com o auxílio de Armadilhas de Shannon (Forattini, 1962). Os insetos foram capturados quando pousados nas paredes da armadilha e transferidos para frascos de vidro, denominados Tubos Correa (Forattini, 1962). Como os Tubos Correa são abertos em ambas as extremidades, para evitar a fuga dos mosquitos, elas foram cobertas por uma tela de aço inox. Dessa maneira, foi possível alimentar os insetos com sangue e solução açucarada. Esta foi preparada com mel orgânico e água destilada e oferecida aos mosquitos por meio de uma bolinha de algodão inserida dentro da tela de aço inox. Depois de alimentadas com sangue, as fêmeas foram mantidas dentro dos Tubos Correa, em uma caixa de isopor, mantida em temperatura ambiente por 72 horas. A seguir, as fêmeas foram rapidamente anestesiadas com vapor de acetato de etila para a remoção de uma das asas. A estrutura foi retirada com o auxílio de pinça ultrafina, para forçar a postura dos ovos. As fêmeas sem uma das asas foram colocadas, individualizadas, “em repouso” em água destilada, em frasco de plástico de aproximadamente 50 ml, preenchido até a metade com o líquido. Depois de 48 horas da postura, aproximadamente 20 ovos de cada fêmea foram recolhidos da água, com o auxílio de um triângulo de papel, recortado de maneira a ter um dos vértices bastante longo e fino. Os ovos foram removidos da água e imediatamente colocados em solução contendo ácido acético e ácido pícrico (Solução de Bouin). O protocolo para o preparo da Solução de Bouin pode ser encontrado em Forattini (1962). Os mosquitos recém-emergidos foram anestesiados com vapor de acetato de etila e, a seguir, ou colocados em frascos plásticos diminutos. Os espécimes foram guardados em sílica gel, de maneira a

preservar o DNA em boas condições. Estes indivíduos foram separados em dois grupos; um grupo foi montado no ápice de triângulos, identificado e depositado na Coleção Entomológica da Faculdade de Saúde Pública. O segundo grupo foi identificado e depositado na coleção de espécimes congelados. No caso dos indivíduos associados às progênes de fêmeas, apenas um espécime macho foi empregado para a identificação específica. Quando os adultos foram obtidos a partir de imaturos de campo, todos machos e todas as fêmeas foram identificados, separados e guardados isoladamente. Depois de identificados, os adultos foram colocados em crio tubos com etanol 95% e depositados em freezer de ultrabaixa temperatura (-80 ° C). Sempre que possível, as identificações foram feitas empregando características morfológicas dos machos, fêmeas, larvas e pupas. Quando foram obtidos ovos, estes foram fotografados em microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM-6460 (MEV) (Jeol Ltd., Akishima, Japan) e usados para checar as identificações.

Extração de DNA

O DNA genômico de cada mosquito foi extraído com o emprego do QIAgen DNeasy® Blood and Tissue Kit (QIAgen Ltd., Crawley, UK). Os espécimes foram processados individualmente e o protocolo para a extração de DNA de insetos foi aquele sugerido pelo fabricante. A etapa de eluição do DNA que ficou aderido à membrana foi feita duas vezes, pois se sabe que parte do DNA permanece retida na membrana. Os frascos contendo o DNA genômico foram adequadamente etiquetados e guardados separadamente, em freezer -20 ° C até o momento de serem empregados nas reações de amplificação gênica por PCR.

Amplificação de fragmento do DNA ribossômico, incluindo o segundo espaçador interno transcrito do (ITS2)

Nas reações de amplificação gênica foram empregados os pares de oligonucleotídeos 5.8SF (5' - ATC ACT CGG CTC GTG GAT CG - 3') e 28SR (5' - ATG CTT AAA TTT AGG GGG TAG TC - 3') recomendados por Djadid et al. (2007). O oligo iniciador 5.8SF foi desenhado para anelar em região conservada do gene 5.8S e o 28SR, no extremo 5' do gene 28S do DNA ribossômico. As misturas para as reações de PCR foram padronizadas para um volume final de 25 µL, contendo 1 µl DNA; 10 mM Tris-HCl, pH 8,3; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 2,5 µL DMSO; 200 mM de dNTP; 5 picomoles de cada oligonucleotídeo e 2,5 U de Taq DNA Polimerase (New England Biolabs®). O protocolo de ciclos e temperaturas adotado nas reações de amplificação genômica é o que segue, a saber: um ciclo a 94° C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos a 94° C, 60° C e 72° C por 30 segundos cada e um ciclo de extensão final a 72° C por 10 minutos.

Amplificação do gene nuclear *White*

Foi amplificado fragmento de aproximadamente 700 pares de bases (pb) do gene *White* com os iniciadores WZ2E e WZ1IX (WZ2E, AA{T,C}TA{T,C}AA{T,C}CCIGCIGA{T,C}TT{T,C}TA -3', e WZ1IX, 5'-TTIA{G,A}{ G,A}AA{G,A}AAICCC{G,A}AA-3') de Besansky e Fahey (1997). As misturas das reações de PCR foram padronizadas para volume final de 25 µL, contendo 1 µl DNA; 10 mM Tris-HCl, pH 8.3; 50 mM KCl; 1.5 mM MgCl₂; 2.5 µL DMSO; 200 mM de dNTP; 5 picomoles de cada oligonucleotídeo e 2,5 U de Taq DNA Polimerase (New England Biolabs®). O protocolo de ciclos e temperaturas adotado nas reações de amplificação genômica é o que segue, a saber: um ciclo a 94° C por 5

minutos, seguido de 35 ciclos a 94° C por 30 segundos, 52° C por 30 segundos e 72° C por 60 segundos e um ciclo de extensão final a 72° C de 10 minutos.

Os amplicons do gene *White* gerados por PCR a partir do DNA genômico de duas fêmeas (*An. strodei*MG07(18)100 e *An. strodei*MG07(7)10) foram purificados usando precipitação em solução de Poli Etileno Glicol (PEG) (20% poli etileno glicol 8000/2.5 M NaCl) e clonados em pGem-T Easy Vector (Promega, Madison, WI, USA). Três ou quatro clones foram empregados para as reações de sequenciamento genético.

Amplificação do gene mitocondrial COI

As reações de amplificação empregaram os pares de oligonucleotídeos COIF (5' GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G 3') e COIR (5' TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA 3') (Folmer et al., 1994). As misturas de reação foram feitas em volume de 25 µL contendo 1 µL DNA; 10 mM Tris-HCl, pH 8,3; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 2,5 µL DMSO; 200 mM de dNTP; 5 picomoles de cada oligonucleotídeo e 2,5 U de Taq DNA Polimerase (New England Biolabs®). Os tubos foram colocados em termociclador programado para permanecer a 94°C por 3 minutos, seguido por 14 ciclos a 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, com diminuição de 1°C por ciclo, 72°C por 30 segundos, 34 ciclos a 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, seguido por um ciclo de extensão final a 72° C por 10 minutos.

Análise eletroforética dos produtos amplificados

Uma alíquota de cada material amplificado foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão 0,04M Tris; 0,05M acetato de sódio; 0,01M EDTA pH 8,0 (TAE) corados com solução de GelRed (Biotium™). A visualização do gel e os dados

para documentação foram efetuados com o programa LabWorks, do sistema de captura de imagens (Image Acquisition and analysis software) da UVP, Inc. Corp., CA, E. U. A.

Purificação e quantificação dos produtos amplificados para seqüenciamento

O excesso de iniciadores, dNTP e os sais presentes no DNA amplificado foram eliminados por precipitação com solução de PEG/NaCl (20% polietileno glicol 8000(PEG)/ 2.5M NaCl). Para isso, adicionou-se aos tubos contendo os produtos amplificados igual volume de solução de PEG/NaCl, permanecendo a mistura em incubação por 15 minutos a 37° C. Ao final deste período o material foi centrifugado a 13200 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado duas vezes por centrifugação a 13200 rpm por 10 minutos a 8°C, com etanol 80%. O etanol residual foi eliminado por evaporação, o DNA foi dissolvido em 25 µL de H₂O deionizada livre de nucleases e a seguir quantificado por análise eletroforética em gel de agarose 1,5%, corado com GelRed (Biotium™). Utilizou-se, como referência, o marcador “Low mass DNA™ Ladder” (Invitrogen).

Clonagem de produtos de PCR

O sistema pGEM^R-T Easy (Promega) foi empregado na clonagem molecular do fragmento do DNA ribossômico que inclui parte do gene 5.8S, o segundo espaçador ITS2 e o extremo 5' do gene 28S e de duas amostras do gene *White*. As reações de ligação de cada fragmento ao vetor e posterior transformação por choque térmico em células JM 109 quimicamente competentes (M 109 High Efficiency Competent Cells / Promega) seguiram as instruções descritas pelo fabricante. Os recombinantes foram plaqueados em meio LB contendo 100 µg/ml de ampicilina, 0,5 mM de IPTG e 80

µg/ml de X-Gal e os transformantes selecionados pela inativação do gene *lac Z* (Sambrook & Russell, 2006). A caracterização dos clones processou-se por amplificação do fragmento do DNA ribossômico e do gene *White* por PCR, a partir do DNA extraído dos plasmídeos recombinantes com o kit Wizard^R Plus SV Minipreps DNA Purification (Promega) ou diretamente das colônias.

Reações de seqüenciamento de DNA

As reações de seqüenciamento tanto dos produtos das PCRs como dos derivados das clonagens foram realizadas em ambas as direções, usando o reagente ABI Big Dye Terminator Kit v.3.1 (PE Applied Biosystems, Warrington, England). No caso do gene *COI*, foram empregados os mesmos óligos iniciadores usados nas reações de PCR, e para o gene *White* optou-se por dois oligonucleotídeos internos, ou seja, o W1F (5'-GAT CAA RAA GAT CTG YGA CTC GTT- 3') e o W2R (5'-GCC ATC GAG ATG GAG GAG CTG- 3') que apresentam menos degenerações do que aqueles empregados nas PCRs. Os amplicons nas reações de amplificação do fragmento do DNA ribossômico que inclui o ITS2 foram purificados com precipitação por PEG (20% polietileno glicol 8000/2.5 M NaCl) e clonados em pGem-T Easy Vector (Promega, Madison, WI, USA). Entre três e seis clones foram seqüenciados em ambas as direções usando os mesmos óligos iniciadores empregados nas PCRs.

Nas reações de seqüenciamento utilizou-se o protocolo sugerido pelo fabricante, com modificações, a saber: 0,5 µL da mistura de enzima / terminadores fluorescentes (Big Dye Terminator Ready Reaction Mix); 3 µL de tampão de diluição 5X (*Sequence Dilution-buffer*) composto por 5 mM MgCl₂, 200 mM Tris-HCl, pH 9.0; 3.6 picomoles dos óligos ou R ou F; 10-20 ng do produto da PCR ou da clonagem; água ultrapura até completar 10 µL de volume final. As amostras foram colocadas no termociclador,

seguindo-se os parâmetros do ciclo de seqüenciamento preconizados pelo fabricante. As reações de seqüenciamento foram purificadas em colunas Sephadex G50® (GE Healthcare). As seqüências foram analisadas em seqüenciador ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.) e editadas usando Sequencher® para Windows versão 4.9 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, USA).

Análise das seqüências

Foram empregados 28 exemplares para gerar seqüências dos genes COI, *White* e de fragmento do DNA ribossômico que inclui o ITS2. Para o gene COI, foram geradas 28 seqüências de quatro espécies, para o gene *White*, 33 seqüências e para o DNA ribossômico, 58 seqüências. O maior número de seqüências do gene *White* decorreu da necessidade de clonar os amplicons obtidos de duas fêmeas que apresentaram heterozigotidade. Foram seqüenciados três clones do indivíduo *An. arthuri*MG07(18)100 (clones MG07_18_100_CI1, MG07_18_100_CI2 e MG07_18_100_CI3) e quatro clones de *An. albertoi*MG07(7)10 (clones MG07_7_10CI5, MG07_7_10CI7, MG07_7_10CI8, MG07_7_10CI9) que foram empregados nas análises. Em consequência da presença de variabilidade intragenômica observada no ITS2 do DNA ribossômico, houve a necessidade de se clonar os produtos gerados nas PCRs. Dessa maneira foram produzidas 57 seqüências genéticas que foram analisadas isoladamente daquelas dos genes COI e *White*.

Os alinhamentos das seqüências do gene *White* (33 seqüências, número de depósito no GenBank GU226730-GU226762) e do gene COI (28 seqüências, número de depósito no GenBank GU226664-GU226691) foram construídos com o emprego do programa de computador Clustal X versão 2.0 para MacOSX (Larkin et al., 2007). Os alinhamentos foram editados manualmente com o programa MacClade versão 4.08 OS

X (Maddison e Maddison, 2002). As edições foram guiadas por comparações das seqüências geradas com aquelas do gene *White* de *An. albimanus* (U73839) e a do COI do mosquito *An. quadrimaculatus* (NC_000875), respectivamente. As seqüências de DNA dos espécimes usados no presente estudo foram traduzidas para aminoácidos tendo como base o código genético do genoma mitocondrial de *Drosophila*, para o COI, e o código universal, para o gene *White*, usando o programa MacClade versão 4.08 OS X (Maddison e Maddison, 2002). As seqüências dos dois grupos externos foram obtidas do GenBank, *Anopheles (Anopheles) quadrimaculatus* Say (AF318207, NC_000875) e *Anopheles (Cellia) stephensi* Liston (AF318208, FJ210894). Considerando-se que existiam mais seqüências do gene *White* de *An. arthuri*MG07(18)100 e de *An. albertoi*MG07(7)10, para concatenar as bases de dados deste gene com a de COI foi necessário utilizar do recurso de ausência de dados, no caso, foi empregado o símbolo <?> para preencher os sítios de COI para os quais não havia correspondência com as múltiplas seqüências do gene *White* de um mesmo indivíduo. As bases de dados dos genes COI e *White* foram concatenadas empregando o programa MacClade versão 4.08 para MacOSX (Maddison e Maddison, 2002).

Seqüências do ITS2

Os extremos 5' e 3' do ITS2 foram determinados usando o modelo denominado “Hidden Markov Models (HMMs)” dos genes flanqueadores 5.8 e 28S rDNA (Eddy, 1998), otimizados na base de dados denominada “ITS2 Database” (Schultz et al., 2006; Selig et al., 2008). Para as construções das estruturas secundárias de ITS2, adotou-se o procedimento descrito a seguir. Considerando-se que não havia seqüências altamente semelhantes depositadas na “ITS2 Database”, foi necessário estimar inicialmente a estrutura secundária de uma das seqüências para o grupo interno, empregando o

algoritmo disponível no programa de computador denominado Mfold (Zuker, 2003). Não foram aplicadas restrições para a obtenção da estrutura secundária e, portanto, foram adotados os parâmetros padrões do programa. A estrutura gerada no MFold (Zuker, 2003) foi usada como máscara para gerar as estruturas secundárias das outras seqüências de ITS2, utilizando a opção “Custom Modeling Option” da ITS2 Database (Schultz et al., 2006; Selig et al., 2008). Esta opção permite a transferência da estrutura secundária da seqüência molde, que foi gerada no MFold (Zuker, 2003), para uma seqüência proximamente relacionada. O mesmo procedimento foi repetido para as seqüências mais divergentes, para as quais não foi possível transferir pelo menos 75% dos elementos estruturais. A seguir, foram construídas duas bases de dados. Uma das bases era formada pelas seqüências do DNA ribossômico que foram geradas nos seqüenciamentos. A segunda foi elaborada apenas com seqüências de ITS2, sem as regiões flanqueadoras, ou seja, foram excluídos os dados referentes aos genes 5.8S e 28S. Nessa base de dados do ITS2 constavam as seqüências lineares, seguidas das estruturas secundárias produzidas para cada seqüência. As seqüências e as estruturas secundárias foram alinhadas e editadas com o programa 4SALE “A tool for Synchronous RNA Sequence and Secondary Structure Alignment and Editing” (<http://4sale.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/index.html>) (Seibel et al., 2008). A presença de CBC (Coleman, 2009) nas seqüências de ITS2 foi analisada com o programa 4SALE (Seibel et al., 2008). A similaridade entre as seqüências de ITS2 geradas no presente estudo e aquelas que estão depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) foi avaliada utilizando o método denominado BLAST search, Basic Local Alignment Search Tool, (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul et al., 1990), que se encontra disponível no sítio eletrônico

(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome). A diferenciação intra-específica foi estimada usando a média das distâncias P não corrigidas (mean uncorrected “P” distance) empregando o algoritmo de distância do programa PAUP* versão 4.0 para MacOSX (Swofford, 2003).

DNA Vouchers

Alíquotas dos DNAs que foram empregados neste estudo estão depositadas na coleção de insetos congelados, em temperatura -80° C, na Faculdade de Saúde Pública (FSP-USP), São Paulo, Brasil, para referência futura (os números de referência das amostras de DNA encontram-se na Tabela 1). As exúvias das larvas de quarto instar, das pupas e as genitálias dos machos estão depositadas na Coleção Entomológica da Faculdade de Saúde Pública (FSP-USP).

Análise filogenética

As análises filogenéticas empregando as seqüências do gene *White* incluíram uma região codificadora do éxon 3 e do éxon 4, incluindo o íntron entre eles. Vinte sítios do íntron não puderam ser alinhados e por isso foram excluídos das análises, resultando em 78 sítios. Como o primeiro e o segundo códon eram constantes e, portanto, não iriam contribuir para a resolução das topologias, eles foram removidos. Dessa maneira, as análises foram realizadas apenas com os sítios da posição 3 do gene *White* e os 78 do íntron. Para algumas análises, os mosquitos *Anopheles stephensi* e *An. quadrimaculatus* foram usados como grupos externos.

A seleção dos modelos de evolução de nucleotídeos foi realizada com o emprego do programa Modeltest v. 3.7. (Posada e Crandall, 1998). Para essa etapa, optou-se pelo método denominado Akaike Information Criterion (AIC) que está implementado no

programa Modeltest v. 3.7. (Posada e Buckley, 2004). As análises com enfoque Bayesiano foram conduzidas com o programa MrBayes versão 3.1.2 (Ronquist e Huelsenbeck, 2003), valendo-se do método MCMC (Markov Chain Monte Carlo). Como os modelos são complexos, para se obter a distribuição *a posteriori*, é necessário utilizar métodos de simulação estocástica, no caso, o MCMC. As análises dos dados concatenados, COI e *White*, foram conduzidas empregando os mesmos modelos de evolução de nucleotídeos selecionados para cada gene isoladamente. Para o esquema de partição de dados foram empregados os fatores de Bayes que foram estimados através das médias harmônicas dos logaritmos de verossimilhança ($\log L_m$). A diferença entre os logaritmos $\log L_m$ de dois modelos distintos é a estimativa do logaritmo do fator de Bayes entre os modelos. Um fator de Bayes com valor 5 ou superior é considerado como suporte robusto a favor do modelo que melhor explica os dados (Kass e Raftery, 1995). As análises com enfoque Bayesiano foram conduzidas para quatro milhões de gerações. A estratégia Metrópolis conjugada com o método MCMC foi usada com quatro cadeias (chains). Optou-se por usar a temperatura padrão, com exceção dos casos assinalados. Quando foi empregada mais de uma partição dos dados, a taxa de variação entre as partições foi empregada como um parâmetro livre. Três quartos das amostras (burn in) foram descartados. Foram executadas duas análises separadamente. Dessa maneira foi possível avaliar a convergência dos resultados pelas comparações dos resultados obtidos nas duas análises. A convergência dos resultados foi avaliada pelos valores médios dos desvios padrões dos suportes dos ramos. Nesse sentido, observou-se se os valores médios dos desvios padrões diminuíram no decorrer das análises e também se os valores de PSRF, entre os valores dos parâmetros numéricos, eram aproximadamente 1. Para gerar o consenso das topologias obtidas, após o descarte das amostras (burn-in), os ramos suportados por valores inferiores a 70% foram colapsados.

Considerando-se a distância genética entre os grupos externos e o interno, optou-se por analisar os dados, com e sem os grupos externos. Espera-se que nas análises sem os grupos externos, os efeitos potencialmente danosos gerados pelas distâncias genéticas elevadas entre os grupos internos e externos sejam minimizados, melhorando a seleção do modelo, minimizando os efeitos causados pela atração por ramos longos (long branch attraction) e melhorando a estimativa dos parâmetros empregados. Para o gene *White*, as análises foram feitas usando dois esquemas, a saber, terceira posição e íntron como uma partição e terceira posição e íntron separados, como uma segunda partição de dados. Para o gene COI, as análises foram realizadas somente com os sítios da terceira posição de cada códon. Para os dados concatenados dos genes COI e *White*, as análises foram conduzidas empregando-se três estratégias de partição de dados, ou seja, (1) todos os dados juntos, (2) terceiras posições dos genes *White* e COI e íntron, (3) terceira posição do gene COI, terceira posição do gene *White* e íntron. Os esquemas de partição de dados que foram empregados nas análises estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Esquemas de partição de dados, empregados nas análises filogenéticas, do gene nuclear *White* e do mitocondrial COI para quatro espécies do Complexo Strodei de *Anopheles (Nyssorhynchus)* (Diptera: Culicidae).

Dados ^A	Esquemas	Partição	Sem grupo externo	Com grupo externo
			log L _m ^B	log L _m
<i>White</i>	A ₁	Completo	-1163.29	-1745.94
	A ₂	Pos 3 ^C íntron	-1108.12	-1708.63
COI + <i>white</i>	B ₁	Completo	-2182.53	-3189.88
	B ₂	Pos 3 íntron	-2170.91	-3182.49
	B ₃	<i>White</i> Pos 3 COI Pos 3 íntron	-1951.70	-2878.39

^A Os dados incluem a terceira posição dos códons dos genes *White* e COI e o íntron do gene *White*. Os dados combinados incluem a terceira posição dos códons dos genes *White* e COI e o íntron do *White*.

^B log L_m é o logaritmo da média harmônica dos valores de verossimilhança da distribuição posterior.

^C Pos 3 = terceira posição do códon

RESULTADOS

Os resultados das comparações morfológicas e das análises filogenéticas dos genes COI e *White* demonstraram que existem pelo menos três espécies sob o nome *An. strodei* e revelaram a presença de um táxon não descrito no Complexo Strodei de *Anopheles (Nyssorhynchus)*, aqui designado como Forma CP.

Análise filogenética dos genes *White* e COI

O alinhamento do gene *White* gerou 808 sítios codificadores. Destes, 269 da terceira posição foram empregados nas análises. O íntron do gene *White* gerou 98 sítios, dos quais 78 foram empregados. O alinhamento do gene COI produziu 661 sítios, sendo 221 na terceira posição. Como foram mencionados anteriormente, os esquemas de partição de dados que foram utilizados nas análises filogenéticas estão resumidos na Tabela 3. A caracterização básica dos dados do grupo interno está apresentada na Tabela 4.

Tabela 4. Caracterização do grupo interno formado por 28 exemplares que foram empregados nas análises filogenéticas dos genes *White* do genoma nuclear e COI do genoma mitocondrial para quatro espécies do Complexo Strodei da Seção Albimanus de *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera: Culicidae).

Partição dos dados	Seqüências únicas	Nº. de sítios	Constantes	Variáveis	Sítios informativos
<i>White</i> + íntron + COI	33	1567	1394	173	94
Pos 1 ^A		489	477	12	6
Pos 2 ^B		490	487	3	1
Pos 3 ^C		490	362	128	72
Íntron		98	68	30	15
Íntron sem ambigüidades		78	55	23	10
<i>White</i>	33	808	737	71	37
Pos 1		269	262	7	3
Pos 2		270	267	3	1
Pos 3		269	208	61	33
COI	27	661	589	72	42
Pos 1		220	215	5	3
Pos 2		220	220	0	0
Pos 3		221	154	67	39

^APos 1 = primeira posição do códon.

^BPos 2 = segunda posição do códon.

^CPos 3 = terceira posição do códon.

A escolha dos modelos de evolução de nucleotídeos, usando o método AIC (Posada e Buckley, 2004) que está implementado no programa Modeltest (Posada e Crandall, 1998), dos dados separados e combinados, com e sem os grupos externos, está apresentada na Tabela 5. O racional adotado para a escolha dos esquemas de partição de dados é mostrado na Tabela 3.

Tabela 5. Seleção dos modelos de evolução para os genes nuclear *White* e mitocondrial COI separadamente, e combinados COI e *White* para quatro espécies do Complexo Strodei da Seção Albimanus de *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera: Culicidae), com os grupos externos, incluídos e excluídos das análises. *Anopheles* (*Cellia*) *stephensi* e *An. (Anopheles) quadrimaculatus* foram empregados como grupos externos (GE).

Dados	Modeltest	Empregado ^A
Sem GE		
<i>White</i> Pos 3 ^B	K81uf+G	HKY+G
íntron	JC	JC
<i>White</i> Pos 3 + íntron	TVM+G	GTR+G
COI Pos 3	TIM+G	GTR+G
Combinado Pos 3	K80+I+G ^C	K80+I+G
Combinado Pos 3 + íntron	TVMef+I+G	HKY+I+G
Com GE		
<i>White</i> Pos 3	TVM+G	GTR+G
íntron	K80	K80
<i>White</i> Pos 3 + íntron	TVM+G	GTR+G
COI Pos 3	TIM+G	GTR+G
Combinado Pos 3	K81+G	GTR+G
Combinado Pos 3 + íntron	K81+G	GTR+G

^A Como o modelo sugerido pelo Modeltest freqüentemente não está implementado no programa MrBayes, optou-se por modelo similar, geralmente com maior número de parâmetros.

^B Pos 3 = terceira posição do códon.

^C O Modelo K80 é também conhecido como K2P.

Portanto, para o gene *White* (terceira posição dos códons e íntron), o esquema com duas partições (terceira posição dos códons e íntron, separados) apresentou valor de máxima verossimilhança muito superior quando comparado ao valor obtido para o esquema de partição simples (terceira posição dos códons e íntron). Dessa maneira, optou-se pelo esquema de duas partições. A análise filogenética foi mais robusta quando os grupos externos foram excluídos. Neste caso, usando tanto os dados do gene *White* como do *White* combinado com o do COI, as quatro linhagens filogenéticas corroboraram claramente as espécies definidas por características morfológicas. A topologia gerada na análise do gene nuclear *White*, com enfoque Bayesiano, sem os grupos externos está apresentada na Figura 1.

Figura 1. Topologia gerada na análise filogenética, com enfoque Bayesiano, do gene nuclear de cópia única, *White*, incluindo o íntron situado entre os éxons III e IV. Vinte sítios do íntron foram excluídos das análises porque não foi possível produzir um alinhamento preciso da região. Para as análises, adotou-se esquema de partição de dados pela posição das bases nos códons apresentado na Tabela 3 (esquema A₂), empregando o modelo de evolução de nucleotídeos GTR + G (Tabela 5). Os números sobre os ramos indicam os valores de probabilidade posterior (>70%). Os grupos externos foram excluídos da análise.

Foram gerados quatro grupos grandes, a saber: *An. strodei*, *An. arthuri*, *An. albertoi* e um ramo bem separado formado pela morfoespécie aqui denominada como *Anopheles* CP. A probabilidade posterior para os agrupamentos formados por *An. albertoi* e *An. arthuri* é 1.0 e para *An. strodei* é 0,85. Em contraste, na topologia Bayesiana do gene COI com o grupo externo excluído (Figura 2), *An. strodei* e *An. albertoi* formaram um grupo com suporte elevado (Probabilidade Posterior = 1.0). Adicionalmente, as seqüências obtidas dos exemplares MG07_3_4 de *An. albertoi* formaram um grupo, com suporte moderado, com os exemplares MG27_108 e SP27_1, ambos identificados como *An. strodei*. A probabilidade posterior (PP) do grupo é 0.94. No agrupamento formado por *An. arthuri*, pode-se observar dois grupos maiores, um com suporte baixo, que consiste de indivíduos originários de Monte Negro, Estado de Rondônia. O segundo grupo consiste de seqüências de exemplares coletados no Estado de Minas Gerais e um indivíduo do oeste do Estado de São Paulo. *Anopheles* CP permanece separada das outras espécies.

Figura 2. Topologia gerada na análise filogenética, com enfoque Bayesiano, da subunidade I do gene citocromo c oxidase (COI) do genoma mitocondrial. Para as análises, foram utilizadas apenas as terceiras posições dos códons e o modelo de evolução GTR + G (Tabela 5). Os números sobre os ramos indicam os valores de probabilidade posterior (>70%). Os grupos externos foram excluídos da análise.

Nas análises dos dados combinados e fracionados em três conjuntos (terceira posição do *White*, terceira posição do COI e íntron), a resolução dentro do grupo interno foi muito melhor (Figura 3), obtendo-se agrupamentos com suporte estatístico elevado. *Anopheles strodei* formou um grupo fortemente suportado (PP = 0.99), que é irmão daquele formado por *An. albertoi* (PP = 0.99). A probabilidade posterior para o grupo composto por *An. strodei* e *An. albertoi* é 1.0. Semelhantemente, o agrupamento formado por *An. arthuri* é elevado (PP = 1.0) e a forma *Anopheles* CP permanece bem separada dos outros grupos.

Figura 3. Topologia gerada na análise filogenética, com enfoque Bayesiano, do gene nuclear de cópia única, *White*, incluindo o íntron situado entre os éxons III e IV e do gene mitocondrial COI. Vinte sítios do íntron foram excluídos das análises porque não foi possível produzir um alinhamento preciso da região. Para as análises, adotou-se esquema de partição de dados pela posição das bases nos códons apresentado na Tabela 3 (esquema B₃), empregando o modelo de evolução de nucleotídeos HKY + I + G. Os números sobre os ramos indicam os valores de probabilidade posterior (>70%). Os grupos externos foram excluídos da análise.

A mesma estratégia de fracionamento dos dados foi adotada nas análises com e sem os grupos externos. Os agrupamentos que resultaram das análises com os grupos externos incluídos não foram suportados por valores de probabilidade posterior elevados. Vale assinalar que os grupos gerados nas análises filogenéticas com e sem os grupos externos divergiram. Na topologia do gene *White* (Figura 4) com os grupos externos incluídos, *An. albertoi* aparece como um clado monofilético com suporte elevado (PP = 0.98) dentro de uma linhagem maior que inclui todos os indivíduos do grupo interno. O monofiletismo das outras espécies não foi corroborado e mesmo a *Anopheles* CP foi recuperada dentro do clado representado pelo grupo interno.

Figura 4. Topologia gerada na análise filogenética, com enfoque Bayesiano, do gene nuclear de cópia única, *White*, incluindo o íntron situado entre os éxons III e IV. Vinte sítios do íntron foram excluídos das análises porque não foi possível produzir um alinhamento preciso da região. Para as análises, adotou-se esquema de partição de dados pela posição das bases nos códons apresentado na Tabela 3 (esquema A₂), empregando o modelo de evolução de nucleotídeos GTR + G (Tabela 5). Os números sobre os ramos indicam os valores de probabilidade posterior (>70%). Os grupos externos foram incluídos na análise.

Nas análises dos genes combinados, com os grupos externos incluídos (Figura 5), *An. albertoi* foi recuperada com um clado monofilético, irmão do grupo formado por *An. strodei*. A PP do ramo formado por *An. strodei* e *An. albertoi* é 1.0. A análise dos dados concatenados não conseguiu recuperar o monofiletismo de *An. arthuri*. No entanto, as seqüências de alguns indivíduos se juntaram formando grupos com suporte moderado ou baixo (Figura 5).

Figura 5. Topologia gerada na análise filogenética, com enfoque Bayesiano, dos genes nuclear *White* e mitocondrial COI combinados, incluindo o íntron situado entre os éxons III e IV do *White*. Vinte sítios do íntron foram excluídos das análises porque não foi possível produzir um alinhamento preciso da região. Para as análises, adotou-se o esquema de partição de dados pela posição das bases nos códons apresentado na Tabela 3 (esquema B₃), empregando o modelo de evolução de nucleotídeos GTR + G (Tabela 5). Os números sobre os ramos indicam os valores de probabilidade posterior (>70%). Os grupos externos foram incluídos na análise.

Semelhantemente, os resultados das análises do gene COI apresentaram suporte baixo (Figura 6). A probabilidade posterior do clado formado por *An. strodei*, *An. albertoi* e *An. arthuri* é 0.92. Dentro deste grupo, o clado que consiste de *An. strodei* e *An. albertoi* é fortemente suportado (PP = 1.0), no entanto, o monofiletismo de *An. albertoi* e de *An. strodei* não foi corroborado. Entre *An. arthuri*, os indivíduos de Monte Negro, Rondônia, agruparam-se em um clado com suporte moderado (PP = 0.83). Adicionalmente, as seqüências produzidas de *An. arthuri* dos Estados de Minas Gerais e de São Paulo agruparam-se formando uma linhagem com suporte baixo (PP = 0.72). Orientando-se pelo grupo externo, existem evidências moderadas (PP = 0.92) de que a forma *Anopheles* CP é irmã do grupo formado por *An. strodei*, *An. arthuri* e *An. albertoi*.

Figura 6. Topologia gerada na análise filogenética, com enfoque Bayesiano, do gene mitocondrial COI. Para as análises, foram empregadas somente as terceiras posições dos códons, utilizando o modelo de evolução de nucleotídeos TIM + G (Tabela 5). Os números sobre os ramos indicam os valores de probabilidade posterior (>70%). Os grupos externos foram incluídos na análise.

Segundo espaçador interno transcrito (ITS2)

Caracterização das seqüências

O segundo espaçador interno transcrito (ITS2) do DNA ribossômico foi seqüenciado para 28 indivíduos de quatro espécies do Complexo Strodei de *Anopheles* (*Nyssorhynchus*). Três seqüências foram obtidas do GenBank para comparações e para conferir a identificação dos espécimes que deram origem a elas (U91345, U92354 e YO9241). Com exceção de um indivíduo de *An. albertoi* (MG07(7)10), não foi necessário clonar os produtos das PCRs de *Anopheles* CP, *An. strodei* e dos exemplares (MG07(12)4 e MG07(3)4) de *An. albertoi*. Os eletroferogramas resultantes das análises dos produtos das reações de seqüenciamento não apresentaram picos secundários e, portanto, a leitura das bases apresentou poucas ambigüidades que foram editadas usando o programa Sequencher versão 4.9 para Windows. Diferentemente, foram detectadas heterogeneidades intragenômicas em 50% dos espécimes de *An. arthuri*. Por esse motivo, os produtos das PCRs obtidos de seis exemplares foram clonados, gerando maior número de seqüências por indivíduo. Entre as amostras de *An. arthuri*, não foram produzidos clones dos exemplares MG01(1)100, MG04-102, MG07(18)100, RO8-104, RO8-109 e RO8-1. Os números de depósito das seqüências no GenBank são FJ178874-FJ178890, GU226692-GU226729, sendo 25 seqüências diretas e 30 clones de sete indivíduos. A composição de bases do ITS2, excluindo os três espécimes obtidos do GenBank, é a que segue: 0,21524% T, 0,26221 % A, 0,26212% C e 0,26043% G para *An. strodei*; 0,21942% T, 0,26116% A, 0,25083% C e 0,26860% G para *An. albertoi*; e 0,21548% T, 0,25845% A, 0,26376% C e 0,26231% G para *An. arthuri*. As médias das distâncias P não corrigidas, entre as seqüências das quatro espécies, excluindo as amostras do GenBank, variaram entre 0,00 e 0,11963; em *An. strodei* elas variaram de 0,00 a 0,00448; em *An. albertoi*, de 0,00 a

0,00420; em *An. arthuri*, de 0,00 a 0,01345. As médias das distâncias P não corrigidas variaram entre *An. strodei* e *An. albertoi*, de 0,02005 a 0,03026; entre *An. strodei* e *An. arthuri*, de 0,02336 a 0,04423; entre *An. strodei* e *Anopheles* CP, de 0,10508 a 0,11923; entre *An. albertoi* e *Anopheles* CP, de 0,10941 a 0,11900; entre *An. arthuri* e *Anopheles* CP, de 0,09559 a 0,11963. Comparando-se as seqüências dos exemplares *An. strodei*ES09_1, MG27_108 e MG30_102 com amostras depositadas no GenBank, usando a ferramenta denominada BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>), observa-se que elas dividem 99% de similaridade genética com a seqüência U92345 e 98% com U92354. No entanto, a similaridade com YO9241 é apenas 91%. Em relação à *An. albertoi*, as comparações das seqüências geradas para o presente estudo com outras depositadas no GenBank demonstraram que a similaridade genética é relativamente baixa. A seqüência do exemplar *An. albertoi*MG07(12)4 divide 90% de similaridade com a YO9241, em cobertura de 89%. Por outro lado, a seqüência do clone MG07(7)10_C4 divide 91% de similaridade com a YO9241. As médias das distâncias P não corrigidas entre os três clones gerados a partir de MG07(7)10 variaram de 0,00211 a 0,00420. A maior heterogeneidade intragenômica foi observada em *An. arthuri*. As médias das distâncias P não corrigidas entre os clones de um indivíduo foram variáveis e estão na Tabela 6. Comparando-se as seqüências obtidas para *An. arthuri* com YO9241, observa-se que as médias das distâncias P não corrigidas variaram de 0,00438 a 0,01119. Considerando todas as seqüências de *An. arthuri*, incluindo a YO9241, as médias das distâncias P variaram entre 0,0000 e 0,01119. A maior distância foi observada entre a seqüência dos clones SP31_120_C10 e YO9241 (P = 0,01119).

Tabela 6. Médias das distâncias P não corrigidas entre seqüências de clones que foram gerados de produtos de PCRs de exemplares de *An. (Nys.) arthuri*. As distâncias foram calculadas com o programa PAUP* versão 4.0 para MacOSX.

Espécime	Média das distâncias P não corrigidas	Número de seqüências de clones
MG03_102	0,00000 – 0,00464	4
MG07(6)3	0,00374 – 0,01130	6
MG07(20)2	0,00000 – 0,00565	5
MG07(10)1	0,00000 – 0,00565	6
SP31_120	0,00188 – 0,00953	5
MG24_1	0,00188 – 0,00756	4

As estruturas secundárias das seqüências de ITS2, sem as regiões flanqueadoras do 5.8S e do 28S, foram construídas com o programa MFold (Zuker, 2003), usando os parâmetros padrões, 37°C, 5% de subotimização, 1 M NaCl. Essas seqüências foram empregadas como máscaras para gerar as estruturas secundárias das demais, utilizando a opção “Custom Modelling Option” da ITS2 Database (Schultz et al., 2006; Selig et al., 2008). Foram construídas as estruturas de todas as seqüências de ITS2, completas e aquelas das quais faltavam alguns pares de bases na extremidade 3’. A estrutura secundária molde foi construída para a seqüência do indivíduo *An. strodei*MG27_108 que serviu de molde para todas as amostras de *An. strodei* e de *An. albertoi*. No entanto, mesmo variando os parâmetros disponíveis na opção “Custom Modelling Option” da ITS2 Database, não foi possível transferir pelo menos 75% da estrutura para as seqüências de *An. arthuri* e de *Anopheles* CP. Dessa maneira, foram construídos moldes para *An. arthuri* (*An. arthuri*MG07(18)100 e para *Anopheles* CP_PR21_100. O mesmo processo de construção de estruturas secundárias, mencionado anteriormente, foi adotado para *An. arthuri*. As

estruturas secundárias construídas com o MFold, para um indivíduo de cada espécie, estão apresentadas nas Figuras 25 (*An. strodei*), 26 (*An. albertoi*), 27 (*An. arthuri*), e 28 (*Anopheles* CP) do anexo. O alinhamento das seqüências lineares e as respectivas estruturas secundárias foi construído com o programa 4Sale (não mostrado). Comparando-se as estruturas secundárias geradas para cada espécie, é possível identificar as hélices I, II e III. A hélice II pode ser reconhecida pela presença de não pareamento entre duas pirimidinas (Figs. 25-28, Anexo). A hélice III é a mais longa e pode ser identificada pela presença dos nucleotídeos “TGGT” nas posições [98-101] e [145-148]. Não foram encontradas mutações denominadas “mudanças com compensação de bases” (Compensatory Base Changes) entre as seqüências das quatro espécies. O alinhamento das seqüências lineares do ITS2 pode ser observado no Anexo. No alinhamento é possível os múltiplos variantes de ITS2 dentro de cada espécie. Paralelamente, são observadas mutações pontuais esparsas, mas também variações entre as seqüências que permitem a identificação das espécies, sendo que algumas delas, aparentemente, estão associadas. Essas diferenças estão assinaladas no alinhamento de ITS2, apresentado no Anexo, nas figuras 29, 30, 31, 32 e 33.

Análises filogenéticas

Nas análises realizadas com as seqüências do DNA ribossômico, não foram incluídos grupos externos, pois não foi possível obter alinhamento confiável devido à presença de regiões hipervariáveis nas extremidades 3’ do ITS2 das seqüências do grupo interno em relação àquelas dos grupos externos. O alinhamento das 58 seqüências do DNA ribossômico, incluindo o ITS2 e as regiões flangeadoras dos genes 5.8S e 28S, gerou 557 sítios. Destes, 124 sítios eram do gene 5.8S; 31, do gene 28S e 402, do ITS2. Noventa e

quatro sítios eram variáveis, mas apenas 26 continham informações para parcimônia. Como os sítios informativos eram apenas do ITS2, optou-se por não fazer partição dos dados e realizar as análises empregando somente os dados do segundo espaçador. Dezoito seqüências idênticas foram colapsadas em uma única.

A escolha dos modelos de evolução foi ambígua, portanto, optou-se por testar dois entre os melhores, que foram empregados nas análises filogenéticas, com enfoque Bayesiano. Foram testados os modelos K2P + G e HKY + I. As topologias de 50% de consenso de maioria que foram geradas eram quase idênticas, diferindo em um nó em cada árvore. Os suportes para os nós foram baixos, 53% e 72%. O resultado obtido empregando o modelo K2P + G é apresentado na Figura 7.

As análises, empregando as estruturas secundárias, foram feitas apenas com as seqüências do ITS2. O programa de computador ProfDitS (Wolf et al., 2008) permite utilizar informações contidas nas estruturas secundárias do ITS2 para a reconstrução das relações filogenéticas (Wolf et al., 2008), empregando estratégias distintas. Nesse sentido, foram empregados dois racionais para as buscas, a saber: foi conduzida análise de bootstrap empregando o método de distância, com os modelos selecionados pelo Modeltest (Posada e Crandall, 1998). Neste caso, foram realizadas 200 pseudo-replicações com a matriz das taxas de distância específicas para o ITS2. A topologia de 50% de consenso de maioria é apresentada na Figura 8. A segunda estratégia foi aquela denominada Profile Neighbour Joining (PNJ) (Müller et al., 2007). A análise foi conduzida com 200 pseudo-replicações, usando a mesma matriz das taxas de distância específicas para ITS2. A topologia de consenso de maioria está na Figura 9.

Figura 7. Topologia gerada na análise, com enfoque Bayesiano, para seqüências de nucleotídeos do segundo espaçador interno transcrito (ITS2) do DNA ribossômico, empregando o modelo de evolução K2P + G, sem grupos externos.

Figura 8. Topologia gerada na análise das estruturas secundárias construídas para seqüências de nucleotídeos do segundo espaçador interno transcrito (ITS2) do DNA ribossômico. A estratégia adotada foi a de bootstrap em distância que está implementada no programa ProfDistS de Wolf et al. (2008).

Figura 9. Topologia gerada na análise das estruturas secundárias construídas para seqüências de nucleotídeos do segundo espaçador interno transcrito (ITS2) do DNA ribossômico. A estratégia adotada foi a “profile neighbor joining” que está implementada no programa ProfDistS de Wolf et al. (2008).

A topologia de 50% de consenso de maioria apresentada na Figura 7 foi gerada na análise, com enfoque Bayesiano, com o modelo de evolução K2P + G. Esta topologia difere daquela construída com o modelo HKY + I (não apresentada) por apresentar um nó que é suportado por 0.54 de probabilidade posterior. Este nó separa dois agrupamentos dentro de *An. arthuri*. No entanto, em ambos os agrupamentos aparecem seqüências geradas dos clones dos mesmos espécimes. Este é o caso dos espécimes SP31-120 e MG03-102, cujas seqüências apareceram nos dois grupos. A topologia K2P + G demonstra a presença de três grupos, a saber: um grupo formado por *An. arthuri*. A probabilidade posterior deste agrupamento é 0.99. O segundo grupo é formado por dois subgrupos, um deles inclui as seqüências de *An. albertoi* e o outro, *An. strodei*. A probabilidade posterior para os dois grupos é 1,0. *Anopheles albertoi* e *An. strodei* formam um grupo cujo suporte é moderado (probabilidade posterior = 0.89). A única seqüência gerada para *Anopheles* forma CP aparece separada dos agrupamentos formados pelas outras taxa, dentro de uma politomia que inclui (*Anopheles* CP, *An. arthuri*, (*An. albertoi*, *An. strodei*)).

As análises conduzidas com o programa ProfDitS (Wolf et al., 2008), empregando tanto a abordagem de bootstrap em distância (Fig. 8) como a Profile Neighbour Joining (PNJ) (Fig. 9), geraram topologias idênticas. Com exceção do exemplar de *An. strodei* (SP07_6), as seqüências das diferentes espécies se juntaram e o suporte para os agrupamentos foi moderado para *An. arthuri*, mas elevado para as outras espécies. *Anopheles albertoi* e *An. strodei* formaram um agrupamento moderadamente suportado (Figs. 8 e 9). *Anopheles* CP apareceu separada de *An. albertoi*, *An. arthuri* e *An. strodei*. Dentro do grupo formado por *An. arthuri*, as seqüências dos clones gerados a partir de um mesmo indivíduo apareceram tanto dispersas dentro de uma politomia como em grupos menores, dentro da mesma politomia. Comparando os resultados obtidos nas análises das

estruturas secundárias com aqueles da abordagem Bayesiana (Fig. 7), de maneira geral, eles são semelhantes. No entanto, existem diferenças em relação à recuperação do monofiletismo de *An. strodei*. Esta espécie apareceu como táxon polifilético nas análises das estruturas secundárias, pois o exemplar *An. strodei* SP07_6 foi recuperado fora do grupo (*An. strodei*, *An. albertoi*) (Figs. 8 e 9). É possível que a presença do exemplar fora do grupo formado por *An. strodei* seja decorrente do fato de a sequência do ITS2, obtida do espécime, ser 22 pares de bases menor do que as dos outros exemplares. Portanto, esse resultado deve ser conferido com a inclusão de sequência completa de ITS2 do espécime.

Caracterização morfológica dos ovos

Anopheles strodei Root. Figuras 10 e 11. *Tamanho e aspecto geral*. Comprimento 0.469 mm $\pm$ 0.017; largura 0.188 mm $\pm$ 0.012. Coloração negra. Ovos mais largos do que os das demais espécies do complexo *An. strodei*, com flutuadores, com formato de barco, em vista dorsal (Fig. 10A), com formato de barco em vista lateral (Fig. 10B). Extremidade anterior (Fig. 10C) levemente mais larga do que a extremidade posterior (Fig. 10D). Flutuadores largos, situados em posição mediolateral, estendendo-se anteriormente e posteriormente, nunca alcançando os pólos do ovo. Franja circulando a extremidade anterior e posterior, sem formar colar. Superfície dorsal levemente côncava, superfície ventral fortemente curva em vista lateral. *Superfície dorsal*. Área do deck grande, larga, porção anterior (Fig. 10C) levemente mais larga e mais curta do que a posterior (Fig. 10D). Limites das células coriônicas no deck, não visíveis, superfície recoberta por tubérculos grandes, intercalados por outros menores de tamanhos e formas variados. Tubérculos grandes irregulares, com o ápice achatado, formando um domem, com as paredes fendidas

e irregulares (Fig. 10E). Os maiores tubérculos estão presentes na extremidade anterior e posterior, aqueles na porção média do deck são menores.

Figura 10. Ovo de *Anopheles (Nyssorhynchus) strodei*. A. Ovo inteiro, extremidade posterior posicionada canto superior direito, vista dorsal. B. Ovo inteiro, extremidade posterior mostrada no canto posterior direito, vista lateral. C. Porção anterior, vista dorsal. D. Porção posterior, vista dorsal. E. Tubérculos do deck, porção central. Escalas, em micras.

Superfícies ventral e lateral. Limites das células coriônicas, na superfície ventral e lateral, claramente definidos, superfícies das células coriônicas dominadas por saliências com

forma aproximadamente elíptica (Fig. 11A). Poros presentes nas saliências, alguns presentes nas áreas entre as saliências (Fig. 11B). Flutuadores grandes, largos (Fig. 11C), 20-27 costelas, bordas dos flutuadores claramente definidas nas fronteiras com o plastrão ventral (Fig. 11D). *Extremos anterior e posterior*. Franja formando estrutura em forma de um “U”, aberto na porção anterior e posterior do deck, circulando o pólo anterior e posterior do ovo. Superfície interior das franjas fortemente enrugada. Tubérculos presentes na extremidade anterior do ovo, semelhantes em tamanho e em forma aos tubérculos presentes no extremo posterior e na porção mediana do deck. Pólo anterior levemente mais largo do que o posterior. Plastrão recobrendo a superfície ao redor do colar da micrópila e extremidade posterior apresentando poros, saliências em forma de bolhas, menos evidentes do que aquelas presentes na superfície ventral (Fig. 11E). *Micrópila*. Colar da micrópila, separado da margem ventral da franja anterior, superfície do colar lisa, borda interna do colar convexa (Fig. 11F), prolongações radiais das bordas internas estendendo até quase a porção central elevada onde se abre a micrópila. Disco da micrópila formado por uma camada única, com o orifício central da micrópila se abrindo em superfície ligeiramente mais elevada.

Figura 11. Ovo de *Anopheles (Nyssorhynchus) strodei*. A. Córion externo, superfície ventral. B. Córion externo, superfície ventral, mostrando detalhes dos poros nas células coriônicas. C. Flutuadores, vista dorsal. D. Limites dos flutuadores com o plastrão ventral, vista ventrolateral. E. Colar da micrópila. F. Orifício da micrópila. Escalas, em micras.

Anopheles albertoi Unti. Figuras 12 e 13. *Tamanho e aspecto geral.* Comprimento $0.429 \text{ mm} \pm 0.006$; largura $0.124 \text{ mm} \pm 0.005$. Coloração negra. Ovos sem flutuadores, estreitos, em formato de barco estreito (Fig. 12A), em vista lateral (Fig. 12B) e em vista ventral (Fig. 12C). Franja estendida paralelamente ao eixo longitudinal do ovo, ao longo de todo o comprimento, na superfície dorsal (Fig. 12A), circulando o deck, atingindo as extremidades anterior (Fig. 12D) e posterior (Fig. 12E).

Figura 12. Ovo de *Anopheles (Nyssorhynchus) albertoi*. A. Ovo inteiro, extremidade anterior no canto superior esquerdo, vista dorsal. B. Ovo inteiro, extremidade anterior no canto superior direito, vista lateral. C. Ovo inteiro, extremidade anterior no canto superior esquerdo, vista ventral. D. Extremidade anterior, vista dorsal. E. Extremidade posterior, vista dorsal. Escalas, em micras.

Franja reduzida (Fig. 13A, B), exceto nos extremos anterior (Fig. 12D) e posterior (Fig. 12E), onde se apresenta levemente elevada, formando uma estrutura em forma de “U” que circunda ambos os pólos do ovo. Perfil do ovo evidenciando superfície dorsal uniformemente achatada, superfície ventral côncava (Fig. 12B).

Figura 13. Ovo de *Anopheles (Nyssorhynchus) albertoi*. A. Área dorsal mediana, mostrando o deck e a franja dorsal. B. Área mediana, mostrando detalhes do deck e da franja, vista dorsal. C. Detalhes do exocório externo, superfície ventral. D. Detalhe da porção mediana do deck e da franja, vista dorsal. E. Micrópila, vista ventrolateral. Escalas, em micras.

Superfícies dorsal e lateral. Células coriônicas indistintas (Fig. 13A), superfície do ovo recoberta por estruturas semelhantes a escamas, não sobrepostas, pequenas, irregulares, levemente mais elevadas nas bordas, escamas dispostas de maneira irregular nas superfícies dorsal e lateral (Fig. 12A,B). Área do deck estreita, longa, irregular, delimitada pela franja, reduzida em tamanho, levemente elevada, sinuosa (Fig. 13A,B). Limites das células coriônicas não visíveis no deck, tubérculos arranjados em grupos irregulares separados por espaços, tubérculos grandes circundados por outros menores (Fig. 13C), tubérculos maiores localizados nos pólos, anterior e posterior (Fig. 12D,E). Tubérculos maiores aproximadamente com formato de domem, com os lados enrugados, alguns com projeções longas (Fig. 12D,E). *Superfície ventral.* Limites das células coriônicas pouco evidentes (Fig. 13D). Superfície ventral recoberta por estruturas semelhantes a escamas, irregulares, levemente mais elevadas nas bordas, não sobrepostas, dispostas irregularmente, recobrimdo a superfície do ovo, presença de espaços vazios entre as escamas, delimitando as células coriônicas (Fig. 13D). Poros não visíveis. *Extremidades anterior e posterior.* Pólos anterior e posterior do ovo, circundados pela franja. Franja reduzida, exceto nos extremos anterior e posterior do ovo, onde se apresenta levemente mais elevada, com superfície interna enrugada, rugosidade mais evidente nos pólos anterior e posterior do ovo (Fig. 12D,E). Pólo anterior (Fig. 12D) mais largo do que o pólo posterior (Fig. 12E). Plastrão ao redor do colar da micrópila recoberto por escamas irregulares, escamas com as bordas levemente elevadas. Escamas conectadas por pontes estreitas, esparsas. *Micrópila.* Colar da micrópila, liso, borda interna levemente convexa (Fig. 13E), prolongações radiais se entendendo do colar até a elevação central, onde está a micrópila.

Anopheles arthuri Unti. Figuras 14, 15. *Tamanho e aspecto geral.* Comprimento $0.456 \text{ mm} \pm 0.016$; largura $0.164 \text{ mm} \pm 0.007$. Coloração negra. Ovos com flutuadores, estreitos, semelhantes a barcos estreitos em vista dorsal (Fig. 14A), com formato de barco em vista lateral (Fig. 14B). Extremidade anterior (Fig. 14C) mais larga do que a posterior (Fig. 14D). Flutuadores estreitos, localizados mediolateralmente.

Figura 14. Ovo de *Anopheles (Nyssorhynchus) arthuri*. A. Ovo inteiro, extremidade anterior no canto superior esquerdo, vista dorsal. B. Ovo inteiro, extremidade anterior no canto superior direito, vista lateral. C. Porção anterior, vista dorsal. D. Porção posterior, vista dorsal. E. Tubérculos do deck, área central. Escalas, em micras.

Franja rodeando os pólos, anterior e posterior, do ovo, sem formar um colar. Superfície dorsal levemente côncava, superfície ventral fortemente curva em vista lateral.

Superfície dorsal. Área do deck, grande, levemente estreitada nos extremos, anterior e posterior dos flutuadores, deck com a porção anterior mais larga e maior do que a posterior (Fig. 14E). Limites das células coriônicas não visíveis no deck, superfície recoberta por tubérculos grandes, intercalados por outros tubérculos menores, de tamanhos e formatos variados. Tubérculos grandes, aproximadamente em formato de domem, com formas irregulares e paredes fendidas. Tubérculos nos extremos anterior e posterior do deck maiores do que os tubérculos presentes na porção mediana do deck.

Superfícies ventral e lateral. Limites das células coriônicas nas superfícies, ventral e lateral, claramente definidos, superfícies das células coriônicas recobertas por montículos salientes, aproximadamente elípticos, cada montículo perfurado por poros. Poros presentes nos montículos, aqueles presentes nas áreas entre as saliências, esparsos (Fig. 15A).

Flutuadores, reduzidos em tamanho (Fig. 15B), com 15-18 costelas, limite entre as bordas dos flutuadores e do plastrão ventral, claramente definido (Fig. 15C).

Extremidades anterior e posterior. Franja formando estrutura, com forma de “U”, aberta nas porções, anterior e posterior do deck, circundando os pólos anterior e posterior do ovo. Franja com a superfície interna enrugada. Tubérculos situados na porção anterior, circundada pela franja, semelhantes em tamanho aos tubérculos do deck e do pólo posterior. Extremidade anterior levemente mais larga do que a posterior. Plastrão ao redor do colar micropilar e pólo posterior com poros, saliências semelhantes a bolhas menos evidentes do que aquelas presentes na superfície ventral (Fig. 15D).

Micrópila. Colar da micrópila separado da margem ventral da franja anterior, superfície do colar, lisa, borda interna levemente convexa (Fig. 15E), prolongações radiais estendendo-se da borda interna do colar até

aproximadamente a porção elevada central onde se abre a micrópila (Fig. 15F). Disco da micrópila formado por camada única, sustentando na porção central, levemente mais elevada, o orifício micropilar.

Figura 15. Ovo de *Anopheles (Nyssorhynchus) arthuri*. A. Córion externo, superfície ventral. B. Flutuadores, vista dorsal. C. Flutuadores, vista lateral. D. Córion externo, superfície ventral, mostrando detalhes dos poros nas células coriônicas. E. Colar da micrópila. F. Micrópila. Escalas, em micras.

Anopheles forma CP. Figuras 16, 17, 18. *Tamanho e aspecto geral.* Comprimento 0.466 mm $\pm$ 0.008; largura 0.149 mm $\pm$ 0.006. Coloração negra. Ovos, com flutuadores, longos e estreitos, semelhantes a barcos estreitos em vista dorsal (Fig. 16A), com formato evidente de barco em vista lateral (Fig. 16B). Franja circulando completamente os tubérculos presentes na extremidade anterior e posterior, formando duas coroas dorsais, uma em cada extremidade do ovo. Extremidade anterior (Fig. 16C) pouco mais larga do que a posterior (Fig. 16D). Flutuadores estreitos, pouco mais largos do que a largura do ovo na porção mediana, estreitando-se nas extremidades, anterior e posterior (Fig. 16E). Superfície dorsal aproximadamente reta, superfície ventral fortemente curva em vista lateral. *Superfície dorsal.* Área do deck estreita, ocupando aproximadamente metade do comprimento do ovo (Fig. 16A). Flutuadores fundidos na porção anterior e posterior, delimitando totalmente a área do deck. Limites das células coriônicas não visíveis no deck, superfície do deck recoberta por tubérculos grandes, intercalados por outros menores, de tamanhos e formatos variados (Figs. 16A; 17A). Tubérculos grandes, aproximadamente, com formato de domem, com formas irregulares e paredes fendidas (Fig. 17A). Tubérculos presentes nas áreas delimitadas pelas coroas dorsais (Figs. 16C,D; 17B), maiores e mais desenvolvidos do que aqueles presentes na porção mediana do deck (Fig. 17A). *Superfícies ventral e lateral.* Limites das células coriônicas nas superfícies, ventral e lateral, claramente definidos (Fig. 17C), células coriônicas recobertas por montículos salientes, aproximadamente elípticos, cada montículo perfurado por poros. Poros presentes nas áreas entre os montículos, diminutos, esparsos (Fig. 17D). Flutuadores estreitos (Fig. 16A), fundidos dorsalmente, na porção anterior e posterior do deck, com aproximadamente 23 costelas, limite entre as bordas dos flutuadores e do plastrão ventral, claramente definido

(Fig. 18A,B). *Extremidades anterior e posterior*. Franja formando coroa, dorsal, na extremidade anterior e posterior do deck.

Figura 16. Ovo de *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) forma CP. A. Ovo inteiro, extremidade anterior no canto superior esquerdo, vista dorsal. B. Ovo inteiro, extremidade anterior no canto inferior direito, vista lateral. C. Porção anterior, evidenciando a região anterior do deck, envolvida pela franja, formando uma coroa, vista dorsal. D. Porção posterior, evidenciando a região posterior do deck, envolvida pela franja, formando uma coroa, vista dorsal. E. Flutuadores, vista dorsal. Escalas, em micras.

Áreas circundadas pelos colares, nitidamente ovais, estreitando-se em direção anterior e posterior, coroa contínua ao flutuador na margem anterior e na posterior (Fig. 16A,E). Franja com a superfície interna irregular, nitidamente enrugada. Tubérculos situados nas áreas ovais, delimitadas pelas coroas, anterior (Fig. 16C) e posterior (Fig. 16D), maiores do que os tubérculos presentes na porção mediana do deck (Fig. 17A). Extremidade anterior levemente mais larga do que a posterior. Plastrão ao redor do colar micropilar e pólo posterior com poros, saliências semelhantes a bolhas menos evidentes do que aquelas presentes na superfície ventral (Fig. 18C).

Figura 17. Ovo de *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) forma CP. A. Região central do deck, evidenciando os tubérculos e as bordas dorsais dos flutuadores, vista dorsal. B. Detalhe dos tubérculos da porção anterior do deck, da região envolvida pela coroa, vista dorsolateral. C. Plastrão, mostrando as células coriônicas, vista ventral. D. Detalhe de uma célula coriônica, mostrando detalhes dos poros, superfície ventral. Escalas, em micras.

Micrópila. Colar da micrópila, separado da margem ventral da franja anterior, superfície do colar, lisa, borda interna levemente convexa (Fig. 18D), prolongações radiais estendendo-se da borda interna do colar até aproximadamente a porção elevada central onde se abre a micrópila (Fig. 18D). Disco da micrópila formado por camada única, sustentando na porção central, levemente mais elevada, o orifício micropilar (Fig. 18D).

Figura 18. Ovo de *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) forma CP. A. Flutuador, vista lateral. B. Plastrão, mostrando detalhe das células coriônicas e da junção do plastrão com o flutuador, vista laterodorsal. C. Plastrão, mostrando as células coriônicas ao redor da micrópila, pólo anterior, vista ventral. D. Micrópila. Escalas, em micras.

Caracterização morfológica da genitália do macho

A genitália do macho de *An. strodei* (Figuras 19, 20) pode ser facilmente reconhecida pela combinação de caracteres do claspete ventral que inclui o que segue: ápice do claspete

ventral largo, irregular, enrugado e fortemente estriado, estrias dispostas paralelamente e perpendicularmente ao eixo longitudinal da genitália, fortemente desenvolvidas na porção mediana; ápice moderadamente expandido lateralmente, formando lobos aproximadamente arredondados, lobo apicolateral com a margem basal fracamente convexa, margem lateral convexa, margem apical fracamente convexa. Ápice com poucas, esparsas espículas na superfície ventral, espículas nas superfícies, lateral e dorsal, mais densas, aquelas presentes na superfície lateral estendendo-se em direção ao ápice, atingindo aproximadamente quatro quintos basais do lobo apicolateral, espículas presentes na superfície dorsal atingindo o ápice. Espículas presentes na porção basal da superfície ventral, delgadas, curtas, estendendo-se em direção ao ápice até o nível da estrutura refringente. Placa pré-apical moderadamente desenvolvida, aproximadamente circular, fracamente esclerotizada e pouco definida. Lóbulo basal do claspete ventral grande, expandido lateralmente, podendo se apresentar dobrado ventralmente, quando a genitália é montada entre lâmina e lamínula, na porção mais basal do lóbulo basal, as espículas da margem basal são similares em tamanho e em desenvolvimento, longas, moderadamente fortes, projetadas posteriormente, ou, dependendo das montagens, as espículas podem se apresentar dobradas, em direção ventral.

Figura 19. Genitália masculina do lectótipo de *Anopheles (Nyssorhynchus) strodei*. A. Gonocoxito e claspete ventral, vista ventral. B. Detalhe do claspete ventral, vista ventral. C. Claspete ventral, vista dorsal. D. Detalhe do lóbulo basal do claspete ventral, vista ventral. E. Detalhe do lóbulo basal do claspete ventral, vista ventral.

Figura 20. Genitália masculina do topótipo de *Anopheles (Nyssorhynchus) strodei*. A. Claspette ventral, vista ventral, mostrando detalhes do lobo apicolateral, lóbulo basal e placa pré-apical. B. Detalhe do claspette ventral em vista dorsal, mostrando o sulco mediano, e as espículas diminutas que se estendem em direção ao ápice na superfície lateral. C. Gonocoxite, vista geral, em aspecto dorsal. Escalas, em milímetros. Espécimes empregados para elaborar os desenhos MG27-108 e MG30-102.

A combinação dos caracteres diagnósticos para *An. albertoi* (Fig. 21) inclui o que segue: ápice do claspete ventral largo, irregular, rugoso e profundamente estriado, estrias dispostas paralelamente, mas a maioria é perpendicular ao eixo longitudinal da genitália, mais desenvolvidas medianamente; ápice moderadamente expandido lateralmente formando dois lobos arredondados, lobo apicolateral com a margem basal ligeiramente convexa, margem lateral convexa, margem apical ligeiramente convexa. Ápice sem espículas na superfície ventral, espículas esparsas na superfície lateral e dorsal, espículas na superfície lateral, estendendo-se em direção ao ápice atingindo a metade basal dos lobos apicolaterais. Espículas na porção basal da superfície ventral, finas, curtas, estendendo-se em direção ao ápice atingindo o nível da estrutura refringente. Placa pré-apical moderadamente desenvolvida, aproximadamente circular, pouco esclerotizada e pouco definida. Lóbulo basal grande, expandido lateralmente, geralmente dobrado ventralmente na porção basal, espículas, presentes na margem basal, projetadas posteriormente, longas, fortes, densas e mais desenvolvidas na margem interna, estas espículas podem se apresentar dobradas em direção ventral, juntamente com os lóbulos basais, durante o processo de montagem das estruturas entre lâmina e lamínula.

Figura 21. Genitália masculina de *Anopheles (Nyssorhynchus) albertoi*. A. Claspete ventral, vista ventral, mostrando detalhes do lobo apicolateral, lóbulo basal e placa pré-apical. B. Detalhe do claspete ventral em vista dorsal, mostrando o sulco mediano, e as espículas diminutas que se estendem em direção ao ápice na superfície lateral. C. Gonocoxito, vista geral, em aspecto dorsal. Escalas, em milímetros. Espécime empregado para elaborar o desenho MG07(3)4.

A combinação de caracteres diagnósticos para *An. arthuri* (Fig. 22) inclui o que segue: ápice do claspete ventral largo, irregular, rugoso e estriado, estrias dispostas paralela e perpendicularmente ao eixo longitudinal da genitália; ápice do claspete ventral fortemente expandido lateralmente, formando lobos apicolaterais arredondados; lobos apicolaterais com a margem basal e lateral convexas, margem apical levemente côncava. Ápice do claspete ventral, sem espículas na superfície ventral, lateral e dorsal. Porção basal do claspete ventral, com espículas diminutas, esparsas, aquelas presentes na superfície lateral se estendendo em direção ao ápice até a porção basal dos lobos apicolaterais, na superfície ventral, as espículas se distribuem em direção apical, não atingindo o nível da estrutura refringente. Placa pré-apical moderadamente desenvolvida e esclerotizada, aproximadamente circular, moderadamente definida. Lóbulo basal grande, expandido lateralmente, geralmente dobrado em direção ventral, na base, espículas dispostas ao longo da margem basal, projetadas em direção posterior, longas, fortes, mais densas e mais longas no ângulo interno, quando os lóbulos estão dobrados ventralmente, as cerdas se projetam no mesmo sentido.

Figura 22. Genitália masculina de *Anopheles (Nyssorhynchus) arthuri*. A. Claspete ventral, vista ventral, mostrando detalhes do lobo apicolateral, lóbulo basal e placa pré-apical. B. Detalhe do claspete ventral em vista dorsal, mostrando o sulco mediano. C. Gonocoxito, vista geral, em aspecto dorsal. Escalas, em milímetros. Espécime empregado para elaborar o desenho MG24_1.

A combinação de caracteres diagnósticos para a forma morfológica denominada *Anopheles* CP (Fig. 23) inclui o que segue: ápice do claspete ventral largo, arredondado, profundamente rugoso e estriado, expandido lateralmente, formando lobos arredondados bem evidentes, estrias dispostas paralela e perpendicularmente ao eixo longitudinal da genitália; ápice do claspete ventral fortemente expandido lateralmente formando lobos arredondados grandes; lobos apicolaterais com a margem basal, lateral e apical convexas. Ápice com espículas esparsas na superfície lateral. Porção basal com espículas diminutas, esparsas na superfície ventral, estendendo-se da base até o nível dos lobos apicolaterais, espículas na superfície lateral estendendo-se em direção ao ápice, atingindo o ângulo apicolateral. Placa pré-apical moderadamente desenvolvida e esclerotizada, circular, bem definida. Lóbulo basal, pequeno, curto, arredondado na porção medial, curvo lateralmente, com espículas esparsas, semelhantes em tamanho e em desenvolvimento.

Figura 23. Genitália masculina de *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) Forma CP. A. Claspete ventral, vista ventral, mostrando detalhes do lobo apicolateral, lóbulo basal e placa pré-apical. B. Detalhe do claspete ventral em vista dorsal, mostrando o sulco mediano, e as espículas diminutas que se estendem em direção ao ápice na superfície lateral. C. Gonocoxito, vista geral, em aspecto dorsal. Escalas, em milímetros. Espécime empregado para elaborar o desenho MG15(6)8, coletado em Coronel Pacheco, Estado de Minas Gerais.

DISCUSSÃO

Anopheles strodei foi descrita por Root (1926) e atualmente contém cinco espécies na sinonímia, *An. albertoi*, *An. arthuri*, *An. artigasi*, *An. ramosi* e *An. lloydi*. Unti (1940, 1941) descreveu *An. ramosi*, *An. albertoi*, *An. arthuri*, *An. artigasi* e *An. lloydi*, sem designar os tipos das espécies. Mais recentemente, Faran (1980) transferiu formalmente as espécies de Unti (1940, 1941) para a sinonímia de *An. strodei* por não dispor de informações que permitissem corroborar a hipótese que *An. strodei* seria complexo de espécies. Ao examinar características da genitália masculina de espécimes coletados em várias localidades do Brasil, foi possível observar diferenças no claspete ventral que estavam em acordo com diferenças observadas nas estruturas dos ovos quando examinados ao microscópio eletrônico de varredura (MEV). As variações observadas foram cuidadosamente investigadas. Para isso, foram incluídos exemplares coletados na mesma região geográfica das localidades tipo das espécies descritas por Unti (1940, 1941) e de *An. strodei*. Dessa maneira, foram estudadas amostras de localidades do Vale do Paraíba, Estado de São Paulo e de Juiz de Fora, Minas Gerais. Conseqüentemente, os resultados das análises morfológicas e filogenéticas que foram realizadas, revelaram que *An. arthuri* e a *An. albertoi* são espécies válidas. Paralelamente, *An. artigasi* parece ser co-específica com *An. arthuri*, e *An. ramosi* foi corretamente considerada sinônimo de *An. strodei*.

Unti (1940) diferenciou *An. ramosi* de *An. strodei* baseando-se nos tufo palmados dos segmentos abdominais (cerda 1) da larva de quarto instar. Nesse sentido, a *An. ramosi* foi diferenciada de *An. strodei* por apresentar os folíolos das cerdas abdominais 1, truncados, enquanto em *An. strodei*, eles possuíam o ápice longo e fortemente pontudo. No entanto, ao examinar indivíduos de *An. strodei* de várias progênies de fêmeas capturadas

em campo e de machos obtidos a partir de larvas e pupas de campo, observou-se que o ápice das cerdas palmadas (1) do abdômen era variável, podendo se apresentar ou muito fino, delgado e longo, ou truncado. Por esse motivo, optou-se por manter *An. ramosi* na sinonímia de *An. strodei*. Diferentemente, o status taxonômico de *An. lloydi* precisa ser mais bem investigado, pois não foi possível obter amostras do Panamá para serem incluídas no presente estudo. Adicionalmente, analisando as descrições dos ovos de *An. strodei* feitas por Rozeboom (1938) pode-se levantar a hipótese de que existem duas espécies distintas no Panamá, *An. strodei* (ovos dos tipos B e C) e *An. arthuri* (ovos do tipo A). No entanto, serão necessários estudos adicionais antes de se propor mudanças na nomenclatura de *An. lloydi*. Assim, optou-se por manter *An. lloydi* na sinonímia de *An. strodei*. O quarto táxon identificado neste estudo é uma espécie não descrita que pertence ao Complexo Strodei definido por Faran (1980). Esta espécie é mais similar a *An. benarrochi* do Complexo Strodei do que de outras espécies de *Anopheles* (*Nyssorhynchus*).

Morfologia dos ovos e identificação das espécies

As diferenças observadas nas estruturas externas dos ovos examinados ao MEV corroboram a presença de quatro espécies que podem ser confundidas com *An. strodei*. Como foi mencionado anteriormente, Unti (1941) descreveu *An. arthuri*, *An. artigasi* e *An. albertoi* empregando caracteres dos ovos de fêmeas coletadas em localidades do Vale do Paraíba, Estado de São Paulo. As características empregadas por Unti (1941) para definir as três espécies haviam sido registradas em estudos prévios sobre *An. strodei*, mas definidas como variações (Galvão, 1938; Rozeboom, 1938). Unti (1941) observou as mesmas formas em ovos obtidos de fêmeas de localidades do Vale do Paraíba, em São Paulo, e considerou que representavam espécies distintas. Os resultados das análises

morfológicas realizadas para o presente estudo demonstram que as diferenças observadas nos ovos podem ser facilmente associadas às variações encontradas nas estruturas da genitália masculina. Semelhantemente, os resultados das análises filogenéticas, empregando seqüências do gene mitocondrial COI, do nuclear *White* e do ITS2, corroboraram os mesmos quatro grupos. A seguir, serão apresentadas características da morfologia externa dos ovos das quatro espécies, quando examinados em microscópio eletrônico de varredura, que permitem a separação das mesmas.

Unti (1941) demonstrou que a ausência de flutuadores nos ovos de *An. albertoi* permitia o reconhecimento e a separação da espécie. Coincidentemente, os ovos de adultos, identificados preliminarmente como *An. strodei*, coletados em Frutal, Minas Gerais, também não apresentavam os flutuadores (Fig. 12A,B) e, portanto, poderiam ser identificados como sendo de *An. albertoi*. Dentro do subgênero *Nyssorhynchus*, *Anopheles pictipennis* (Philippi) e *Anopheles sawyeri* Causey, Deane, Deane e Sampaio, possuem ovos semelhantes, ou seja, não possuem flutuadores. No entanto, os ovos de *An. albertoi* podem ser diferenciados daqueles de *An. pictipennis* e *An. sawyeri* por apresentarem a franja pouco desenvolvida, estendendo-se paralelamente ao eixo longitudinal do ovo, na superfície dorsal, enquanto em *An. pictipennis* e *An. sawyeri*, a franja está presente ao longo da borda da superfície dorsolateral, formando um colarinho ao redor de todo o ovo (Neghme, 1943; Causey et al., 1943). Paralelamente, os ovos de *An. albertoi* podem ser separados por apresentarem padrão incomum de plastrão na superfície ventral (Figs. 12C; 13C) que é semelhante ao de *An. benarrochi* descrito por Lounibos et al. (1997).

Unti (1941) associou *An. strodei* com os ovos portadores de flutuadores grandes, descritos por Galvão e Lane (1936). Os ovos de *An. strodei* que foram examinados ao MEV (Figs. 10A; 11C), não apresentaram variações grandes quando comparados aos de

Galvão e Lane (1936) e Unti (1941). Galvão (1938) descreveu polimorfismos entre amostras de ovos obtidos de fêmeas identificadas como *An. strodei*. Por causa do polimorfismo, Galvão (1938) dividiu os ovos em dois grupos. Os ovos dos Grupos I e II foram subdivididos em dois subtipos, tipo uniforme e tipo polimórfico. Assim, o segundo tipo de ovos observado no presente estudo, corresponde ao Grupo I, subtipo uniforme de Galvão (1938). Não foram observados polimorfismos nas amostras estudadas.

A terceira forma morfológica de ovo observada em MEV corresponde ao Grupo II, subtipo uniforme definido por Galvão (1938). Unti (1941) associou os ovos do Grupo II com *An. arthuri*. Nesse sentido, os ovos de *An. arthuri* podem ser definidos como aqueles que apresentam formato de barco estreito em vista dorsal (Fig. 14A), mas largo (Fig. 14B), em vista lateral, os flutuadores são reduzidos e estreitos (Fig. 15B), a franja envolve os pólos anterior (Fig. 14C) e posterior (Fig. 14D), sem formar colar na superfície dorsal, nas extremidades do deck. Unti (1941) descreveu que nos ovos de *An. arthuri*, a franja era longa, estava unida aos flutuadores, que eram curtos, e apresentava uma abertura longitudinal ao longo de todo o comprimento do ovo. Ou seja, os flutuadores não se fechavam formando áreas delimitadas pela franja, na superfície dorsal. Lounibos et al. (1997) descreveram os ovos de *An. strodei* de Bulo Bulo, Departamento de Cochabamba, Bolívia. As formas representadas por Lounibos et al. (1997) nas Figuras 5A; 7A e 7D são aquelas típicas descritas para *An. artigasi* por Unti (1941), e também semelhante ao Grupo II, subtipo polimórfico de Galvão (1938). No entanto, a Figura 5B mostra um ovo em vista lateral. Aparentemente, esse ovo difere daqueles apresentados nas figuras 5A; 7A e 7D, pois o deck é aberto, sem as áreas delimitadas pela franja, nas extremidades, anterior e posterior. Considerando que Lounibos et al. (1997) examinaram nove ovos de uma mesma fêmea, as ilustrações demonstram a presença de polimorfismo nos ovos, como foi

observado por Galvão (1938). Dessa maneira, a forma descrita neste estudo pode ser associada ao ovo de *An. arthuri*, que apresenta as extremidades do deck abertas, como aquele da Figura 5B de Lounibos et al. (1997). Infelizmente, não foi possível obter amostras de ovos semelhantes aos de Bulo Bulo, na localidade tipo de *An. artigasi*. Portanto, não foram feitas comparações entre *An. artigasi* e os espécimes de Bulo Bulo. Mesmo assim, as evidências sugerem que *An. artigasi* pode ser sinônimo de *An. arthuri*.

Em coletas realizadas em Coronel Pacheco, Estado de Minas Gerais, foram capturadas fêmeas, identificadas preliminarmente, como sendo de *An. strodei*. Dessa maneira, os ovos de seis adultos puderam ser associados com as formas imaturas e adultos machos e fêmeas. As identificações de campo foram checadas por características da genitália masculina e dos ovos. Nesse sentido, observou-se que os espécimes de Coronel Pacheco eram idênticos a uma amostra obtida em localidade situada no oeste do Estado do Paraná (Tabela 1). Portanto, tratava-se da mesma espécie. O exame dos ovos em MEV revelou que as amostras de Coronel Pacheco (Figs. 16, 17, 18) eram semelhantes aos ovos de *An. strodei* descritos por Lounibos et al. (1997). No entanto, os ovos de Coronel Pacheco eram mais largos (Fig. 16A) do que aqueles de Bulo Bulo e os flutuadores (Fig. 16E) mais protuberantes. De acordo com Lounibos et al. (1997), os ovos de Bulo Bulo apresentam largura aproximada de $112,6 \mu\text{m} \pm 3.1$. Os ovos de Coronel Pacheco medem aproximadamente $149,0 \mu\text{m} \pm 0.006$ e, portanto, poderiam representar espécie distinta. Para confirmar a semelhança das amostras de Coronel Pacheco e do Paraná, três indivíduos coletados naquela cidade foram empregados para a obtenção de seqüências dos genes COI, *White* e do espaçador ITS2 do DNA ribossômico. Como as seqüências de ITS2 dos indivíduos das duas populações eram idênticas (dados não apresentados), consideramos que se tratava da mesma espécie e que seria possível definir os ovos das amostras de

Coronel Pacheco como sendo da espécie não descrita que é designada, neste texto, como *Anopheles* CP. Trata-se de espécie nova que será descrita e validada em outra oportunidade. Os resultados das análises filogenéticas empregando o conjunto total de seqüências, incluindo as três amostras de Coronel Pacheco, serão apresentados em outra oportunidade, pois até o momento, as análises estão sendo processadas.

Genitália masculina e identificação das espécies

Baseando-se em características da genitália masculina, os espécimes empregados no presente estudo podem ser subdivididos em grupos (Figs. 19, 20, 21, 22, 23), que corroboram a presença de quatro espécies, *An. strodei*, *An. arthuri*, *An. albertoi* e *Anopheles* forma CP. A identificação de *An. strodei* foi baseada em comparações feitas entre os espécimes estudados (Fig. 20) e a genitália do lectótipo (Fig. 19). Depois de definidos os caracteres diagnósticos para *An. strodei*, os ovos de fêmeas de campo, das quais obtivemos a geração parental, incluindo machos, foram examinados ao MEV. Dessa maneira, foram determinados caracteres para a identificação de *An. strodei* através dos ovos e também a associação com as espécies descritas por Unti (1941). Foram obtidos adultos machos e fêmeas, associados com imagens de ovos examinados em MEV. Foram feitas comparações para associar características das genitálias masculinas com as formas distintas de ovos, sendo, então, possível definir caracteres diagnósticos da genitália masculina (Figs. 19, 20, 21, 22, 23) para as quatro espécies estudadas.

Primeiramente, vale assinalar que a genitália masculina da forma denominada *Anopheles* CP (Fig. 23) é mais semelhante àquela de *An. benarrochi* do que de *An. strodei*, *An. arthuri* e *An. albertoi*. De acordo com Faran (1980), *An. benarrochi* pertence ao Complexo Strodei do Grupo Oswaldoi. A combinação de características da genitália

masculina que permite o diagnóstico das espécies do Complexo Strodei é a que segue: ápice do claspete ventral predominantemente sem espículas, expandido lateralmente de maneira a formar lobos pronunciados, profundamente estriados e rugosos. Como pode ser observado em *An. benarrochi*, o lóbulo basal do claspete ventral de *Anopheles* CP é pequeno, com espículas curtas, menores do que a largura da porção basal do edeago, e esparsas. No entanto, *Anopheles* CP difere de *An. benarrochi* por apresentar o lóbulo basal arredondado na porção medial, mas curvo lateralmente (Fig. 23). Em *An. benarrochi* o lóbulo basal é curvo em direção medial. Em contraste, *An. strodei* (Fig. 20), *An. albertoi* (Fig. 21) e *An. arthuri* (Fig. 22) possuem lóbulo basal grande, expandido lateralmente, podendo se apresentar dobrado em direção ventral na porção basal, os lóbulos possuem espículas longas e fortes ao longo da margem basal.

Empregando características da genitália masculina, *An. strodei* (Figs. 19, 20) pode ser diferenciada de *An. albertoi*, *An. arthuri* e de *Anopheles* CP por possuir o ápice do claspete ventral moderadamente expandido lateralmente, formando lobos aproximadamente arredondados, os lobos apicolaterais apresentam a margem basal fracamente convexa, a margem lateral é convexa, e a margem apical é levemente convexa, com poucas espículas na superfície ventral, que são pequenas e esparsas, tornando-se mais densas nas superfícies lateral e dorsal, as espículas na superfície lateral se estendem em direção ao ápice, atingindo aproximadamente quatro quintos basais dos lobos apicolaterais; o lóbulo basal é grande, expandido lateralmente, as espículas presentes na margem basal são similares em tamanho e em desenvolvimento, são longas e moderadamente fortes.

Em *An. albertoi* (Fig. 21), o ápice do claspete ventral é moderadamente expandido lateralmente, formando lobos arredondados, os lobos apicolaterais apresentam a margem basal fracamente, convexa, a margem lateral é convexa e a margem apical é levemente

convexa, sem espículas na superfície ventral, mas com espículas esparsas nas superfícies, dorsal e lateral, as espículas na superfície lateral se estendem em direção ao ápice até aproximadamente a metade basal dos lobos apicolaterais; o lóbulo basal é grande, expandido lateralmente, as espículas dispostas na margem basal são longas, fortes, mais densas e mais desenvolvidas no ângulo interno do lóbulo.

Em *An. arthuri* (Fig. 22), o ápice do claspete ventral é fortemente expandido lateralmente, formando lobos arredondados, grandes, os lobos apicolaterais apresentam as margens basal e lateral convexas, e a margem apical, levemente côncava, não possuem espículas nas superfícies ventral, lateral e dorsal; o lóbulo basal é grande, expandido lateralmente, com espículas longas e fortes na margem basal, as espículas são mais fortes, mais densas, mais longas e mais desenvolvidas no ângulo interno do lóbulo. Faran (1980) ilustrou a genitália masculina de um espécime identificado como sendo *An. strodei*. Contudo, o claspete ventral do exemplar de Faran (1980) é similar ao observado em *An. arthuri* (Fig. 22). Nesse sentido, o indivíduo empregado para elaborar a ilustração de Faran (1980) provavelmente, pertence à *An. arthuri*. Examinando uma imagem obtida da genitália masculina (Figura 24) de um espécime identificado como *An. strodei* por Fritz et al. (2004), proveniente do Departamento de Beni, Bolívia, é possível notar que se trata, provavelmente, de um exemplar de *An. arthuri*. Conseqüentemente, as evidências obtidas das estruturas da genitália masculina indicam que *An. arthuri* deve ocorrer em Beni, Bolívia. Como foi mencionado anteriormente, é possível que o espécime empregado por Lounibos et al. (1997), de Cochabamba, Bolívia, também pertença a *An. arthuri*.

Figura 24. Genitália masculina de um exemplar de *An. arthuri*, identificado como *An. strodei*, procedente do Departamento de Beni, Bolívia, evidenciando os lobos apicolaterais do claspete ventral do falósoma.

Em *Anopheles* CP (Fig. 23), o ápice do claspete ventral é fortemente expandido lateralmente, formando lobos arredondados grandes, os lobos apicolaterais apresentam as margens basal, lateral e apical, convexas; as espículas na superfície lateral são esparsas e se estendem da base até atingir a porção apical dos lobos apicolaterais; o lóbulo basal é pequeno, curto, curvo em direção lateral, com espículas esparsas, semelhantes em tamanho e em desenvolvimento.

Análise filogenética

Os resultados das análises realizadas tanto com as seqüências de ITS2 como com as respectivas estruturas secundárias, corroboraram a presença das quatro espécies, *An. strodei*, *An. albertoi*, *An. arthuri*, *Anopheles* CP. Nesse sentido, foram detectadas variabilidades interespecíficas que permitiram separar os taxa, apesar das variações intragenômicas observadas em *An. arthuri* e *An. albertoi* e intra-específicas, em *An. strodei*, *An. arthuri* e *An. albertoi*. Não foram registradas variações intragenômicas em *An. strodei* e em *Anopheles* CP. No entanto, pelos dados disponíveis, não é possível afirmar que não ocorra, pois as observações iniciais foram baseadas nos eletroferogramas resultantes das análises de produtos das reações de seqüenciamento. Ou seja, as clonagens dos produtos das PCRs só foram realizadas quando os eletroferogramas demonstraram a presença de múltiplas cópias que dificultavam a leitura das bases. Entretanto, foi observada variabilidade intra-específica nas cópias do ITS2 de *An. strodei*, registrada pelas médias das distâncias P não corrigidas que oscilaram entre 0,00 e 0,00448. Aparentemente, as variações observadas em *An. strodei* não estão relacionadas com as regiões geográficas das amostras, pois os resultados das análises filogenéticas não evidenciaram agrupamentos que refletissem a origem dos espécimes. As variações no ITS2 observadas em *An. albertoi* e em *An. arthuri* não foram suficientes para impedir a recuperação do monofiletismo dessas espécies. Apesar de o presente estudo incluir somente uma amostra de *Anopheles* CP, em todas as análises a seqüência apareceu bem separada das outras espécies (Figs. 7, 8, 9). Li e Wilkerson (2007) demonstraram que as divergências entre as seqüências de ITS2 de quatro espécies do Complexo *An. albitarsis* eram baixas ($\leq 1,17\%$). No entanto, elas eram suficientes para identificar as espécies. Semelhantemente, Fairley et al. (2005) demonstraram que as variações tanto no ITS1 como no ITS2 de *An. aquasalis* não estavam

associadas com populações ou com a origem geográfica das amostras. Dessa maneira, os autores concluíram que a falta de associação seria evidência de que *An. aquasalis* era uma única espécie. Portanto, é plausível supor que, apesar da variabilidade do ITS2 que foi observada para *An. strodei*, *An. arthuri* e *An. albertoi*, elas não são suficientes para levantar a hipótese da presença de múltiplas espécies dentro de cada táxon.

De acordo com Müller et al. (2007), a presença de CBC na hélice III do ITS2 pode ser usada como marcador para identificar espécies. CBC ocorre quando ambos os nucleotídeos de um sítio pareado sofrem mutação, mantendo o pareamento e a estrutura secundária (Coleman 2009). Müller et al. (2007) demonstraram que a presença de CBC pode prever com 93% de certeza que dois organismos pertencem a espécies diferentes. Entre as espécies estudadas, não foi observada CBC, mesmo nas espécies mais divergentes, como é o caso de *Anopheles* CP. No entanto, a ausência de CBC prevê que os organismos são co-específicos em 76,57 % dos casos (Müller et al., 2007). Portanto, o fato de não ter sido observada CBC entre as quatro espécies, não seria indicação de que são co-específicas.

Tanto o ITS2 como o ITS1 têm sido empregados em taxonomia molecular de *Anopheles* (Matson et al., 2008; Zapata et al., 2007), mesmo com os registros de ocorrências de variações intragenômicas (Scarpassa et al., 1999; Li e Wilkerson, 2005, 2007; Paredes-Esquivel et al., 2009; Calado et al., 2008). Como seria esperada, a evolução em concerto de famílias gênicas ou de unidades repetitivas presentes no genoma deveria favorecer o processo de homogeneização das cópias (Graur e Li, 2000). A evolução em concerto envolve tanto a recombinação recíproca como a não recíproca de DNA repetitivo dentro e entre cromossomos (Bower et al., 2008). Como resultado, haveria acúmulo de divergências interespecíficas e de similaridades intra-específicas (Graur e Li, 2000). Os

processos de recombinação que ocorrem nos organismos podem afetar o número de unidades repetitivas presentes no genoma (Graur e Li, 2000). Em organismos com reprodução sexual, onde ocorre dispersão de cromossomos dentro e entre populações, as mudanças genéticas em famílias gênicas e em unidades repetitivas do genoma podem ser potencializadas alterando a variação intrapopulacional e intra-específica (Bower et al., 2008). Bower et al. (2008) analisaram os padrões de distribuição de ITS1 dentro e entre populações de *Anopheles (Cellia) farauti* Laveran para demonstrar que a evolução em concerto do ITS1 está ocorrendo, mesmo na presença de variabilidade intra-específica. Nesse sentido, os resultados das análises filogenéticas foram congruentes com a origem das amostras e demonstraram que está ocorrendo homogeneização das múltiplas cópias de ITS1 dentro de determinada população da espécie, mas mantendo a variabilidade interpopulacional. Em estudo recente, Bower et al. (2009) demonstraram que, apesar da ocorrência de evolução em concerto no ITS1, a variação intra-individual parece ser mantida pela dinâmica complexa de recombinação e ausência “**turnover**” de DNA em *Anopheles (Cellia) punctulatus* Dönitz.

Os padrões de evolução em concerto em espécies do subgênero *Nyssorhynchus* de *Anopheles* nunca foram estudados. No entanto, a presença de variações no ITS2 foi observada por Li e Wilkerson (2005, 2007) em quatro espécies do Complexo *Anopheles albitarsis*, em *An. nuneztovari* (Onyabe e Conn, 1999), *An. aquasalis* (Fairley et al., 2005) e em *An. goeldii* (Calado et al., 2008). No presente estudo foram observadas variações no ITS2 em *An. arthuri* e em *An. albertoi*. No entanto, os resultados das análises filogenéticas usando tanto os dados das seqüências como das estruturas secundárias resgataram o monofiletismo das quatro espécies. O suporte para os agrupamentos foi elevado, o que demonstra que mesmo com a presença de variações, pode estar ocorrendo evolução em

concerto, que está ocasionando o acúmulo de similaridades intra-específicas e de diferenças interespecíficas.

Os resultados das análises Bayesiana do gene *White* (Fig. 1) e também dos dados concatenados, COI e *White* (Fig. 3), sem os grupos externos, corroboraram o status de espécies das quatro formas morfológicamente distintas do Complexo Strodei de *Anopheles* (*Nyssorhynchus*). O monofiletismo dos grupos compostos por *An. strodei*, *An. albertoi*, *An. arthuri* e *Anopheles* CP é fortemente suportado (Figs. 1,3). Também, os agrupamentos formados por *An. albertoi* e *An. strodei* foram recuperados como irmãos na topologia gerada com os dados combinados dos genes *White* e COI (Fig. 3). Na análise Bayesiana, empregando somente os dados do gene *White*, *An. strodei* e *An. albertoi* apareceram como dois grupo fortemente suportados dentro de uma politomia que inclui *An. arthuri* e *Anopheles* CP (Fig. 1). Dessa maneira, os resultados demonstram que o gene *White* tem sinal filogenético suficiente para recuperar o monofiletismo das espécies do Complexo Strodei, mas não o suficiente para reconstruir a filogenia do grupo. Quando os dados do gene COI foram analisados separadamente, as seqüências de *An. arthuri* formaram um grupo monofilético com dois subgrupos (Fig. 2). Nesse caso, as seqüências de *An. arthuri* de Monte Negro, Estado de Rondônia, apareceram como grupo irmão do agrupamento constituído pelos indivíduos coletados em São Paulo e Minas Gerais (Fig. 2). Em contraste, as seqüências de COI não corroboraram o monofiletismo de *An. albertoi* e de *An. strodei*. As seqüências das duas espécies, de localidades distintas de Minas Gerais, Paraná e São Paulo, se agruparam. O suporte para esse grupo é elevado (probabilidade posterior Bayesiana = 1) (Fig. 2). Como foi mencionado anteriormente, exceto pela morfologia dos ovos, *An. albertoi* (Fig. 21) é morfológicamente mais semelhante ao *An. strodei* (Fig. 20) do que ao *An. arthuri* (Fig. 22) e *Anopheles* CP (Fig. 23), por características da genitália

masculina. Neste estudo, foram empregados os óligos iniciadores sugeridos por Folmer et al. (1994). Dessa maneira, foram gerados fragmentos de aproximadamente 589 pares de bases, com a região dos iniciadores excluída, que corresponde ao que está sendo empregado como código de barras para identificar espécies de diversos grupos animais, incluindo os mosquitos (Cywinska et al., 2006). Conseqüentemente, o fragmento de COI usado para gerar códigos de barras pode não conter informação filogenética suficiente para reconstruir o monofiletismo de *An. strodei* e *An. albertoi*, usando os métodos de análises e as estratégias de amostragem empregados no presente estudo. É possível que *An. strodei* e *An. albertoi* tenham divergido recentemente, e por isso são objetos de separação incompleta de linhagens ou mesmo de ocorrência de fluxo gênico entre as duas espécies.

Maddison e Knowles (2006) discutiram sobre a necessidade de desenvolvimento de métodos de análises que considerassem tanto a substituição de nucleotídeos como os processos de genética de populações. Assim, seria possível empregar, de maneira mais eficiente, o sinal contido nas seqüências de genes para reconstruir topologias de espécies em face de separação incompleta de linhagens e com a presença de nível baixo de fluxo gênico. Acresce considerar que o menor tamanho efetivo da população do gene mitocondrial COI não permitiu a avaliação acurada dos limites de *An. strodei* e *An. albertoi*, possivelmente porque estas espécies divergiram recentemente. Knowles e Carstens (2007) demonstraram que, para espécies que divergiram recentemente, a definição precisa dos limites específicos não será possível para a maioria dos estudos que empregarem somente dados de genes mitocondriais. Em contraste, os resultados das análises das seqüências dos genes COI e *White* corroboraram as hipóteses morfológicas que *An. strodei* e *An. albertoi* são espécies distintas. De acordo com Knowles e Carstens (2007), quando as informações de vários *loci* são discordantes, a concatenação dos dados

pode gerar história evolutiva enganosa. No entanto, como os resultados das análises morfológicas dos ovos e das estruturas da genitália masculina são concordantes com as análises filogenéticas, pode-se considerar que os dados analisados em conjunto possibilitaram a melhor definição dos dois taxa.

Quando os grupos externos, *An. stephensi* e *An. quadrimaculatus*, foram incluídos nas análises, as reconstruções das relações evolutivas entre as espécies do Complexo Strodei, usando seqüências dos genes *White* (Fig. 4) e do COI (Fig. 6) e dados combinados (Fig. 5), mostraram os piores resultados. A resolução das topologias foi ambígua e as probabilidades posteriores Bayesianas dos grupos gerados foram baixas. Os resultados das análises dos dados combinados dos genes *White* e COI (Fig. 5) corroboraram o monofiletismo de *An. strodei* e *An. albertoi*, como grupos irmãos. No entanto, falharam em definir os limites para *An. arthuri*, pois as seqüências desta espécie formaram uma politomia que inclui *Anopheles* CP. Quando analisado isoladamente, o gene *White* resgatou o monofiletismo de *An. albertoi*, com probabilidade posterior Bayesiana igual a 0.98 (Fig. 4).

Finalmente, a distribuição geográfica e as relações filogenéticas entre as espécies do Complexo Strodei necessitam outras investigações, empregando dados de outros genes nucleares e uma amostragem mais abrangente, que inclua exemplares de outras localidades do Brasil e da América Latina, inclusive amostras de *An. strodei*, do Panamá.

REFERÊNCIAS

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. A basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990; 215:403-10.
- Aramburú JG, Ramal CA, Witzig R. Malaria reemergence in the Peruvian Amazon region. *Emerg Infect Dis.* 1999; 5:209-15.
- Belkin JN. The mosquitoes of the South Pacific (Diptera, Culicidae). Berkeley: University of California Press; 1962. v. 1.
- Besansky NJ, Fahey GT. Utility of the white gene in estimating phylogenetic relationships among mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Mol Biol Evol.* 1997; 14:442-54.
- Boëte C, Paul RE. Can mosquitoes help to unravel the community structure of *Plasmodium* species? *Trends Parasitol.* 2006; 22:21-5.
- Bower JE, Cooper RD, Beebe NW. Internal repetition and intraindividual variation in the rDNA ITS1 of the *Anopheles punctulatus* Group (Diptera: Culicidae): multiple units and rates of turnover. *J. Mol. Evol.* 2009; 68:66-79.
- Bower JE, Downton M, Cooper RD, Beebe NW. Intraspecific concerted evolution of the rDNA ITS1 in *Anopheles farauti* Sensu Stricto (Diptera: Culicidae) reveals recent patterns of population structure. *J. Mol. Evol.* 2008; 67:397-411.
- Brochero HH, Li C, Wilkerson RC. A newly recognized species in the *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *albitarsis* complex (Diptera: Culicidae) from Puerto Carreno, Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 2007; 76:1113-7.
- Calado DC, Foster PG, Bergo ES, Santos CL, Galardo AK, 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; 103:791-9.
- Causey OR, Deane LM, Deane MP, Sampaio MM. *Anopheles (Nyssorhynchus) sawyeri*, a new anopheline mosquito from Ceará, Brazil. Ann Entomol Soc Am. 1943; 36:11-20.
- Coleman AW. Is there a molecular key to the level of "biological species" in eukaryotes? A DNA guide. Mol Phylogenet Evol. 2009; 50:197-203.
- Collucci E, Sallum MAM. Cladistic analysis of the subgenus *Anopheles (Anopheles)* Meigen (Diptera: Culicidae) based on morphological characters. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007; 102:277-92.
- Collucci E, Sallum MAM. Phylogenetic analysis of the subgenus *Kerteszia* of *Anopheles* (Diptera: Culicidae: Anophelinae) based on morphological characters. Insect Syst Evol. 2003; 34:361-72.
- Conn JE, Wilkerson RC, Segura MN, de Souza RT, Schlichting CD, Wirtz RA, Povo MM. Emergence of a new Neotropical malaria vector facilitated by human migration and changes in land use. Am J Trop Med Hyg. 2002; 66:18-22.
- Coura JR, Suarez-Mutis M, Ladeia-Andrade S. A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic *Plasmodium* infection - a review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006; 101:229-37.
- Cywinska A, Hunter FF, Hebert PD. Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. Med. Vet. Entomol. 2006; 20:413-24.
- Djadid ND, Gholizadeh S, Tafsiri E, Romi R, Gordeev M, Zakeri S. Molecular identification of palearctic members of *Anopheles maculipennis* in Northern Iran. Malaria Journal. 2007; 17:6.

- Eddy S. Profile hidden Markov models. *Bioinformatics*. 1998; 14:755-63.
- Edwards FW. *Genera Insectorum. Diptera. Fam. Culicidae. Fascicule 194*. Brussels: P. Wytsman; 1932.
- Fairley TL, Kilpatrick CW, Conn JE. Intragenomic heterogeneity of internal transcribed spacer rDNA in Neotropical malaria vector *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*. 2005; 42:795-800.
- Faran E. Mosquito studies (Diptera: Culicidae) XXXIV. A revision of the Albimanus Section of the subgenus *Nyssorhynchus* of *Anopheles*. *Contrib Amer Entomol Inst*. 1980; 15(7):1-215.
- Flores-Mendoza C, Peyton EL, Wilkerson RC, Oliveira RL de. *Anopheles (Nyssorhynchus) konderi* Galvão and Damasceno: neotype designation and resurrection from synonymy with *Anopheles (Nyssorhynchus) oswaldoi* (Diptera: Culicidae). *Proc Entomol Soc Wash*. 2004; 106:118-32.
- Foley DH, Bryan JH, Yeates D, Saul A. Evolution and systematics of *Anopheles*: insights from a molecular phylogeny of Australasian mosquitoes. *Mol Phylogenet Evol*. 1998; 9:262-75.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol*. 1994; 3:294-9.
- Forattini OP. Comportamento exófilo de *Anopheles darlingi* Root, em região meridional do Brasil. *Rev. Saúde Pública*. 1987; 21:291-304.
- Forattini OP. *Entomologia médica. Parte geral, Diptera, Anophelini*. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo; 1962. v. 1.
- Fritz GN, Engman S, Rodriguez R, Wilkerson RC. Identification of four vectors of human

- Plasmodium* spp. by multiplex PCR: *Anopheles rangeli*, *An. strodei*, *An. triannulatus*, and *An. trinkae* (Diptera: Culicidae: *Nyssorhynchus*). J Med Entomol. 2004; 41:1111-5.
- Fritz GN. Sequence analysis of the rDNA internal transcribed spacer 2 of five species of South American human malaria mosquitoes. DNA Seq. 1998; 8:215-21.
- Galvão ALA, Amaral ADF. Estudos sobre os anofelinos do grupo *Myzorhynchella* com a descrição de uma espécie nova, *Anopheles (Nyssorhynchus) antunesi* n. sp. (Diptera, Culicidae). Folia Clin Biol. 1940; 12:150-60.
- Galvão ALA, Lane J. I - Notas sobre os *Nyssorhynchus* de São Paulo (Diptera: Culicidae). Ann. Fac. Med. S. Paulo. 1936; 12:269-88.
- Galvão ALA, Pereira Barreto M. Contribuição ao conhecimento dos primeiros estádios dos anofelinos de São Paulo. Rev Biol Hyg. 1938; 9:110-5.
- Galvão ALA. Contribuição ao conhecimento das espécies de *Myzorhynchella* (Diptera, Culicidae). Arch Zool S Paulo. 1941; 2: 505-76.
- Galvão ALA. Contribuição ao conhecimento dos anofelinos do grupo *Nyssorhynchus* de São Paulo e regiões vizinhas (Diptera: Culicidae). Arch Zool S Paulo. 1940; 1:399-484.
- Galvão ALA. Observações sobre algumas espécies do subgênero *Nyssorhynchus* com especial referência a morfologia dos ovos. Rev Biol Hyg. 1938; 9:51-60.
- Graur D, Li WL. Fundamentals of molecular evolution. 2. ed. Sunderland: Sinauer Assoc Inc; 2000.
- Guedes A, Amorim EM, Schreiber G. Análise dos cromossomos salivares em anofelinos brasileiros. Rev Bras Mal Doenças Trop. 1957; 9:247-50.

- Guimarães JH. Sistematic database of Diptera of de Americas South of the United States (Family Culicidae). São Paulo: Editora Plêiade / Fapesp; 1997.
- Harbach RE. The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. Bull Entomol Res. 2004; 95:537-53.
- Harbach RE. The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. Zootaxa. 2007; 1668:591-688.
- Harbach RE, Howard TM. Index of currently recognized mosquito species (Diptera: Culicidae). Eur Mosq Bull. 2007; 23:1-66.
- Harbach RE, Howard TM. Review of the genus *Chagasia* (Diptera: Culicidae: Anophelinae). Zootaxa. 2009; 2210:1-25.
- Harbach RE, Kitching IJ. Phylogeny and classification of the Culicidae (Diptera). Syst Entomol. 1998; 23:327-70.
- Harbach RE, Kitching IJ. Reconsideration of anopheline phylogeny (Diptera: Culicidae: Anophelinae) based on morphological data. Syst Biodiversity. 2005; 3:345-74.
- Hemmerter S, Slapeta J, Beebe NW. Resolving genetic diversity in Australasian *Culex* mosquitoes: incongruence between the mitochondrial cytochrome c oxidase I and nuclear acetylcholine esterase 2. Mol Phylogenet Evol. 2009; 50:317–25.
- Kass RE, Raftery AE. Bayes factors. J Am Stat Assoc. 1995; 90:773-795.
- Klein TA, Lima JB, Tang AT. Biting behavior of *Anopheles* mosquitoes in Costa Marques, Rondonia, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 1991; 24:13-20.
- Knight KL. Supplement to a catalog of the mosquitoes of the world (Diptera: Culicidae). Washington: The Thomas Say Foundation; 1978. v. 6 suplemento.

- Knight KL, Stone A. A Catalog of the Mosquitoes of the World (Diptera: Culicidae). Washington: The Thomas Say Foundation; 1977. v. 6 suplemento.
- Knowles LL, Carstens BC. Delimiting species without monophyletic gene trees. *Syst Biol*. 2007; 56:887-95.
- Krzywinski J, Wilkerson RC, Besansky N. Evolution of mitochondrial and ribosomal gene sequences in Anophelinae (Diptera: Culicidae): implications for phylogeny reconstruction. *Mol Phylogenetics Evol*. 2001a; 18:479-87.
- Krzywinski J, Wilkerson RC, Besansky N. Toward understanding Anophelinae (Diptera, Culicidae) phylogeny: insights from nuclear single copy genes and the weight of evidence. *Syst Biol*. 2001b; 50:540-56.
- 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. *Bioinformatics*. 2007; 23:2947-8.
- Lehr C, Kilpatrick W, Wilkerson RC, Conn JE. Cryptic species in the *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *albitarsis* (Diptera: Culicidae) complex: incongruence between random amplified polymorphic DNA-Polymerase chain reaction identification and analysis of mitochondrial DNA COI gene sequences. *Ann Entomol Soc Amer*. 2005; 98:908-17.
- Li C, Wilkerson RC. Identification of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *albitarsis* complex species (Diptera: Culicidae) using rDNA internal transcribed spacer 2-based polymerase chain reaction primes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005; 100:495-500.
- Li C, Wilkerson RC. Intragenomic rDNA ITS2 Variation in the Neotropical *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *albitarsis* Complex (Diptera: Culicidae). *J Hered*. 2007; 98:51-9.
- Lindoso JA, Lindoso AA. Neglected tropical diseases in Brazil. *Rev Inst Med Trop São*

- Paulo. 2009; 51:247-53.
- Linthicum KJ. A revision of the *Argyritarsis* Section of the subgenus *Nyssorhynchus* of *Anopheles* (Diptera: Culicidae). Mosq Syst. 1988; 20:98-271.
- 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; 34:136-55.
- Macauley C. Aggressive active case detection: a malaria control strategy based on the Brazilian model. Soc Sci Med. 2005; 60:563-73.
- Maddison DR, Maddison WP. MacClade 4: analysis of phylogeny and character evolution. Sunderland: Sinauer Associates Inc; 2002.
- Maddison WP, Knowles LL. Inferring phylogeny despite incomplete lineage sorting. Syst Biol. 2006; 55:21-30.
- Malafronte RS, Marrelli MT, Ramirez CC, Nassar MN, Marinotti O. Intraspecific variation of second internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA among populations of *Anopheles* (*Kerteszia*) *cruzei* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol. 2007; 44:538-42.
- Marrelli MT, Malafronte RS, Flores-Mendoza C, Lourenço-de-Oliveira R, Kloetzel JK, Marinotti O. Sequence analysis of the second internal transcribed spacer of ribosomal DNA in *Anopheles oswaldoi* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol. 1999; 36:679-84.
- Marrelli MT, Sallum MAM, Marinotti O. A critical review of the second internal transcribed spacer (ITS2) of nuclear ribosomal DNA as a tool for Latin American anopheline taxonomy. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006; 101:817-32.

- Matson R, Rios CT, Chavez CB, Gilman RH, Florin D, Sifuentes VL, Greffa RC, Yori PP, Fernandez R, Portocarrero DV, Vinetz JM, Kosek M. Improved molecular technique for the differentiation of neotropical anopheline species. *Am J Trop Med Hyg.* 2008; 78:492-8.
- Merritt TJ, Young CR, Vogt RG, Wilkerson RC, Quattro JM. Intron retention identifies a malaria vector within the *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* complex (Diptera: Culicidae). *Mol Phylogenet Evol.* 2005; 35:719-24.
- 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; 22:109-19.
- Motoki MT, Linton YM, Ruiz F, Flores-Mendoza C, Sallum MAM. Redescription of *Anopheles oswaldoi* (Peryassú, 1922), with formal lectotype designation. *Zootaxa.* 2007; 1588:31-51.
- Motoki MT, Wilkerson RC, Sallum MAM. 2009. The *Anopheles albitarsis* complex with the recognition of *Anopheles oryzalimnetes* Wilkerson and Motoki, n. sp. and *Anopheles janconnae* Wilkerson and Sallum, n. sp. (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104:823-50.
- Müller T, Philippi N, Dandekar T, Schultz J, Wolf M. 2007. Distinguishing species. *RNA.* 2007; 13:1469-72.
- Nagaki SS. Estudos sistemáticos sobre *Anopheles (Nyssorhynchus) lutzii* (Diptera: Culicidae) [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2009.

- Neghme AR. Contribución a la biología de *Anopheles pictipennis*. II. Comunicación. Observaciones sobre autogenia y estenogamia. Rev Chil Hyg Med Prev. 1943; 5:269-71.
- Onyabe DY, Conn JE. Intragenomic heterogeneity of a ribosomal DNA spacer (ITS2) varies regionally in the Neotropical malaria vector *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae). Insect Mol Biol. 1999; 8:435-42.
- Paredes-Esquivel C, Donnelly MJ, Harbach RE, Townson H. A molecular phylogeny of mosquitoes in the *Anopheles barbirostris* Subgroup reveals cryptic species: implications for identification of disease vectors. Mol Phylogenet Evol. 2009; 50:141-51.
- Pedro PM, Sallum MAM. Spatial expansion and population structure of the neotropical malaria vector, *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae). Biol J Linnean Soc. 2009; 97:854-66.
- Posada D, Buckley TR. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of the AIC and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. Syst Biol. 2004; 53:793-808.
- Posada D, Crandall KA. Modeltest: testing the model of DNA substitution. Bioinformatics. 1998; 14:817-18.
- Póvoa MM, Conn JE, Schlichting CD, Amaral JC, Segura MN, da Silva AN, dos Santos CC, Lacerda RN, de Souza RT, Galiza D, Santa Rosa EP, Wirtz RA. Malaria vectors, epidemiology, and the re-emergence of *Anopheles darlingi* in Belém, Pará, Brazil. J Med Entomol. 2003; 40:379-86.
- Póvoa MM, de Souza RT, Lacerda RN, Rosa ES, Galiza D, de Souza JR, Wirtz RA, Schlichting CD, Conn JE. The importance of *Anopheles albitarsis* E and *An. darlingi*

- in human malaria transmission in Boa Vista, state of Roraima, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006; 101:163-8.
- Póvoa MM, Wirtz R, Lacerda R, Miles M, Warhurst D. Malaria vectors in the municipality of Serra do Navio, State of Amapá, Amazon Region, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001; 96:179-84.
- Quiñones ML, Ruiz F, Calle DA, Harbach RE, Erazo HF, Linton YM. Incrimination of *Anopheles (Nyssorhynchus) rangeli* and *An. (Nys.) oswaldoi* as natural vectors of *Plasmodium vivax* in Southern Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006; 101:617-23.
- Reinert JF, Harbach RE, Kitching IJ. Phylogeny and classification of Aedini (Diptera: Culicidae) based on morphological characters of all life stages. Zool J Linn Soc. 2004; 142:289-368.
- Reinert JF, Harbach RE, Kitching IJ. Phylogeny and classification of *Finlaya* and allied taxa (Diptera: Culicidae: Aedini) based on morphological data from all life stages. Zool J Linn Soc. 2006; 148:1-101.
- Reinert JF, Harbach RE, Kitching IJ. Phylogeny and classification of *Ochlerotatus* and allied taxa (Diptera: Culicidae: Aedini) based on morphological data from all life stages. Zool J Linn Soc. 2008; 153:29-114.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics. 2003; 19:1572-4.
- Root FM. Studies on Brazilian mosquitoes. I. The anophelines of the *Nyssorhynchus* group. Am J Hyg. 1926; 6:684-717.
- Rozeboom LE. The eggs of the *Nyssorhynchus* of *Anopheles* (Culicidae) in Panama. Am J Hyg. 1938; 27:95-107.

- Ruiz F, Quinones ML, Erazo HF, Calle DA, Alzate JF, Linton YM. Molecular differentiation of *Anopheles (Nyssorhynchus) benarrochi* and *An. (N.) oswaldoi* from southern Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005; 100:155-60.
- Sallum MAM, Foster PG, Santos CLS dos, Flores DC, Motoki MT, Bergo ES. Resurrection of two species from synonymy of *Anopheles (Nyssorhynchus) strodei* Root, and characterization of a new taxon from the Strodei Complex (Diptera: Culicidae). J Med Entomol. 2010. No prelo.
- Sallum MAM, Marrelli MT, Nagaki SS, Laporta GZ, Santos CLS. Insights into *Anopheles (Nyssorhynchus)* (Diptera: Culicidae) species from Brazil. J Med Entomol. 2008; 45:970-81.
- Sallum MAM, Schultz TR, Foster PG, Aronstein K, Wirtz RA, Wilkerson RC. Phylogeny of Anophelinae (Diptera: Culicidae) based on nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequences. Syst Entomol. 2002; 27:361-82.
- Sallum MAM, Schultz TR, Wilkerson RC. Phylogeny of Anophelinae (Diptera: Culicidae) based on morphological characters. Ann Entomol Soc Amer. 2000; 93:745-75.
- Sambrook J, Russell DW. The condensed protocols from molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2006.
- Scarpassa VM, Tadei WP, Suarez MF. Sequence analysis of the rDNA internal transcribed spacer 2 of five species: Population structure and genetic divergence in *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae) from Brazil and Colombia. Amer J Trop Med Hyg. 1999; 60:1010-8.
- Schreiber G, Guedes AS. Cytological perspectives in the systematics of anophelines (s.g. *Nyssorhynchus*). Rev Bras Malariol Doenças Trop. 1960; 12:355-8.

- Schreiber G, Guedes AS. Cytological aspects of the taxonomy of anophelines (subgenus *Nyssorhynchus*). Bull World Health Organ. 1961; 24:657-8.
- Schreiber G, Guedes AS. Cytological and ecological researches on Brazilian anophelids. Rev Bras Malariol Doenças Trop. 1959; 11:97-8.
- Schreiber G, Pompeu Memoria JM. Alguns aspectos do polimorfismo cromossômico e ecologia em anofelinos brasileiros. Rev Bras Malariol Doenças Trop. 1957; 9:101-3.
- Schultz J, Müller T, Achtziger M, Seibel PN, Dandekar T, Wolf M. The internal transcribed spacer 2 database - a web server for (not only) low level phylogenetic analyses. Nucleic Acids Res. 2006; 34:W704-7.
- Seibel PN, Müller T, Dandekar T, Wolf M. Synchronous visual analysis and editing of RNA sequence and secondary structure alignments using 4SALE. BMC Res Notes. 2008; 1:91.
- Selig C, Wolf M, Müller T, Dandekar T, Schultz J. The ITS2 Database II: homology modeling RNA structure for molecular systematics. Nucleic Acids Res. 2008; 36:D377-80.
- Sierra DM, Velez ID, Linton Y-M. The malaria vector *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *nuneztovari* Gabaldón comprises one genetic species in Colombia based on homogeneity of nuclear ITS2 rDNA. J Med Entomol. 2004; 41:302-7.
- Silva-do-Nascimento TF, Lourenço-de-Oliveira R. *Anopheles halophylus*, a new species of the subgenus *Nyssorhynchus* (Diptera: Culicidae) from Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002; 97:801-11.
- Silva-do-Nascimento TF, Lourenço-de-Oliveira R. Diverse population dynamics of three *Anopheles* species belonging to the Triannulatus Complex (Diptera: Culicidae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007; 102:975-82.

- Silva-Nunes M, Malafronte RS, Luz BA, Souza EA, Martins LC, Rodrigues SG, Chiang JO, Vasconcelos PF, Muniz PT, Ferreira MU. The Acre Project: the epidemiology of malaria and arthropod-borne virus infections in a rural Amazonian population. *Cad Saúde Pública*. 2006; 22:1325-34.
- Singer B, Castro MC de. Enhancement and suppression of malaria in the Amazon. *Am J Trop Med Hyg*. 2006; 74:1-2.
- Stone A, Knight KL. Type specimens in the United States National Museum. III. The genera *Anopheles* and *Chagasia* (Diptera, Culicidae). *J Wash Acad Sci*. 1956; 46:276-80.
- Swofford DL. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Sunderland: Sinauer Associates Inc; 2003.
- Tauil PL. Perspectives of vector borne diseases control in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006; 39:275-7.
- Unti O. Anofelinos do vale do Paraíba. Nota III. Biologia do *Anopheles* [sic] (*Nyssorhynchus*) *strodei* Root, 1926 com a descrição d'uma variedade nova. *Anopheles* [sic] (*Nyssorhynchus*) *strodei ramosi* var. n. *Ann Paul Med Cir*. 1940; 40:489-505.
- Unti O. Anofelinos do vale do Rio Paraíba, *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *strodei* Root 1926, com a descrição de três variedades novas. *São Paulo Serv Profil Mal Trab*. 1941; 33:3-18.
- Vasconcelos CH, Novo EM, Donalisio MR. Use of remote sensing to study the influence of environmental changes on malaria distribution in the Brazilian Amazon. *Cad Saúde Pública*. 2006; 22:517-26.
- Vittor AY, Gilman RH, Tielsch J, Glass G, Shields T, Lozano WS, Pinedo-Cancino V, Patz JA. The effect of deforestation on the human-biting rate of *Anopheles darlingi*,

- the primary vector of *Falciparum malaria* in the Peruvian Amazon. *Am J Trop Med Hyg.* 2006; 7:3-11.
- Walton C, Somboon P, Harbach RE, Zhang S, Weerasinghe I, O'Loughlin SM, Phompida S, Sochantha T, Tun-Lin W, Chen B, Butlin RK. Molecular identification of mosquito species in the *Anopheles annularis* group in southern Asia. *Med Vet Entomol.* 2007; 21:30-5.
- Ward RA. Second Supplement to "A Catalog of the Mosquitoes of the World" (Diptera: Culicidae). *Mosq Syst.* 1984; 16:227-70.
- Ward RA. Third Supplement to "A Catalog of the Mosquitoes of the World" (Diptera: Culicidae). *Mosq Syst.* 1992; 24:177-231.
- Webb JLA. The long shadow of malaria interventions in tropical Africa. *The Lancet.* 2009; 374:1883-4.
- Wilkerson RC, Gaffigan TV, Lima JB. Identification of species related to *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1995a; 90:721-32.
- Wilkerson RC, Parsons TJ, Klein TA, Gaffigan TV, Bergo E, Consolim J. Diagnosis by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction of four cryptic species related to *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* (Diptera: Culicidae) from Paraguay, Argentina, and Brazil. *J Med Entomol.* 1995b; 32:697-704.
- Wolf M, Ruderish B, Dandekar T, Schultz J, Müller T. ProfDistS: (Profile-) Distance based phylogeny on sequence - structure alignments. *Bioinformatics.* 2008; 24:2401-2.
- Zapata MA, Cienfuegos AV, Quirós OI, Quiñones ML, Luckhart S, Correa MM. Discrimination of seven *Anopheles* species from San Pedro de Uraba, Antioquia,

- Colombia, by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of its sequences. *Am J Trop Med Hyg.* 2007; 77:67-72.
- Zavortink TJ. Classical taxonomy of mosquitoes - A memorial to John N. Belkin. *J Amer Mosq Control Assoc.* 1990; 6:593-9.
- Zavortink TJ. Mosquito studies (Diptera: Culicidae) XXIX. A review of the subgenus *Kerteszia* of *Anopheles*. *Contrib Amer Entomol Inst.* 1973; 9 (3):1-54.
- Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31:3406-15.

ANEXO

Figura 25. Estrutura secundária do segundo espaçador interno transcrito (ITS2) de *Anopheles strodei*, espécime MG27_108, de Coronel Pacheco, Minas Gerais, Brasil, construída com o programa MFold (Zuker, 2003), usando os parâmetros padrões, temperatura 37°C, condições iônicas 1M NaCl. $\Delta^\circ_{37} = -60,3$. A seta assinala as duas bases pirimidinas, não pareadas, na Hélice II. O símbolo [assinala as seqüências TGGT na Hélice III.

Figura 26. Estrutura secundária do segundo espaçador interno transcrito (ITS2) de *Anopheles albertoi*, espécime MG07(12)4, de Frutal, Minas Gerais, Brasil, construída com o programa MFold (Zuker, 2003), usando os parâmetros padrões, temperatura 37°C, condições iônicas 1M NaCl. $\Delta^\circ_{37} = -59,8$. As setas ↘ assinalam as duas bases pirimidinas, não pareadas, na Hélice II e as seqüências TGGT na Hélice III.

Figura 27. Estrutura secundária do segundo espaçador interno transcrito (ITS2) de *Anopheles arthuri*, espécime MG07(18)100, de Frutal, Minas Gerais, Brasil, construída com o programa MFold (Zuker, 2003), usando os parâmetros padrões, temperatura 37°C, condições iônicas 1M NaCl. $\Delta^{\circ}_{37} = -63,5$. A seta assinala as duas bases pirimidinas, não pareadas, na Hélice II. O símbolo [e a seta ↘ assinalam os nucleotídeos TGGT na Hélice III.

Figura 28. Estrutura secundária do segundo espaçador interno transcrito (ITS2) de *Anopheles arthuri*, espécime PR21_110, Paraná, Brasil, construída com o MFold (Zuker, 2003), usando os parâmetros padrões, temperatura 37°C, condições iônicas 1M NaCl. $\Delta^\circ_{37} = -63,5$. A seta $\blacktriangledown$ assinala as duas bases pirimidinas, não pareadas, na Hélice II. O símbolo [assinala as seqüências TGGT na Hélice III.

Figura 29. Alinhamento das seqüências do segundo espaçador interno transcrito (ITS2) do DNA ribossômico, mostrando as regiões conservadas, as hipervariáveis, os sítios que apresentaram heterogeneidade intragenômica e aqueles que permitem a identificação das espécies (←).

Figura 30. Alinhamento das seqüências do segundo espaçador interno transcrito (ITS2) do DNA ribossômico, mostrando as regiões conservadas, as hipervariáveis, os sítios que apresentaram heterogeneidade intragenômica e aqueles que permitem a identificação das espécies (← e ↓). As setas ↙ indicam os motivos TGGT da Hélice III, na estrutura secundária.

Figura 31. Alinhamento das seqüências do segundo espaçador interno transcrito (ITS2) do DNA ribossômico, mostrando as regiões conservadas, as hipervariáveis, os sítios que apresentaram heterogeneidade intragenômica e aqueles que permitem a identificação das espécies (←).

Figura 32. Alinhamento das seqüências do segundo espaçador interno transcrito (ITS2) do DNA ribossômico, mostrando as regiões conservadas, as hipervariáveis, os sítios que apresentaram heterogeneidade intragenômica e aqueles que permitem a identificação das espécies.

Figura 33. Alinhamento das seqüências do segundo espaçador interno transcrito (ITS2) do DNA ribossômico, mostrando as regiões conservadas, as hipervariáveis, os sítios que apresentaram heterogeneidade intragenômica e aqueles que permitem a identificação das espécies.