

## Informe final\* del Proyecto V019 Especies de *Anopheles* en el sur de México y su distribución geográfica actual con enfoque en taxonomía clásica y molecular

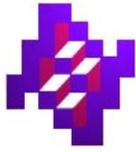
<b>Responsable:</b>	M. en C. Mauricio Casas Martínez
<b>Institución:</b>	Secretaría de Salud Instituto Nacional de Salud Pública Centro de Investigación de Paludismo
<b>Dirección:</b>	19 Poniente esq 4a Norte s/n, Centro, Tapachula, Chis, 30700 , México
<b>Correo electrónico:</b>	mcasas@insp3.insp.mx
<b>Teléfono/Fax:</b>	Teléfono (962) 6 22 19, fax (962) 6 57 82
<b>Fecha de inicio:</b>	Septiembre 28, 2001
<b>Fecha de término:</b>	Diciembre 16, 2004
<b>Palabras clave:</b>	<i>Anophele</i> , Sur de México, Distribución geográfica, Taxonomía clásica, Taxonomía molecular
<b>Principales resultados:</b>	Base de datos, Informe final, Artículo, Fotografías e ilustraciones
<b>Forma de citar** el informe final y otros resultados:</b>	Casas Martínez, M., 2006. Especies de <i>Anopheles</i> en el sur de México y su distribución geográfica actual con enfoque en taxonomía clásica y molecular. Secretaría de Salud. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. V019. México.

### Resumen:

Los reportes existentes relacionados con la presencia y distribución geográfica de los mosquitos *Anopheles* en nuestro país son variados e inconsistentes en cuanto al número de especies reconocidas, no obstante, la situación actual de la diversidad de anofelinos en el sur de México es incierta. Solo tres de estas especies de mosquitos se han incriminado como los principales vectores de paludismo en las diferentes áreas ecogeográficas del territorio nacional, *Anopheles albimanus* Wiedemann, *Anopheles pseudopunctipennis* Theobald y *Anopheles vestitipennis* Dyar & Knab, en contraste, se desconoce la variedad, distribución geográfica e importancia entomopidemiológica de las otras especies de este grupo. Por lo tanto, se hace patente la necesidad primaria de actualizar la información relacionada con la diversidad, abundancia y distribución espacio-temporal de las especies de anofelinos, así como, reconfirmar y aportar elementos adicionales para facilitar las determinaciones taxonómicas de los mosquitos silvestres con ayuda de nuevas características morfológicas, el empleo de la nomenclatura actual y los marcadores moleculares específicos para incorporarlos a las descripciones de las diferentes especies, como tarea previa a los estudios de bionomía. En este sentido, las limitaciones sobre la aplicación de algunas claves para la identificación de las especies comprendidas dentro de este género han llegado a ser consideradas como problemas importantes en varias regiones del mundo en los últimos años. No obstante, para abordar los retos biosistemáticos de la actualidad, se ha requerido del apoyo de procedimientos metodológicos complementarios. Algunas de las dudas sobre la taxonomía y sistemática de varios grupos de insectos de importancia médica se han resuelto mediante el empleo de métodos alternativos para el diagnóstico taxonómico, por esta razón, las técnicas moleculares forman parte de las herramientas modernas utilizadas con éxito en la identificación y diferenciación de especies a partir de marcadores genotípicos. Por lo anterior, el conocimiento de la diversidad y la distribución de los mosquitos anofelinos en el sur de México debe ser contemplado como un requisito previo para focalizar y definir las estrategias a seguir en los programas de vigilancia entomológica y control de vectores de paludismo. En este contexto, el objetivo de este trabajo es la actualización del listado entomológico y la distribución geográfica de los *Anopheles* locales empleando dos métodos diferentes para la identificación de especies: 1) el análisis taxonómico tradicional, y 2) el análisis molecular del DNA genómico con marcadores RAPD-PCR y las regiones ITS2 del rDNA.

Con este proyecto de investigación se espera aportar información suficiente y publicable para la actualización del inventario de los mosquitos anofelinos presentes en los estados del sur de México, además, se pretende proporcionar la descripción de los perfiles moleculares para el diagnóstico taxonómico de las especies del género *Anopheles* distribuidas en la parte sur del país a partir de los marcadores genotípicos obtenidos por el análisis del material genético y de las secuencias conservadas de los espaciadores internos de transcripción del DNA ribosomal, como método alternativo para apoyar la identificación de las especies a través de los procedimientos tradicionales de clasificación.

- 
- \* El presente documento no necesariamente contiene los principales resultados del proyecto correspondiente o la descripción de los mismos. Los proyectos apoyados por la CONABIO así como información adicional sobre ellos, pueden consultarse en [www.conabio.gob.mx](http://www.conabio.gob.mx)
  - \*\* El usuario tiene la obligación, de conformidad con el artículo 57 de la LFDA, de citar a los autores de obras individuales, así como a los compiladores. De manera que deberán citarse todos los responsables de los proyectos, que proveyeron datos, así como a la CONABIO como depositaria, compiladora y proveedora de la información. En su caso, el usuario deberá obtener del proveedor la información complementaria sobre la autoría específica de los datos.



ESPECIES DE *ANOPHELES* EN EL SUR DE  
MÉXICO  
Y SU DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA ACTUAL CON ENFOQUE  
EN TAXONOMÍA CLÁSICA Y MOLECULAR  
(PROYECTO V019)

## INFORME FINAL

**Responsable:** **Biól. Mauricio Casas Martínez.**

**Colaboradores:** **M. en C. Arnoldo Orozco Bonilla,**  
**Dr. Juan Ignacio Arredondo Jiménez,**  
**IBT. Dalia Guadalupe López Cadenas,**  
**QFB. Jorge Arturo Alfaro Mejía.**

**Periodo:** **1° de Diciembre del 2002– 31 de Marzo del 2004.**

**Instituciones:** **INSP / Centro de Investigación de Paludismo,**  
**Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.**

## Introducción

La clase *Insecta* constituye el grupo zoológico más exitoso y de mayor diversidad en todos los ecosistemas, con excepción del mar. Entre las características importantes a las que deben su éxito en la colonización de los hábitats disponibles destacan: el ciclo de vida corto, la capacidad de evolucionar rápidamente para explotar nuevos nichos y la facultad de separar las fases de crecimiento y dispersión. Se estima que el número de especies existentes de insectos es de 1-10 millones. Aunque una baja proporción de ellas se alimenta de sangre de vertebrados, alrededor de 300-400 especies de insectos hematófagos son de importancia médica (Lehane, 1996).

El hábito de la hematofagia ha evolucionado en diferentes líneas de especialización ecológica independientes. No obstante, los insectos así considerados se han unificado fisiológicamente por la necesidad de adquirir proteínas a partir de la sangre de otro animal, formando un agrupamiento diverso en términos taxonómicos (Crosskey, 1988). Por esta razón, estos grupos taxonómicos representan una seria amenaza para la salud pública debido a que tienen la capacidad de inocular agentes infecciosos como protozoarios, helmintos, bacterias y virus (Harwood y James, 1993).

Entre las enfermedades más importantes transmitidas por artrópodos destacan 8 padecimientos infecciosos: la tripanosomiasis africana (enfermedad del sueño), el dengue, la leishmaniasis (úlceras de los chicleros), el paludismo, la esquistosomiasis, la tripanosomiasis americana (enfermedad de Chagas), la filariasis linfática y la oncocercosis (ceguera de los ríos), a las cuales el programa especial de investigación y entrenamiento en enfermedades tropicales (TDR) ha considerado como prioritarias (WHO/TDR, 2004). A pesar del esfuerzo multidisciplinario de este programa global independiente de colaboración científica, existen aspectos ecológicos, como la diversidad biológica, la distribución geográfica y la abundancia de los vectores que necesitan ser investigados permanentemente.

La revisión bibliográfica más reciente de la fauna de mosquitos (Diptera:Culicidae) de México presentó como resultado una lista de 20 géneros, 27 subgéneros y 224 especies (Darsie, 1996). La gran riqueza de especies pertenecientes a este grupo taxonómico de insectos hematófagos se debe a la topografía del territorio nacional. De acuerdo con Folsom y Wardle (1934), las tierras altas de nuestro país se encuentran dentro de la región neártica, mientras que las tierras bajas están en la región neotropical, por lo que las especies de mosquitos disponen de condiciones climáticas favorables para la sobrevivencia y reproducción.

En el caso particular de los mosquitos *Anopheles*, género al que pertenecen los vectores del paludismo, Vargas y Martínez-Palacios (1956) publicaron el inventario entomológico de anofelinos mexicanos, lo cual significó un gran avance en el conocimiento taxonómico y biogeográfico de los

mosquitos transmisores de plasmodios en nuestro país. A través del tiempo, la lista de especies ha sufrido modificaciones conteniendo 27 nombres científicos dentro de 3 subgéneros en su versión más actual (Tabla 1): *Anopheles*, *Kerteszia* y *Nyssorhynchus* (Darsie, 1996; WRBU, 2001).

**Tabla 1.** Comparación de las listas de especies de mosquitos del género *Anopheles* reportadas para México.

ESPECIES	Vargas y Martínez-Palacios <sup>1</sup> (1956)	Vargas <sup>2</sup> (1976)	Wilkerson <i>et al.</i> <sup>3</sup> (1990)	Walter Reed Biosystematics Unit <sup>4</sup> (2001)
<i>An. albimanus</i>	X	X	X	X
<i>An. apicimacula</i>	X	X	X	X
<i>An. argyritarsis</i>	X	X	X	X
<i>An. aztecus</i>	X	X	X	X
<i>An. barberi</i>	X			
<i>An. bradleyi</i>	X	X	X	X
<i>An. crucians</i>	X	X	X	X
<i>An. darlingi</i>	X	X	X	X
<i>An. eiseni</i>	X	X	X	X
<i>An. evansae</i>		X		
<i>An. franciscanus</i>	X		X	X
<i>An. freeborni</i>	X	X	X	X
<i>An. fausti</i>	X	X	X	X
<i>An. gavaldoni</i>	X	X	X	X
<i>An. hectoris</i>	X	X	X	X
<i>An. intermedius</i>		X		X
<i>An. judithae</i>		X	X	X
<i>An. mediopunctatus</i>		X		
<i>An. neivai</i>	X	X	X	X
<i>An. neomaculipalpus</i>	X	X	X	X
<i>An. parapunctipennis</i>	X	X	X	X
<i>An. pseudopunctipennis</i>	X	X	X	X
<i>An. willardi</i>	X	X		
<i>An. punctimacula</i>	X	X	X	X
<i>An. punctipennis</i>	X	X	X	X
<i>An. quadrimaculatus</i>	X	X	X	X
<i>An. strodei</i>	X		X	X
<i>An. veruslanei</i>			X	X
<i>An. vestitipennis</i>	X	X	X	X
<i>An. walkeri</i>	X		X	X
<i>An. xelajuensis</i>	X	X	X	X
<i>An. hermsi</i> *				

\* Otros autores.

En este contexto, los resultados del presente trabajo corresponden a la verificación de la información bibliográfica mediante el muestreo entomológico en campo en los estados de Guerrero, Oaxaca y Chiapas con su respectiva determinación taxonómica a nivel de especie, integración de la colección científica de referencia para mosquitos del sur de México y sistematización de la información curatorial.

## Actividades de Campo

Durante los años 2001-2003, se realizaron 8 muestreos de material biológico en los estados de Guerrero, Oaxaca y Chiapas, de acuerdo con el programa de colectas, además de las adicionales (Tabla 2).

**Tabla 2.** Cronograma de actividades entomológicas de campo.

Periodo	Estado(s)	Zona(s)	Días	Condición
22 octubre -16 noviembre 2001	Chiapas	Costa y montaña	20	Programada
22 octubre -26 noviembre 2001	Guerrero y Oaxaca	Montaña y costa	36	Programada
18 enero – 11 febrero 2002	Chiapas	Selva	25	Programada
22 abril – 17 mayo 2002	Chiapas	Montaña y costa	10	Programada
24 mayo – 17 junio 2002	Chiapas	Selva	25	Programada
10 julio – 9 agosto 2002	Guerrero y Oaxaca	Costa y montaña	31	Programada
14 septiembre – 19 octubre 2002	Chiapas	Costa y montaña	20	Adicional
22 enero -26 enero 2003	D. F. y Oaxaca	Montaña y costa	5	Adicional

En general, se colectaron estados inmaduros (pesquisa larvaria) y adultos de anofelinos (hembras intentando picar a humanos, trapeo con cebo animal dentro de una cortina, búsqueda de hembras en corrales y trapeo con luz UV) representativos de 129 localidades, distribuidas geográficamente en los siguientes estados del territorio nacional: 17 en Guerrero., 43 en Oaxaca, 67 en Chiapas, 1 en el Distrito Federal, y 1 en el Estado de México (Tabla 3).

**Tabla 3.** Lista de localidades por estado y especies colectadas por periodo de muestreo en campo.

Colecta	Localidad	Municipio	Especie
<i>CHIAPAS</i>			
2002	Acacoyagua	Acacoyagua	AEG
2002 y 2003a	Acapetahua	Acapetahua	AEG, OCP, LID
DRY	El Arenal	Acapetahua	AAL, APS
DRY y WET	Las Palmas	Acapetahua	AAL, ACR,
DRY y WET	Río Arriba	Acapetahua	AAL, APU, AVE,
2002	Arriaga	Arriaga	AEG, OCE
2002	Cacahoatán	Cacahoatán	AEG, AEA
DRY y WET	Unión Roja	Cacahoatán	APS, APU
WET	Catazaja	Catazajá	AVE
DRY y WET	Ichinton	Chamula	AHE
DRY	Puente Maculiapa	Cintalapa	APS
DRY	Rancho Santa Clara	Cintalapa	APS
DRY	Rosendo Salazar	Cintalapa	APS
2002	Escuintla	Escuintla	LID
2002	Huehuetán	Huehuetán	AEG, AEA, LID

	DRY	San Francisco de la Frontera	Huitiupan	AAL, APS
	2002	Huixtla	Huixtla	AEG
	2002	Mapastepec	Mapastepec	AEG
	DRY	Barra San Simón	Mazatán	AAL
	2002	Mazatán	Mazatán	AEG
2002 y 2003a		Metapa de Domínguez	Metapa	AEG, AEA, LID
	DRY y WET	Benemérito de las Américas	Ocosingo	AAL
	DRY y WET	Frontera Corozal	Ocosingo	AAL, APS, AVE
	DRY y WET	Ixcán	Ocosingo	AAL, AAP, AAR, APS, AVE
	DRY	López Mateos	Ocosingo	ADA
	DRY	Peña Blanca	Ocosingo	AAL, ADA
	DRY y WET	Quirínhuicharo	Ocosingo	AAL
	WET	Rancho ID-Km 181	Ocosingo	AAL
	DRY	Palenque	Palenque	AAL
	DRY	Rancho Chenique	Palenque	AAL
	2002	Pijijiapan	Pijijiapan	AEG
	WET	Cascadas de Misol-ha	Salto de agua	AAR
	DRY y WET	San Cristobal de las Casas	San Cristóbal de las Casas	AHE
	2002	Ciudad Hidalgo	Suchiate	AEG, AEA, LID
	DRY	Cauhtémoc	Suchiate	AAL, APS
	DRY y WET	El Gancho	Suchiate	AAL, APS, APU, AVE
	DRY y WET	Miguel Alemán	Suchiate	AAL, APS
	DRY y WET	Nueva Independencia	Suchiate	AAL, APU, AVE
	WET	El Retiro	Tapachula	APS
2002 y 2003a		Fraccionamiento Galaxias	Tapachula	AEG, AEA, OCP
	DRY y WET	La Boquilla	Tapachula	AAL, AAP, APS
	DRY	Manacal	Tapachula	APS
	WET	Nuevo Chespal	Tapachula	AEI
	WET	Plan las Palmas	Tapachula	APS
	2002	Puerto Madero	Tapachula	AEG, AEA
		Tapachula de Córdoba y		
2002 y 2003a		Ordóñez	Tapachula	AEG, AEA, LID
	DRY y WET	Belen de Teopisca	Teopisca	AHE, APS
	WET	El Rosario	Tonalá	APS
	WET	Entonque a El Naranjo	Tonalá	AAL
	DRY	Fracción Tiltepec	Tonalá	AAL, APS
	DRY	Laguna El Rosario	Tonalá	APS
	WET	Puente Río Flor	Tonalá	APS
	WET	Rancho Santa Fé	Tonalá	AAR, APS
	2002	Tonalá	Tonalá	AEG
	DRY y WET	Benito Juárez	La Trinitaria	AAL, AAR, ACR, AFR, AHE, APS, APU
	DRY	Dos Lagunas	La Trinitaria	APS
	DRY y WET	Laguna Bosque Azul	La Trinitaria	ACR, AHE, APS
	WET	Laguna Esmeralda	La Trinitaria	ACR, AHE, APS
	DRY y WET	Lagunas de Montebello-Aula ecológica	La Trinitaria	AHE, APS
	WET	Tzisco	La Trinitaria	ACR, AHE, APS
	2002	Talismán	Tuxtla Chico	AEG, AEA, LID
	2002	Tuxtla Chico	Tuxtla Chico	AEA
	2002	Tuzantán	Tuzantán	AEG

	WET	Chiquihuites	Unión Juárez	APA
	DRY	Talquian	Unión Juárez	AHE
	2002	Unión Juárez	Unión Juárez	OCE
	DRY y WET	Zinacantán	Zinacantán	AHE, APS
<i>DISTRITO FEDERAL</i>				
	2003	Xochimilco	Xochimilco	AAZ
<i>ESTADO DE MÉXICO</i>				
	2003	Canal de la Compañía	Nezahualcoyotl	OCT, CXE, CUI
<i>GUERRERO</i>				
	DRY	Atlixnac	Atlixnac	APS
	DRY y WET	Alcholoa	Atoyac de Alvarez	APS
	WET	Acatlán	Chilapa de Alvarez	APS
	WET	Zoquiapan	Chilapa de Alvarez	APS
	WET	San Isidro	Coyuca de Benítez	APS
	WET	Cañada de Huapa	Huitzuc de los Figueroa	APS
	DRY	Poliutla	Huitzuc de los Figueroa	APS
	DRY	Presa Topula	Huitzuc de los Figueroa	APS
	DRY	Ixtapa-Zihuatanejo	José Azueta	AAL, APS
	DRY	Playa La Ropa	José Azueta	AAL, APS
	DRY	Puente Las Vigas	San Marcos	AAL, APS
	DRY	Puente El Tuzal	Tecpan de Galeana	APS
	WET	Tecpan de Galeana	Tecpan de Galeana	APS
	DRY	El Crustel	Teloloapan	APS
	DRY y WET	Paso de Iguala-Presa Valerio		
	DRY y WET	Trujano	Tepecoacuilco de Trujano	AAL, APS
	DRY y WET	San Vicente Palapa	Tepecoacuilco de Trujano	AAL, APS
	DRY	El Tanque	Tlapehuala	APS
<i>OAXACA</i>				
	DRY y WET	Río Perros	Ciudad Ixtepec	AAL, APS
	WET y 2003	Guelatao de Juárez-Gravera	Guelatao de Juárez	AFR, APS
		Guelatao de Juárez-Laguna		
	DRY y WET	Encantada	Guelatao de Juárez	AFR, APS
	WET	Colonia El Carmen	Juchitán de Zaragoza	AAL
	DRY	Puente Los Caporales	Juchitán de Zaragoza	AAL
	DRY y WET	Rancho Lugarda	Juchitán de Zaragoza	APS
	WET	El Salado	Magdalena Tequisistlán	APS
	DRY, WET y			
	2003	Magdalena Tequisistlan	Magdalena Tequisistlán	AFR, APS
	DRY	San Dionisio	Ocotlán de Morelos	APS
	WET	Boca del Río	Salina Cruz	AAL
	WET	La Ventosa	Salina Cruz	AAL
	DRY y WET	Puente Carrizal	Salina Cruz	AAL, AFR, APS
	DRY	Puente Las Tejas	Salina Cruz	APS
	WET	Candelaria	San Carlos Yautepec	APS
	DRY y WET	San Carlos Yautepec	San Carlos Yautepec	APS
	WET	San Isidro Manteca	San Carlos Yautepec	APS
	DRY	San Bernardo	San Juan Bautista Valle Nacional	APS
	DRY	San Juan Chicomezuchitl	San Juan Chicomezuchil	APS
	DRY y WET	San Miguel Ejutla	San Miguel Ejutla	APS
	DRY, WET y	San Pablo Villa de Mitla	San Pablo Villa de Mitla	AFR, APS

2003			
		San Pedro Mixtepec - Distr.	
DRY	Bajos de Chila	22 -	APS
DRY	Chepilme	San Pedro Pochutla	APS
DRY	San José Chacalapa	San Pedro Pochutla	APS
DRY	San Miguel Figueroa	San Pedro Pochutla	APS
WET	21 de Marzo	San Pedro Tapanatepec	AAL, APS
WET	Buenavista-Santa Cecilia	San Pedro Tapanatepec	AAL
WET	San José de Gracia	San Pedro Totolapa	AFR, APS
WET	San Pedro Totolapa	San Pedro Totolapa	APS
DRY	Km 176.5	Santa Catarina Ixtepeji	AFR, APS
DRY	Aguaje de Danta	Santa María Colotepec	AFR, APS
DRY	Junta Potrero	Santa María Colotepec	APS
		Santa María Jalapa del	
WET	Km 211	Marqués	APS
DRY	Rancho Santo Domingo	Santa María Xadani	AAL, APS
DRY	Rancho Tres Corazones	Santa María Xadani	AAL, APS
WET	Santa María Xadani	Santa María Xadani	AAL
DRY y WET	Puente Zaachulo	Santiago Astata	AFR, APS
DRY y WET	Santiago Astata	Santiago Astata	AFR, APS
	DRY	Puente Río Verde II	Santiago Jamiltepec
			AAL, APS
DRY y WET	Puente Niltepec	Santiago Niltepec	AAL, APS
	WET	Rancho La Fortuna	Santo Domingo Tehuantepec
			AAL
	DRY	Santo Domingo Tehuantepec	Santo Domingo Tehuantepec
			APS
	WET	Puente Zanatepec	Santo Domingo Zanatepec
			APS
DRY y WET	Rancho Las Delicias	Santo Domingo Zanatepec	AAL, APS

Al final, se acumularon 172 días efectivos de muestreo en campo, tiempo durante el cual se colectaron 21 especies taxonómicas pertenecientes a 6 géneros y 8 subgéneros de mosquitos, según el Catálogo Sistemático de Culicidae (WRBU, 2001).

## Actividades de Laboratorio

### *Taxonomía Clásica*

Las exuvias de los estados inmaduros (larvas de IV estadio y pupas) fueron montadas y preservadas permanentemente en portaobjetos para llevar a cabo la determinación taxonómica de los ejemplares a nivel de especie por la vía clásica. Por otra parte, los adultos colectados en campo y los emergidos en el laboratorio se montaron en alfileres entomológicos para facilitar la manipulación de los ejemplares durante la observación directa de las estructuras morfológicas durante el proceso de identificación.

Al término del trabajo taxonómico con los mosquitos colectados en campo, se obtuvo una lista general en la cual se incluyeron 6 géneros, 8 subgéneros y 21 especies de culícidos. En la Tabla 4 se presenta la clasificación a la que pertenecen los ejemplares identificados por el método tradicional.

La presencia de las especies por entidad federativa estuvo conformada de la siguiente manera: en Chiapas se encontraron 12 *Anopheles*, 2 *Aedes*, 2 *Ochlerotatus* y 1 *Limatus*; en Guerrero fueron colectados 2 *Anopheles*; en Oaxaca fueron encontrados 3 *Anopheles*; en el Distrito Federal 1 *Anopheles* y en el Estado de México 1 *Culex*, 1 *Culiseta* y 1 *Ochlerotatus* (Tabla 5).

Con respecto a la diversidad y distribución geográfica de los mosquitos del género *Anopheles* en el sur de México, se confirmó la presencia de 2 especies en Guerrero, 3 especies en Oaxaca y 12 especies en Chiapas (Tablas 3). Por otra parte, algunos de los hallazgos interesantes derivados del proyecto, incluyeron la primera evidencia de *Aedes albopictus* en Tapachula, Chiapas, sur de México (2002) y su dispersión territorial sobre el plano costero del Océano Pacífico; el encuentro nuevamente de *Ochlerotatus epactius*, *Ochlerotatus podographicus* y *Limatus durhamii* en el estado de Chiapas; la presencia de *Anopheles franciscanus* en los estados de Oaxaca y Chiapas, la cual es una especie representativa del norte de México, la colecta de *Culex erythrothorax*, especie reportada con anterioridad para el área de Xochimilco y la costa de California en EUA; la captura inesperada en el D. F. de mosquitos exóticos de la especie asiática de *Ochlerotatus togoi* (por confirmar) cuya distribución en América esta limitada al estado canadiense de Columbia Británica y; por último el sorpresivo reencuentro en el D. F. de *Anopheles aztecus*, especie endémica del Valle de México que durante muchos años estuvo considerada entre los principales vectores de paludismo (Tabla 5).

**Tabla 5.** Presencia de las especies colectadas durante los muestreos entomológicos de los años 2001-2003 en diferentes entidades federativas de México.

Especie	Estado				
	Guerrero	Oaxaca	Chiapas	D. F.	Edo. de México
<i>Ae. aegypti</i> Linneaus, 1762			√		
<i>Ae. albopictus</i> Skuse, 1895			√		
<i>An. albimanus</i> Wiedemann, 1820	√	√	√		
<i>An. apicimacula</i> , Dyar & Knab, 1906			√		
<i>An. argyritarsis</i> Robineau-Desvoidy, 1827			√		
<i>An. crucians</i> Wiedemann, 1828			√		
<i>An. aztecus</i> Hoffmann, 1935				√	
<i>An. darlingi</i> Root, 1926			√		
<i>An. eiseni</i> Coquillett, 1902			√		
<i>An. franciscanus</i> McCracken, 1904		√	√		
<i>An. hectoris</i> Giaquinto-Mira, 1931			√		
<i>An. parapunctipennis</i> Martini, 1932			√		
<i>An. pseudopunctipennis</i> Theobald, 1901	√	√	√		
<i>An. punctimacula</i> Dyar & Knab, 1906			√		
<i>An. vestitipennis</i> Dyar & Knab, 1906			√		
<i>Cu. inornata</i> Willinston, 1893					√
<i>Cx. erythrothorax</i> Dyar, 1907					√
<i>Li. durhamii</i> Theobald, 1901			√		
<i>Oc. epactius</i> Dyar & Knab, 1908			√		
<i>Oc. podographicus</i> Dyar & Knab, 1906			√		
<i>Oc. togoi</i> Theobald, 1907					√
<b>Total</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>17</b>	<b>1</b>	<b>3</b>

Entre los mosquitos observados e identificados por la vía clásica, se encontraron algunos especímenes que se diferenciaron como fenotipos taxonómicos notables, es decir, presentaron características morfológicas intermedias entre *Anopheles pseudopunctipennis* y *Anopheles franciscanus* al momento de llevar a cabo la determinación a nivel de especie con las claves taxonómicas de Wilkerson y Strickman (1990). Los fenotipos fueron denominados como variante 1 y variante 2, mismos que se encontraron distribuidos geográficamente en diferentes sitios de los estados de Oaxaca y Chiapa.

Actualmente, algunos ejemplares de estas 2 especies y 2 variantes han servido para realizar análisis comparativos a nivel molecular para la caracterización genética de las 4 poblaciones en colaboración con la Dra. Teresa López Ordóñez, especialista en biología molecular del Centro de Investigación de Paludismo, como primer avance para definir los estudios entomológicos y taxonómicos requeridos en el futuro.

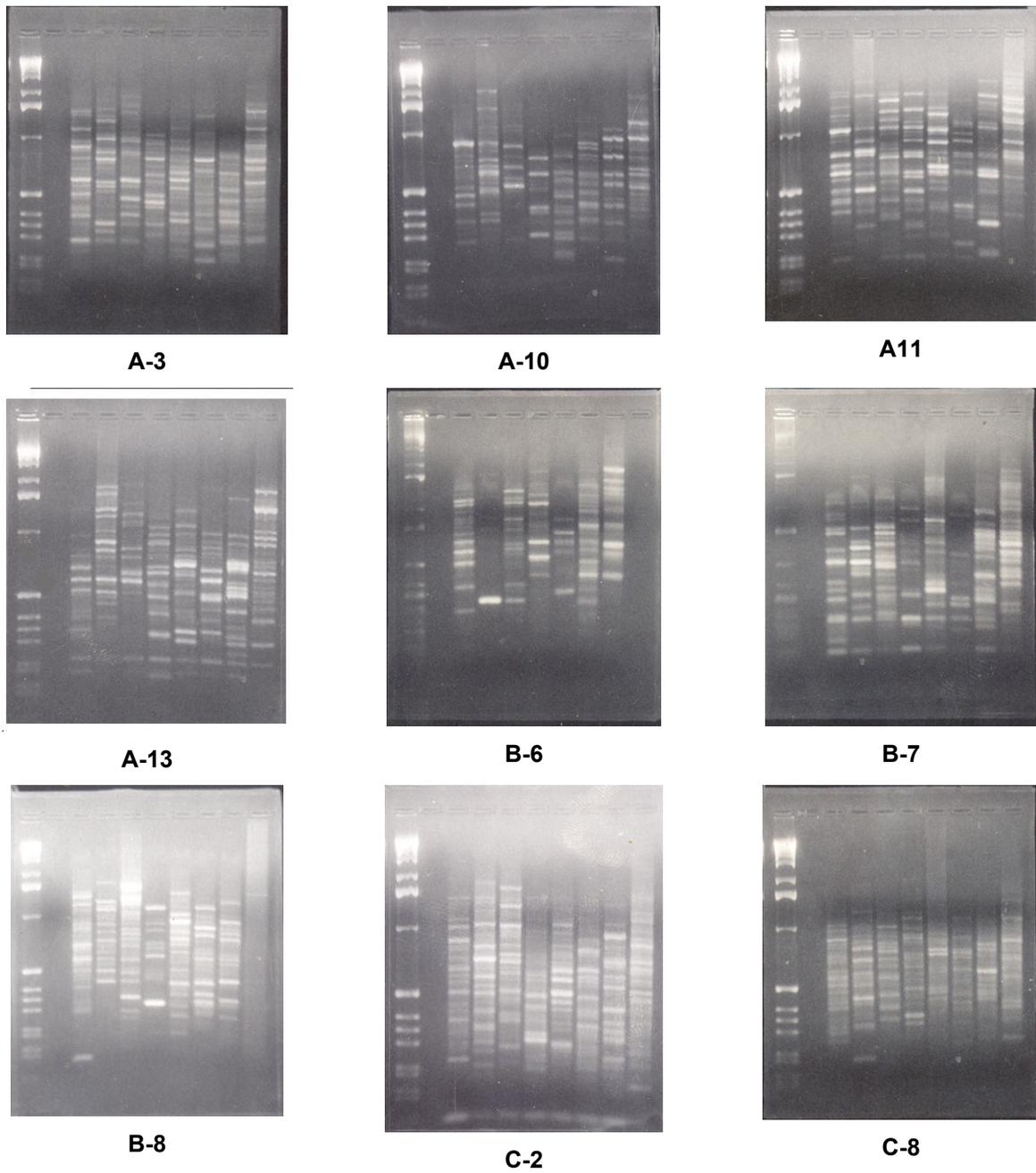
## Taxonomía Molecular

Para el análisis genético de los mosquitos *Anopheles*, se utilizaron individuos de las diferentes especies colectadas en el sur de México. El aislamiento del DNA genómico se realizó de manera individual, posteriormente se llevó a cabo el tamizaje de 60 iniciadores comerciales de 10 bases de longitud (kits A, B y C de Operon Technologies, Co.). Las pruebas moleculares consistieron en la amplificación aleatoria del DNA polimórfico por reacción en cadena de la polimerasa (RAPD-PCR). Los productos resultantes se visualizaron mediante la electroforesis horizontal en geles de azarosa teñidos con bromuro de etidio. La identificación de los marcadores RAPD-PCR dependió de la inspección visual de acuerdo al método de agrupación alélica (Narang *et al.*, 1989) y los datos moleculares se procesaron con el paquete PHYlogeny Inference Package (PHYLIP) para el cálculo de los índices de similitud (RAPDPLOT), distancias genéticas, construcción de dendrogramas y análisis bootstrap (RAPDDIST, NEIGHBOR y CONSENSE) y estimación de los valores de Fst y Nm (RAPDFST).

Durante la selección de los iniciadores se utilizaron 12 mosquitos silvestres de 4 especies diferentes, resultando aceptables los patrones de bandas polimórficas de 9 secuencias arbitrarias comerciales: A-03, A-10, A-11, A-13, B-06, B-07, B-08, C-02 y C-08 (Tabla 6 y Figura 1).

**Tabla 6.** Iniciadores seleccionados para las pruebas moleculares RAPD-PCR con DNA de mosquitos anofelinos del sur de México.

Oligonucleótido	Secuencia 5' - 3'	No. de fragmentos
A-3	AGTCAGCCAC	7
A-10	GTGATCGCAG	7
A-11	CAATCGCCGT	5
A-13	CAGCACCCAC	12
B-6	TGCTCTGCCC	9
B-7	GGTGACGCAG	7
B-8	GTCCACACGG	7
C-2	GTGAGGCGTC	8
C-8	TGGACCGGTG	15



**Figura 1.** Perfiles moleculares del DNA de las especies de Anopheles con los diferentes iniciadores arbitrarios comerciales.

El análisis genético final incluyó 24 mosquitos, 3 individuos por cada una de las siguientes especies: *An. albimanus* (AAL), *An. crucians* (ACR), *An. eiseni* (AEI), *An. hectoris* (AHE), *An. parapunctipennis* (APA), *An. pseudopunctipennis* (APS), *An. punctimacula* (APU) y *An. vestitipennis* (AVE). Con los 83 marcadores moleculares seleccionados se logró la diferenciación genética de las 8 especies estudiadas (Figura 2, Tabla 7 Figura 3).

```

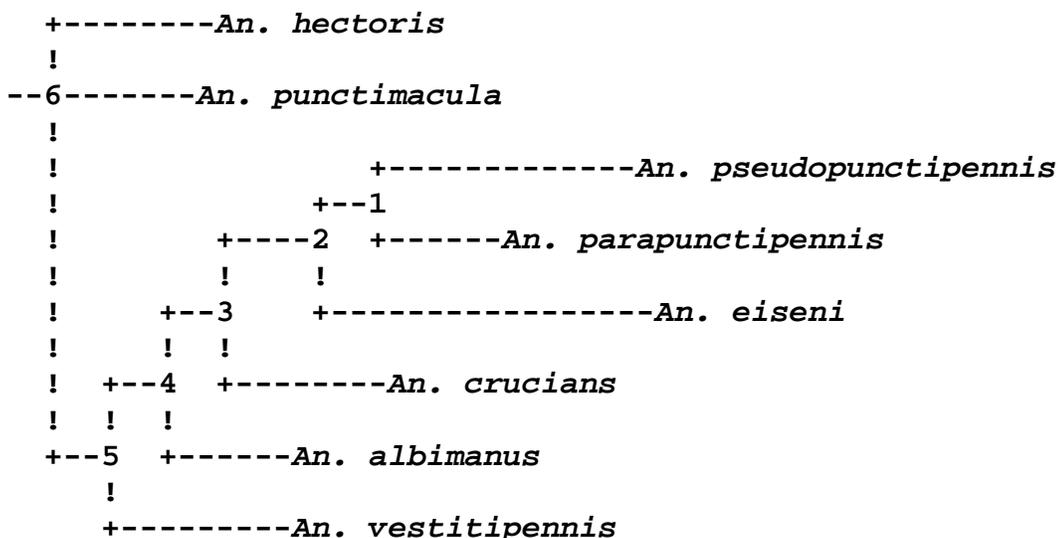
+-----AHE1
+-14
! ! +--AHE2
+-18 +-13
! ! +----AHE3
! !
+-19 +-----AAL1
! !
! ! +--AVE1
! ! +--5
! +-17 +--AVE3
+-20 !
! ! +-----AVE2
! !
! ! +----APU1
! ! +--8
+-21 +--9 +----APU2
! ! !
! ! +----APU3
! !
! ! +----ACR1
! +-12
! ! +-ACR2
! +--7
! +----ACR3
!
! +----AAL2
-22-10
! +----AAL3
!
! +--APS1
! +--3
! +-4 +-APS2
! ! !
! ! +-----APS3
! !
! ! +-----APA1
+-16 +--6
! ! +-----APA3
! +-11
! ! ! +--AEI1
! ! +--2
+-15 ! +--AEI2
! +--1
! +--AEI3
!
+-----APA2

```

**Figura 2.** Dendrograma de la relación genética entre los individuos de las diferentes especies de *Anopheles* de acuerdo al índice de similitud.

**Tabla 7.** Matriz de distancias genéticas entre las 8 especies de mosquitos del género *Anopheles* del sur de México analizados con marcadores moleculares RAPD-PCR.

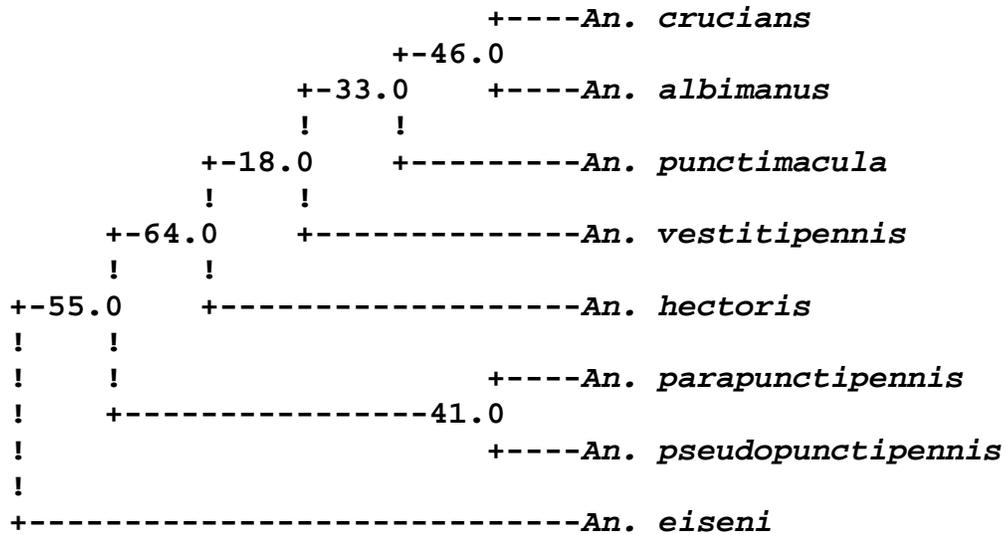
Especie	APS	APA	AHE	AVE	ACR	APU	AAL	AEI
APS	.0000							
APA	.3531	.0000						
AHE	.5093	.3890	.0000					
AVE	.4856	.3613	.3114	.0000				
ACR	.4624	.4226	.3965	.3386	.0000			
APU	.5356	.4230	.2739	.3063	.2947	.0000		
AAL	.5522	.4014	.2689	.2915	.2500	.2630	.0000	
AEI	.6022	.4270	.4959	.6737	.5170	.5239	.5434	.0000



**Figura 3.** Dendrograma de la relación genética entre las diferentes especies de mosquitos del género *Anopheles* analizadas con marcadores RAPD-PCR con base en los valores de distancia genética de Nei (1972).

Para validar la consistencia de los agrupamientos y relaciones de parentesco interespecíficos de los mosquitos *Anopheles* descritas por el dendrograma anterior, se realizó el análisis de “bootstrapping” que consistió en el remuestreo aleatorio y automático de la base de datos para generar 100 series de datos o pseudo-réplicas. El resultado fue el mismo número (100) de matrices como series analizadas. Simultáneamente, cada una de las matrices derivadas de este procesamiento fue colapsada y

presentada en su correspondiente dendrograma. Al final, se llevó a cabo un consenso de todos los dendrogramas construidos lo que permitió determinar el nivel de soporte que confieren los datos moleculares entre las especies representado en un dendrograma final de aprobación (Figura 4). Las consistencias con valores <90% sugieren fuerte soporte para un agrupamiento o relación determinada, mientras que los valores más bajos sugieren la necesidad de adicionar más datos para apoyar una asociación en particular.



**Figura 4.** Dendrograma resultante del consenso del análisis bootstrap o de consistencia.

En conclusión, estos resultados corresponden al primer avance en taxonomía molecular con mosquitos mexicanos del género *Anopheles*. También se ha considerado la recomendación de la técnica RAPD-PCR como una herramienta adicional y complementaria en la solución de problemas taxonómicos con ejemplares dañados o de colecciones científicas, además se establecieron las bases para seguir ampliando las investigaciones sobre este tópico con otros grupos de insectos transmisores de enfermedades.

## Base de Datos

Recientemente, se concluyó la incorporación de los registros curatoriales a la base de datos del proyecto. Con la sistematización de la colección científica de mosquitos del Centro de Investigación de Paludismo (CIP) se ha puesto de manifiesto el interés por ampliar los conocimientos sobre la entomofauna del sur de México, especialmente de las especies de la familia Culicidae del orden Diptera, que se encuentran distribuidas en esta región del país. A pesar de la existencia de algunas colecciones entomológicas establecidas en instituciones académicas de los estados de Guerrero, Oaxaca y Chiapas, esta es la primera colección de referencia especializada en mosquitos de importancia médica y veterinaria según los resultados de la encuesta del “Inventario y Diagnóstico de la Actividad Taxonómica en México” (Llorente *et al.*, 1999).

La Tabla 5 contiene las especies incluidas en la base de datos de la colección biológica del CIP y su presencia en los diferentes estados del país.

En términos numéricos, la base de datos esta integrada por 757 registros curatoriales, en donde se encuentran incluidas 21 especies de mosquitos representativas de 6 géneros y 8 subgéneros de la familia Culicidae del orden Diptera (WRBU, 2001). Del total de unidades curatoriales, 405 corresponden a registros colectados en campo durante el desarrollo del proyecto (2001-2003), 51 registros son ejemplares colectados entre los años 1987-2000 y 301 registros fueron reportes de la bibliografía (Tabla 8). De los registros derivados del muestreo entomológico de campo (405), 272 pertenecen al estado de Chiapas, 37 a Guerrero, 92 a Oaxaca, 1 al D. F. y 3 al Estado de México. Todos los ejemplares de las colectas previas al proyecto (51) fueron capturados en localidades del estado de Chiapas. Los registros bibliográficos (301) comprendieron a 8 estados de la República Mexicana con 289 registros para Chiapas, 1 de Colima, 1 de Guerrero, 1 de Jalisco, 1 de Nayarit, 3 de Nuevo León, 1 de Oaxaca y 4 de Sinaloa.

**Tabla 7.** Resumen de registros curatoriales contenidos en la base de datos del proyecto V019.

Tipo de registro	Unidades	Estados	Especies
Ejemplares de las colectas previas al estudio (1987-2000)	51	Chis.	2
Ejemplares colectados durante el proyecto (2001-2003)	405	Chis., Gro., Oax., D. F., Edo. Mex.	21
Reportes en la bibliografía	301	Chis., Col., Gro., Jal., Nay., N. L., Oax., Sin.	6
<b>Total</b>	<b>757</b>	<b>8</b>	<b>21</b>

## Conclusiones

1. Se colectaron mosquitos anofelinos en 129 localidades, distribuidas geográficamente en los estados del Guerrero, Oaxaca, Chiapas, Distrito Federal y Estado de México.
2. Se conformó una lista general que incluyó 6 géneros, 8 subgéneros y 21 especies de culícidos endémicos y exóticos.
3. Resultando aceptables los patrones de bandas polimórficas de 9 secuencias arbitrarias comerciales que produjeron 83 marcadores moleculares RAP-PCR con los cuales se logró la diferenciación genética de las 8 especies analizadas.
4. Se integró con 757 registros curatoriales la primera colección biológica sistematizada sobre la entomofauna del sur de México, especializada en las especies de la familia Culicidae del orden Diptera, en el Centro de Investigación de Paludismo de la Ciudad de Tapachula de Córdoba y Ordóñez, Chiapas.

## Referencias

Crosskey, R. W. 1988. Old tools and new taxonomic problems in bloodsucking insects. *In* Biosystematic of haematophagous insects. M. W. Service (Ed.). Systematics Association Special Volume No. 37. Clarendon Press, New York, USA.

Darsie, R. F. Jr. 1996. A Survey and bibliography of the mosquito fauna of Mexico (Diptera:Culicidae). *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 12:298-306.

Folsom, J. W. and R. A. Wardle. 1934. Entomology, its ecological aspects. Philadelphia, P. Blakinston & Son Co., 605 pp.

Harwood, R. F. y M. T. James. 1993. Entomología médica y veterinaria. Noriega Editores, México, D. F.

Lehane, M. J. 1996. Biology of the blood-sucking insects. First edition. Chapman & Hall. London, U. K.

Llorente Bousquets, J., P. Koleff Osorio, H. Benítez Díaz y L. Lara Morales. 1999. Síntesis del estado de las colecciones biológicas mexicanas. Resultados de la encuesta "Inventario y Diagnóstico de la Actividad Taxonómica en México" 1996-1998. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México.

Narang, S. K., P. E. Kaiser and J. A. Seawright. 1989. Identification of species D a new member of the *Anopheles quadrimaculatus* complex: a biomedical key. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 5:317-324.

Nei, M. 1972. Genetic Distance between populations. *Am. Natur.* 106:283-292.

Vargas, L. y A. Martínez-Palacios. 1956. Anofelinos mexicanos, taxonomía y distribución. Comisión Nacional para la Erradicación del Paludismo. Secretaria de Salubridad y Asistencia, México, D. F.

Vargas L. 1976. Nueva lista de especies de *Anopheles* en México (Culicidae:Diptera). *Rev. Inv. Salud Pública* 36:87-91.

Walter Reed Biosystematics Unit (WRBU). 2001 Systematic Catalog of Culicidae. <http://www.mosquitocatalog.org/entrypage.asp> (fecha de consulta 31/01/02).

UNICEF-UNDP-World Bank-WHO. 2004. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR) <http://www.who.int/tdr/> (fecha de consulta 25/03/04).

Wilkerson, R. C. and D. Strickman. 1990. Illustrated key to the female anopheline mosquitoes of Central America and Mexico. J. Am. Mosq. Control Assoc. 6:7-34.

Wilkerson, R. C., D. Strickman, I. Fernández-Salas, S. Ibáñez-Bernal y T. R. Liwak. 1993. Clave ilustrada para la identificación de las hembras de mosquitos anofelinos de México y América Central. Centro de Investigación de Paludismo, Secretaria de Salud, México.