

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA**

**TAXONOMIA MOLECULAR DOS COMPLEXOS *Anopheles oswaldoi* (PERYASSÚ,
1922) E *Anopheles konderi* GALVÃO & DAMASCENO (1942) (DIPTERA:
CULICIDAE: ANOPHELINAE) DA AMAZÔNIA BRASILEIRA**

JOSÉ FERREIRA SARAIVA

MANAUS, AMAZONAS

02/2015

JOSÉ FERREIRA SARAIVA

TAXONOMIA MOLECULAR DOS COMPLEXOS *Anopheles oswaldoi* (PERYASSÚ, 1922) E *Anopheles konderi* GALVÃO & DAMASCENO (1942) (DIPTERA: CULICIDAE: ANOPHELINAE) DA AMAZÔNIA BRASILEIRA

Orientadora: Dra. Vera Margarete Scarpassa

Co-orientador: Dr. Raimundo Nonato Picanço Souto

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Entomologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de concentração: Entomologia.

MANAUS, AMAZONAS

02/2015

FICHA CATALOGRÁFICA

S243 Saraiva, José Ferreira
 Taxonomia molecular dos complexos *Anopheles oswaldoi* (Peryassú, 1922) e *Anopheles konderi* Galvão & Damasceno (1942) (Diptera: Culicidae: Anophelinae) da Amazônia brasileira / José Ferreira Saraiva. --- Manaus: [s.n.], 2015.
 71f.: il. Color.

Dissertação (Mestrado) --- INPA, Manaus, 2015.
 Orientador: Dra. Vera Margarete Scarpassa.
 Co-orientador: Dr. Raimundo Nonato Picanço Souto.
 Área de concentração: Entomologia.

1. Complexo de espécies crípticas. 2. Vetores da malária I. Título.

CDD 616.9362

SINOPSE

Estudou-se a taxonomia molecular, relações evolutivas e distribuição geográfica dos complexos *Anopheles (Nyssorhynchus) oswaldoi* (Peryassú, 1922) e *Anopheles (Nyssorhynchus) konderi* Galvão & Damasceno (1942) (Diptera: Culicidae) da Amazônia brasileira. As inferências filogenéticas revelaram suporte para cinco espécies, três destas ainda não descritas. O complexo *A. konderi* s.l. mostrou ser parafilético reforçando a hipótese de um único complexo, portanto, denominado de complexo *Oswaldoi-Konderi*.

Palavras-chave: Especiação, *Anopheles oswaldoi*, *Anopheles konderi*, Amazônia brasileira, complexo de espécies crípticas e vetores de malária.

Keywords: Speciation, *Anopheles oswaldoi*, *Anopheles konderi*, Brazilian Amazon, cryptic species complex and malaria vectors.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Aluízio Araújo Saraiva e Margarida M^a. Ferreira Cruz, por darem todo suporte e prioridade na minha educação e por me deixarem ir à busca de meus sonhos.

À minha esposa Dayse S. S. Ferreira por todo apoio e confiança, que me deram autoestima para continuar a estudar.

AGRADECIMENTOS

À coordenação de pessoal de nível superior - CAPES, pela concessão da bolsa de pós-graduação.

Ao Programa de Pós-graduação em Entomologia pela oportunidade de cursar o mestrado.

À Dra. Vera Margarete Scarpassa pela orientação, ensinamentos científicos, éticos e por ser uma pesquisadora exemplar.

Ao Dr. Raimundo Nonato Picanço Souto pela Co-orientação, apoio e principalmente pela amizade que cultivamos desde minha graduação.

Sou muito grato a todos os professores do PPGENT, por todo aprendizado repassado. À professora Dra. Daniela Maeda Takyia pelo curso de sistemática molecular, muito bem-vindo na fase final do mestrado.

À minha esposa Dayse Swelen, a quem devo este mestrado, primeiro por ter me inscrito no processo seletivo e segundo por todo apoio para concluir esta fase.

Aos meus pais Aluísio Araújo Saraiva e Margarida Maria Ferreira Cruz que não mediram esforços para me educar.

Sou muito grato aos meus amigos Dr. Ronildo e Tio Gersonval, pela valiosa ajuda nas coletas de campo e pelo material concedido de outras localidades para este trabalho.

Agradeço a doutoranda Romina Batista por ter me ajudado nas análises de Inferência Bayesiana e a disposição em ajudar a interpretar os dados.

Aos meus amigos Anderson Penna e Ricardo Marcelo 'Cadinho' pelo apoio nas coletas de campo no Amapá. A Adrya, Dayane e Saulo pela ajuda na realização das atividades de laboratório.

Ao 'Seu Fininho' pelo acolhimento em sua casa e ao Cleyton pela ajuda no deslocamento para campo no município de Porto Grande.

Aos amigos com quem dividi o apartamento durante o mestrado; Elvis, Nonatinho, Pedroso e Ralf, pelas conversas animadas e trocas de idéias em pesquisa. Aos amigos do café; Ahana, Gil, Marcinho e Veracilda, sejam pela companhia agradável ou pelas conversas descontraídas e amistosas tão necessárias em alguns momentos.

À turma de Entomologia 2013, em ordem alfabética: André, Bruno, Dayse, Gustavo, Juliana, Marcus, Thonson e Vagner. E a todos que contribuíram de alguma forma para este trabalho.

Muito obrigado!

EPIGRAFE

‘Há uma grandiosidade nesta perspectiva da vida com os seus vários poderes, que foi originalmente dada a poucas formas de vida ou a uma só, e que – enquanto este planeta anda à volta de acordo com a lei fixa da gravidade – a partir de um princípio tão simples, infinitas formas de grande beleza e muito maravilhosas evoluíram e estão a evoluir’.

Sir. Charles R. Darwin, 1859.

Sobre a Origem das Espécies

FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho recebeu financiamento das instituições e projetos listados abaixo:

- 1) Projeto Institucional-INPA/MCTI- RJ 12311 "Biologia e Ecologia de Insetos da Amazônia"
- 2) FAPEAM – “Genética evolutiva do vetor da malária *Anopheles nuneztovari* sensu lato”
Edital Número 021/2011 – UNIVERSAL-AMAZONAS
- 3) Projeto Centro de Estudos Integrados da Biodiversidade Amazônica-CENBAM
Edital MCT/CNPq/FNDCT /CAPES/FAPEMIG/FAPERJ/FAPESP - Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia Nº 015/2008. Processo número: nº 722069/2009
- 4) Projeto CNPq- Br-Bol – Rede Brasileira de Identificação Molecular da Biodiversidade
Subprojeto - Identificação Molecular de Parasitos e Vetores do Brasil
- 5) PRÓ-EQUIPAMENTOS-CAPES

RESUMO

A identificação correta das espécies de anofelinos é de fundamental importância para o planejamento dos programas de controle dos vetores de malária. A escassez de estudos sobre a distribuição geográfica e a dinâmica de cada vetor na transmissão da malária limita o completo entendimento da transmissão desta doença na Amazônia brasileira. As espécies *Anopheles oswaldoi* e *A. konderi* constituem complexos de espécies crípticas, com distribuição geográfica em países da América do Sul, sendo a primeira incriminada como vetor de malária humana na Colômbia e em algumas localidades da Amazônia brasileira. O presente estudo teve como objetivo identificar molecularmente e inferir as relações evolutivas das espécies dos complexos *A. oswaldoi* e *A. konderi*, com o emprego de dois marcadores moleculares, a região do DNA *barcode* (gene *COI*) do DNA mitocondrial e o segundo espaçador interno transcrito (*ITS2*) do DNA ribossomal. As sequências de *COI* (n=83) e de *ITS2* (n=27) foram obtidas de 18 localidades procedentes de cinco Estados da Amazônia brasileira: Acre (3), Amapá (7), Amazonas (5), Pará (1) e Rondônia (2). As sequências consenso de *COI* apresentaram comprimento de 663 pb que geraram 43 haplótipos e seis redes não conectadas sugerindo cinco espécies distintas, enquanto para o *ITS2* foram identificados dez genótipos. As sequências de *ITS2* variaram em comprimento de 441 pb a 511 pb entre as espécies. *Anopheles oswaldoi* B foi à espécie que apresentou maior número de mutações, com quatro transversões, uma transição e uma deleção. Os valores médios de distâncias genéticas intraespecíficas variaram de 0,007 a 0,014 e as distâncias genéticas médias interespecíficas variaram de 0,038 a 0,062. As análises filogenéticas separadas e concatenadas usando os respectivos algoritmos e modelos evolutivos Neighbor Joining (NJ - *K2P*), Máxima Verossimilhança (MV - HKY) e Inferência Bayesiana (IB - HKY/GTR), resultaram em topologias com moderado a alto suporte para os clados. As análises de NJ e MV apresentaram melhores resoluções, com dois maiores clados e um clado mais basal. Um dos clados foi representado por *A. oswaldoi* s.s. e *A. oswaldoi* B, o outro agrupou *A. konderi* e *A. sp. nr. konderi*. *A. oswaldoi* A formou um clado separado e basal. Todos os clados e subclados tiveram elevado valores de suporte de *bootstrap* e probabilidade posterior e sugerem monofilia recíproca. A árvore de espécie por meio de IB no **BEAST* agrupou *A. oswaldoi* A e *A. konderi* como clados relacionados, indicando parafilia do complexo *A. konderi*. Tanto as análises filogenéticas, quanto as distâncias genéticas sugeriram a presença de prováveis linhagens genéticas especialmente em *A. oswaldoi* A. As análises de inferências filogenéticas sugerem que as cinco espécies podem ser agrupadas em um mesmo complexo. Os estudos de distribuição geográfica associados com retrospecto de *A. oswaldoi* s.l. infectado sugerem que *A. oswaldoi* B pode ser o vetor de malária do complexo no extremo norte da região Amazônica brasileira.

Palavras-chave: Especiação, *Anopheles oswaldoi*, *Anopheles konderi*, Amazônia brasileira, espécies crípticas e vetores de malária.

ABSTRACT

The correct identification of *Anopheles* species is of fundamental importance for planning the control programs of malaria vectors. The lack of studies regarding the geographical distribution and the dynamics of each vector in the transmission of malaria, limits the full understanding of the transmission of this disease in the Brazilian Amazon. *Anopheles oswaldoi* and *A. konderi* constitute a species complex with geographical distribution in countries of South America, the first being incriminated as a vector of human malaria in Colombia and in some areas of the Brazilian Amazon. This study is aimed to identify molecular and evolutionary relationships of species of complex *A. oswaldoi* and *A. konderi*, with the use of two molecular markers, the DNA barcode region (*COI* gene) of the mitochondrial DNA and the Second Internal Spacer Transcript (ITS2) of ribosomal DNA. *COI* sequences (n = 83) and ITS2 (n = 27) were obtained from 18 sites of five states in the Brazilian Amazon: Acre (3), Amapá (7), Amazonas (5), Pará (1) and Rondônia (2). The consensus sequences of *COI* exhibited a length of 663 bp which generated 43 haplotypes and five species, represented by six networks which are not connected, whereas for ITS2 marker, ten genotypes were identified. ITS2 sequences varied in length from 441 bp to 511 bp between species. *Anopheles oswaldoi* B was the species with the highest number of mutations with four transversions, a transition and a deletion. The results suggest five species for the two complexes (*A. oswaldoi* ss., *A. oswaldoi* A, *A. oswaldoi* B, *A. konderi* and *A. sp. nr. konderi*). The values of intra-specific genetic distances were 0.007 to 0.014, whereas the interspecific genetic distances were 0.038 to 0.062. The separate and concatenated phylogenetic analyses were performed using respective algorithms and evolutionary models, such as the Neighbor Joining (NJ - K2P), Maximum Likelihood (ML - HKY) and Inference Bayesian (IB - HKY / GTR), which resulted in distinct topologies. Analyses of NJ and ML showed better resolutions, with two major clades and a more basal clade. One of the clades was represented by *A. oswaldoi* ss. and *A. oswaldoi* B, the other grouped *A. konderi* and *A. sp. nr. konderi*. The *A. oswaldoi* A formed a separate and basal clade. All clades and subclades had high bootstrap support values and posterior probability, and suggest reciprocal monophyly. The tree species recovered by IB with concatenated data in **BEAST* grouped *A. oswaldoi* A and *A. konderi* as related clades, indicating paraphilia for the complex *A. konderi*. The phylogenetic analyses as well as the genetic distances values suggested the presence of probable genetic lineages, especially within *A. oswaldoi* A. The phylogenetic inferences suggested that the five species can be clustered into a single complex. The studies of infection and geographic distribution suggest that *A. oswaldoi* B can be the malaria vector in the northern Brazilian Amazon.

Keywords: Speciation, *Anopheles oswaldoi*, *Anopheles konderi*, Brazilian Amazon, cryptic species and malaria vectors.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1. Família Culicidae.....	4
2.2. Subfamília Anophelinae.....	4
2.3. Gênero <i>Anopheles</i>	5
2.4. Subgênero <i>Nyssorhynchus</i>	5
2.5. <i>Anopheles oswaldoi</i> e <i>Anopheles konderi</i>	6
2.5.1. <i>História Taxonômica</i>	6
2.5.2. <i>Distribuição geográfica</i>	8
2.5.3. <i>Importância como vetor de malária e complexo de espécies crípticas</i>	9
2.6. Marcadores moleculares na identificação de espécies crípticas.....	10
3. OBJETIVOS	13
3.1. Geral.....	13
3.2. Específicos.....	13
4.1. Locais de coletas e preparo de amostras.....	14
4.2. Análise Molecular.....	16
4.2.1. <i>Extração de DNA</i>	16
4.2.2. <i>Amplificação do gene COI</i>	16
4.2.3. <i>Amplificação do ITS2</i>	17
4.2.4. <i>Purificação do produto de PCR</i>	17
4.2.5. <i>Reação de sequenciamento</i>	17
4.2.6. <i>Alinhamento das sequências</i>	17
4.3. Análises estatísticas e filogenéticas.....	18
5. RESULTADOS	20
5.1. Análises do DNA barcode do Gene COI.....	20
5.2. Segundo Espaçador Interno Transcrito - ITS2.....	28
5.3. Análises filogenéticas.....	31
5.4. Distribuição dos complexos <i>A. oswaldoi</i> e <i>A. konderi</i>	38
6. DISCUSSÃO	41
6.1. Taxonomia molecular de <i>A. oswaldoi</i> s.l. e <i>A. konderi</i> s.l.	41
6.2. Relações filogenéticas.....	44
6.3. Tempo de divergência, distribuição e incriminação de vetor da malária.....	46
7. CONCLUSÕES.....	49
8. REFERENCIAS.....	50
APÊNDICES	72

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Áreas de ocorrência e estimativa de distribuição de *A. oswaldoi* s.l. na América do Sul. Fonte: Adaptado de Faran e Linthicum (1981)..... 8
- Figura 2.** Coleta de mosquitos em campo: a) Armadilha de Shannon e b) Coleta dos estágios imaturos..... 15
- Figura 3.** Relação das taxas de transição (Ts) e transversão (Tv) e distâncias genéticas obtidas para as sequências de *COI*..... 21
- Figura 4.** Histograma representando as distâncias genéticas intra e interespecífica para as cinco espécies candidatas dos complexos *A. oswaldoi* s.l. e *A. konderi* s.l. 26
- Figura 5.** Distribuição das espécies dos complexos *A. oswaldoi* s.l. e *A. konderi* s.l., rede de haplótipos e árvore de Neighbor Joining construídas com base em *COI*..... 27
- Figura 6.** Relação das taxas de transição (Ts) e transversão (Tv) e distância genética para as sequências de *ITS2*..... 30
- Figura 7.** Árvore de consenso estrito da máxima parcimônia (MP) de *COI*, com valores de bootstrap apresentados sobre os ramos. 32
- Figura 8.** Árvore de máxima verossimilhança (MV) de *COI*, com valores de bootstrap sobre os ramos para 2.000 pseudoréplicas analisadas..... 33
- Figura 9.** Árvore de genes inferidas por meio de Inferência Baesiana (IB) separada (*COI* e *ITS2*), utilizando os respectivos modelos evolutivos HKY + I + G e GTR + G. Os valores de probabilidade posterior estão representados sobre os ramos..... 35
- Figura 10.** Árvore de genes analisadas por meio de Inferência Baesiana (IB) com dados concatenados (*COI* + *ITS2*), utilizando modelos evolutivos distintos (*COI* = GTR + I + G e *ITS2* = GTR + G). Os valores de probabilidade posterior estão representados sobre os ramos. 36

- Figura 11.** Árvore de espécies por meio de Inferência Bayesiana com dados concatenados. Os valores de probabilidade posterior representados sobre os ramos. Análise realizada no programa **BEAST*. 37
- Figura 12** Tempo de diversificação das espécies estimado no Programa **BEAST* com dados mitocondriais (*COI* barcode) usando critério de Inferência Bayesiana e taxa de calibração de 2.3% para cada milhão de anos. 38
- Figura 13.** Estimativa das áreas de ocorrência das espécies nos complexos *A. oswaldoi* (A), *A. konderi* (B) e os pontos de simpatria identificados (C). 40

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Informações sobre as localidades de coletas de *A. oswaldoi* s.l./*A. konderi* s.l. por Estado (UF), Municípios, Localidades, Coordenadas Geográficas e Coletores..... 14
- Tabela 2.** Número de sequências de *COI* analisadas por localidade e espécie..... 21
- Tabela 3.** Distribuição dos haplótipos observados para o gene *COI* por espécie e por localidade..... 23
- Tabela 4.** Resumo das medidas de diversidade genética intraespecífica estimadas para cada espécie dos complexos *A. oswaldoi* e *A. konderi* da Amazônia brasileira..... 24
- Tabela 5.** Valores mínimos, máximos e médios de distância genética intraespecífica por meio do modelo *K2P* para o gene *COI*. 24
- Tabela 6.** Valores mínimos, máximos, médios e desvio padrão das distâncias genéticas interespecíficas calculadas por meio do modelo *K2P* para o gene *COI*. 25
- Tabela 7.** Média das distâncias entre as sequências de nucleotídeos do gene *COI* nos complexos *A. oswaldoi* e *A. konderi*, utilizando o modelo *K2P*. 25
- Tabela 8.** Distâncias genéticas calculadas entre as possíveis linhagens de *A. oswaldoi* A, *A. oswaldoi* B, *A. konderi* e *A. sp. nr. konderi*. 28
- Tabela 9.** Média das distâncias entre as sequências de nucleotídeos do gene *ITS2* nos complexos *A. oswaldoi* e *A. konderi*, utilizando o modelo *K2P*. 29
- Tabela 10.** Relação e número de genótipos do marcador molecular *ITS2* seguidos de espécies e localidades. 30

1. INTRODUÇÃO

A malária humana, também conhecida como maleita ou paludismo, é uma doença considerada um problema de saúde pública global, sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade em muitos países tropicais. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2013, foram registrados no mundo 198 milhões de casos e 584 mil óbitos. Cerca de 80% dos casos e 90% das mortes ocorrem na África, sendo as crianças menores de 5 anos as maiores vítimas, enquanto os demais casos e mortes ocorrem principalmente no sudeste Asiático e região leste do Mediterrâneo (WHO, 2014).

No Brasil, quase toda a transmissão de malária (99,7%) ocorre na Bacia Amazônica, que é habitada por mais de 25 milhões de pessoas, perfazendo cerca de 10% da população brasileira (WHO, 2014; IBGE, 2014). Embora a incidência de malária tenha apresentado uma redução nos últimos anos, reflexos dos altos investimentos no controle desta endemia, em 2013 foram notificados no Brasil 178.208 casos e 41 óbitos (SIVEP/Malária, 2014). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, o financiamento disponível ainda fica aquém dos recursos necessários para se atingir o acesso universal às intervenções de combate à malária (WHO, 2014) e aliado a isso, a migração humana desordenada, o desmatamento, a resistência do parasita aos medicamentos antimaláricos e as mudanças no comportamento das espécies de anofelinos vetores, caracterizam a região amazônica como um *hot spot* da malária, uma região de difícil controle (Bousema *et al.*, 2010).

A transmissão da malária humana se dá pela picada da fêmea de anofelino infectado com protozoários do gênero *Plasmodium*. As espécies de plasmódios que afetam o homem são: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium knowlesi* (Cox-Singh e Singh, 2008). Para completar o ciclo de vida, o *Plasmodium* sp. necessita infectar um vertebrado. Os mosquitos do gênero *Anopheles* Meigen transmitem a doença quando a fêmea se alimenta do sangue infectado contendo formas gametocísticas do hospedeiro vertebrado. Resumidamente, essas formas infectantes já no hospedeiro invertebrado, após um processo de fecundação, passam de gametócitos para oocineto, que atravessa a membrana peritrófica e o epitélio do intestino do mosquito, invadindo células epiteliais, formando oocistos, que se multiplicam e, por fim, estes oocistos se rompem liberando milhares de formas denominadas esporozoítos, as quais atingem as glândulas salivares do inseto, tornando-se apto a infectar outro hospedeiro vertebrado. A fêmea permanece infectada por toda a vida. O ciclo no mosquito pode durar, em média, de 10

a 14 dias (Coura, 2013). Atualmente conhece-se mais de 40 espécies de anofelinos no Mundo que podem transmitir a malária humana, embora com eficiência variável (Michalakis e Renaud, 2009).

Dentre as espécies de anofelinos registradas na Amazônia, *Anopheles darlingi* Root é considerada a mais importante (Davis, 1931; Deane, 1947; Tadei *et al.* 1988; Lourenço-de-Oliveira, 1995; Póvoa *et al.*, 2001; Conn *et al.*, 2006; Galardo *et al.*, 2009). Além desta, outras espécies têm sido implicados como vetores locais, vetores secundários ou ainda como prováveis vetores, tais como: *Anopheles aquasalis* Curry, *Anopheles marajoara* Galvão & Damasceno, *Anopheles janconnae* Wilkerson & Sallum, *Anopheles nuneztovari* s.l. Galbadón, *Anopheles triannulatus* s.l. (Neiva & Pinto), *Anopheles braziliensis* Chagas, *Anopheles intermedius* Peryassú e *Anopheles oswaldoi* s.l. (Peryassú), dependendo da densidade e/ou da elevada taxa de inoculação entomológica (Branquinho *et al.*, 1993; Galardo *et al.*, 2007; Galardo *et al.*, 2007; Dusfour *et al.*, 2012; Rosero *et al.*, 2013). Muitos destes vetores consistem ou estão incluídos em complexos de espécies crípticas, que em alguns casos coexistem em simpatria e com diferentes níveis de susceptibilidade ao *Plasmodium* spp. e respostas imunológicas distintas aos inseticidas (Mulamba *et al.* 2014). Portanto, a elucidação taxonômica dos membros destes complexos é importante para a epidemiologia da transmissão da malária e resulta no controle mais efetivo (Rosa-Freitas *et al.*, 1998; Naranjo-Diaz *et al.*, 2013).

Atualmente, o complexo *Anopheles albitarsis* s.l. agrupa oito membros, com cinco espécies descritas: *A. albitarsis* s.s., *A. deaneorum* Rosa-Freitas, *A. janconnae*, *A. marajoara*, *A. oryzalimnetes* Wilkerson & Motoki. Destes, apenas *A. deaneorum* é distinguível morfológicamente dos outros membros do complexo. A identificação dos demais membros é realizada com base na identificação molecular e inferida posteriormente por origem geográfica (Brochero *et al.*, 2007; Gutierrez *et al.*, 2010; Ruiz-Lopez *et al.*, 2012). Além destas espécies, três prováveis espécies do complexo *A. albitarsis* s.l. foram caracterizadas molecularmente e designadas informalmente como: espécies F, G e I; além de uma provável linhagem H (Motoki *et al.*, 2009, Ruiz-Lopez *et al.*, 2012). Este grupo de espécies varia no grau de importância como vetores de malária, como já descrito acima. Similarmente, *A. triannulatus* é reconhecido como um complexo de três membros, tais como: *A. triannulatus* s.s., *Anopheles halophylus* Silva-do-Nascimento & Lourenço-de-Oliveira e *A. triannulatus* C (Silva-do-Nascimento *et al.*, 2011; Rosero *et al.*, 2012), sendo os dois últimos muito estreitamente relacionados ou espécies incipientes (Moreno *et al.* 2013). Das sete linhagens

identificadas, no complexo *A. albitarsis* com o gene *COI*, a linhagem E encontrada no Brasil, Bolívia, Argentina e Colômbia, pode estar envolvida na transmissão de malária. *A. nuneztovari* também é reconhecida como complexo com pelo menos três membros: *A. nuneztovari* s.s., *Anopheles goeldii* e *Anopheles dunhami* (Fajardo Ramos *et al.*, 2008; Mirabello e Conn, 2008; Scarpassa e Conn, 2011; Calado *et al.*, 2008; Foster *et al.*, 2013), sendo a diferenciação destas espécies realizada pela análise da genitália masculina. *A. nuneztovari* s.s. é um importante vetor de malária na Colômbia e Venezuela, enquanto *A. goeldii* pode exercer papel de vetor local (Galardo *et al.*, 2007).

As espécies *A. oswaldoi* (Peryassú, 1922) e *A. konderi* Galvão & Damasceno (1942) eram consideradas como uma única espécie (Lane, 1953). Posteriormente, com a constatação de plasticidade comportamental e relatos positivos de inoculação em laboratório por Marrelli *et al.*, (1999a), testes ELISA com mosquitos procedentes do campo por Branquinho *et al.* (1993) e Póvoa *et al.* (2001) e dissecação de glândulas salivares por Branquinho *et al.* (1996) geraram dúvidas quanto ao status taxonômico destas espécies. As duas espécies possuem a morfologia externa da fêmea idêntica, apresentando 1) o terceiro e quarto artículos tarsais posteriores totalmente brancos e o quinto com anel basal escuro, 2) o quarto segmento palpal branco com as extremidades escuras, 3) a mancha preta pré-umeral menor do que a mancha branca posterior e 4) o segundo artículo tarsal posterior com até 10% de preto basal (Forattini, 2002). Estas espécies foram sinonimizadas por Lane, (1953) e, em seguida, separadas por Flores-Mendoza *et al.* (2004b) como espécies distintas, com base em diferenças na morfologia da genitália masculina. Nas últimas décadas estudos moleculares sugerem que as espécies *A. oswaldoi* e *A. konderi* formam dois complexos distintos com no mínimo três espécies cada (Marrelli *et al.*, 1999b; Scarpassa e Conn, 2006; Motoki *et al.*, 2011; Ruiz *et al.*, 2013). A identificação destes membros tornou a incriminação vetorial dos dois complexos ainda mais obscuros, em virtude de sua distribuição geográfica não totalmente compreendida, baixa densidade das espécies em estudos de inventários, dificultando a obtenção de espécimes para a criação até o estágio adulto.

O presente estudo apresenta resultados de taxonomia molecular dos complexos *A. oswaldoi* s.l. e *A. konderi* s.l., pela primeira vez analisados conjuntamente. São discutidas as relações evolutivas inferidas por meio de dois marcadores moleculares, o DNA mitocondrial (DNAm) do gene *COI*, região do DNA *barcode* e o DNA ribossomal (DNAr) o fragmento *ITS2* (Segundo Espaçador Interno Transcrito). A partir destas ferramentas moleculares foi possível estimar a distância genética, o número provável de espécies e linhagens e o tempo de

diversificação entre elas. É discutida a junção dos dois complexos em um complexo. Também com base em estudos anteriores e o presente estudo, apresenta-se a distribuição geográfica e as áreas de simpatria destes membros que dificultam a incriminação vetorial e o uso generalizado de estratégias de controle entomológico.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Família Culicidae

Os mosquitos estão classificados na ordem Diptera, infraordem Culicomorpha e família Culicidae (Forattini, 2002). Esta família consiste atualmente de 3.492 espécies, sendo a região Neotropical detentora da maior diversidade e endemismo, com aproximadamente 1.069 espécies (Rueda, 2008). No entanto, as estimativas sugerem que este número pode ser maior principalmente em florestas tropicais (WRBU, 2015).

A etapa fundamental para desvendar esta diversidade passa inicialmente pela identificação correta das espécies, que é alcançada examinando caracteres morfológicos principalmente das fêmeas adultas e das larvas de 4^a estágio. Nos grupos taxonomicamente próximos, a análise de caracteres da genitália masculina torna-se necessária (Sallum *et al.*, 1999). Várias espécies estreitamente relacionadas são confundidas em decorrência de suas semelhanças morfológicas, onde a variação intraespecífica pode exceder a variação interespecífica tornando difícil a identificação morfológica das mesmas (Lounibos e Conn, 2000).

2.2. Subfamília Anophelinae

A subfamília Anophelinae apresenta 493 espécies catalogadas e está subdividida em três gêneros: *Bironella* Theobald (8 espécies), *Chagasia* (5 espécies) e *Anopheles* (480 espécies) (WRBU, 2015). O gênero *Bironella* apresenta distribuição restrita à região Australásia; o gênero *Chagasia* Cruz está limitado à região Neotropical e o gênero *Anopheles* possui distribuição cosmopolita (Rueda, 2008). Este último é o mais importante gênero desta subfamília, pois reúne os mais importantes vetores de *Plasmodium* spp. da malária humana (Faran e Linthicum, 1981; Manguin *et al.*, 2008).

2.3. Gênero *Anopheles*

O gênero *Anopheles* inclui espécies que estão globalmente distribuídas, exceto na Antártica (Rueda, 2008). Este gênero se subdivide em sete subgêneros: 1) *Anopheles* Meigen; 2) *Nyssorhynchus* Blanchard; 3) *Cellia* Theobald; 4) *Stethomyia* Theobald; 5) *Kerteszia* Theobald; 6) *Lophopodomyia* Antunes e 7) *Baimaia* Harbach, Rattanarithikul & Harrison. Destes, apenas *Cellia* e *Baimaia* não ocorrem na região Neotropical, enquanto que, os subgêneros *Stethomyia* e *Lophopodomyia* são restritos a América do Sul (Reinert, 2009). No Brasil foram registradas até o momento 69 espécies (WRBU, 2015).

Além das características de diagnose para a subfamília Anophelinae, o gênero *Anopheles* apresenta um mesonoto relativamente achatado, escutelo arredondado dotado de uma fileira de cerdas por toda a sua extensão, nas pernas o quinto tarsômero é mais longo do que o quarto e a genitália masculina possui lobo parabasal com cerdas parabasais internas (Forattini, 2002). As espécies que ocorrem no Brasil podem ser identificadas por meio de chaves dicotômicas propostas por diferentes autores (Deane *et al.*, 1947; Gorham *et al.*, 1973; Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994; Faran, 1980) e ainda pelas descrições das espécies contidas em bibliografias pertinente ao grupo. Entretanto, apesar da disponibilidade desta literatura, principalmente para os anofelinos sul-americanos, verifica-se a ocorrência de indivíduos com morfologia semelhante ou idêntica (Galvão e Barreto, 1938; Harbach *et al.*, 1993) que podem constituir uma variação intraespecífica ou caracterizar um complexo de espécies, conhecidas como espécies crípticas, que dificultam a identificação morfológica precisa das mesmas (Marrelli *et al.*, 2006; Ruiz-Lopez *et al.*, 2012; Coetzee *et al.*, 2013).

2.4. Subgênero *Nyssorhynchus*

Os principais anofelinos transmissores da malária humana no Brasil estão incluídos nos subgêneros *Nyssorhynchus* e *Kerteszia*, mas o primeiro contém maior número de vetores (primários e/ou secundários) da malária (Consoli e Oliveira, 1994). Em decorrência desta importância, as espécies envolvidas na transmissão são as que têm sido mais estudadas (Tadei e Dutary-Thatcher, 2000).

Somente no subgênero *Nyssorhynchus* são conhecidas 39 espécies que estão distribuídas em três seções, quatro séries, oito grupos e dois subgrupos (Harbach, 2004; 2007). No Brasil, foram registradas 35 espécies; destas, 23 foram encontradas na região amazônica (Tadei e Dutary-Thatcher, 2000; WRBU, 2015).

2.5. *Anopheles oswaldoi* e *Anopheles konderi*

2.5.1. *História Taxonômica*

Os primeiros estudos com *A. oswaldoi* são de espécimes coletados no Vale do Rio Doce (Estado do Espírito Santo) e na Baixada Fluminense (Estado do Rio de Janeiro), Brasil. Inicialmente esta espécie foi denominada de *Cellia oswaldoi* por Peryassú (1922). A posterior sinonímia por Dyar (1923) com *A. tarsimaculatus* (Goeldi, 1905) permitiu o início de um rearranjo no táxon. Bonne (1923) subdividiu *A. tarsimaculatus* em duas espécies, a primeira com características exoflicas (equivalente a *A. oswaldoi*) e a segunda, com distribuição restrita à costa continental, denominada de *A. aquasalis*. Analisando as genitálias masculinas de *Cellia oswaldoi* e *A. tarsimaculatus*, Root (1924) considerou as duas espécies morfologicamente idênticas, colocando *Cellia oswaldoi* na sinonímia de *A. tarsimaculatus* e sugeriu também que as espécies americanas do gênero *Cellia* fossem incluídas no gênero *Anopheles* do subgênero *Nyssorhynchus*. Posteriormente, Lima (1928) por meio de análises dos caracteres dos adultos e dos estágios imaturos, observou diferenças morfológicas significantes e considerou *A. oswaldoi* **var.** *A. tarsimaculatus*. Galvão e Lane (1937) propuseram a divisão em *A. oswaldoi oswaldoi*, *A. oswaldoi* **var.** *metcalfi* e *A. oswaldoi* **var.** *noroestensis*. Galvão e Damasceno (1942) descreveram *A. konderi* a partir de análises da genitália masculina de exemplares procedentes do município de Coari, Estado do Amazonas, considerando a seguinte classificação: *A. noroestensis* como espécie distinta de *A. oswaldoi* e *A. metcalfi* como **nomen dubium**.

Mais tarde, Lane (1953), analisando os ovos, larvas de 4º estágio, pupa e fêmeas adultas de *A. konderi* e *A. oswaldoi*, considerou que estes dois táxons eram morfologicamente idênticos, sinonimizando *A. konderi* com *A. oswaldoi*. Flores-Mendoza *et al.* (2004), entretanto, designaram o neótipo e retiraram a sinonímia de *A. konderi* com *A. oswaldoi*, pois os autores detectaram diferenças da forma apical do edeago em que *A. oswaldoi* apresenta contorno arredondado e em *A. konderi* formato triangular, limitando a diferenciação aos machos. Com base na distribuição geográfica, variação morfológica, preferência por repasto sanguíneo, capacidade vetorial, bionomia e mais recentemente as fortes evidências dos estudos com marcadores moleculares (*COI* e *ITS2*) os quais geraram árvores com clados fortemente suportados (Marrelli *et al.*, 1999b; Ruiz *et al.*, 2005; Scarpassa e Conn, 2006)

apoiaram fortemente que *A. oswaldoi* s.l. é um complexo de espécies crípticas (Klein e Lima, 1990; Rosa-Freitas *et al.*, 1998; Ruiz *et al.*, 2005).

No estudo realizado por Marrelli *et al.* (1999b), foram observadas quatro prováveis espécies dentro de *A. oswaldoi* s.l., representadas por quatro grupos baseando-se em sequências da região *ITS2* de populações do Brasil, Peru e Venezuela. Scarpassa (2005) realizou estudos com isoenzimas e não encontrou diferença entre as populações de *A. oswaldoi* dos Estados do Acre, Rondônia e Amazonas. Entretanto, Scarpassa e Conn (2006), utilizando um longo fragmento do gene *COI* sequenciado de 45 espécimes de quatro municípios da Amazônia brasileira: Sena Madureira (Acre), Coari (Amazonas), São Miguel (Rondônia) e Moju (Pará), encontraram 25 haplótipos e 123 sítios variáveis. Nenhum destes haplótipos foi compartilhado entre as localidades e as distâncias genéticas foram de 0,08% a 5,3%. As análises filogenéticas evidenciaram quatro clados distintos fortemente suportados sugerindo quatro espécies no complexo *A. oswaldoi* e *A. konderi*.

Motoki *et al.* (2007) redescreveram e designaram lectótipo para o *A. oswaldoi* s.s. usando caracteres morfológicos da fêmea, do macho, incluindo genitália masculina, e das formas imaturas. Analisaram também sequências de *ITS2*, para fixar a identidade molecular dessa espécie. Consequentemente, Motoki *et al.* (2011) consideram a existência de dois complexos, um deles seria representada por *A. konderi* e o outro representado por *A. oswaldoi*. Recentemente Ruiz *et al.* (2013) identificaram quatro espécies no complexo *A. oswaldoi* s.l., sendo elas; *A. oswaldoi* s.s., *A. oswaldoi* A, *A. oswaldoi* B e *A. sp. nr. konderi*, sendo a segunda e terceira espécies putativas (prováveis espécies) e a última como espécie nomeada como próxima de *A. konderi* (near=nr: próximo). Os autores destacaram a necessidade de esclarecer também a posição taxonômica de *A. konderi*, visto que em suas análises esta espécie que foi selecionada *a priori* como grupo externo; no entanto, após as análises filogenéticas *A. konderi* caiu dentro do grupo interno no complexo *A. oswaldoi*.

Como base no exposto acima, apesar de vários estudos realizados neste complexo, ainda permanecem dúvidas sobre o número de espécies e suas relações filogenéticas. Além disso, permanecem problemas de baixa amostragem e localidades que nunca foram amostradas, principalmente onde *A. oswaldoi* s.l. foi encontrada infectada (Rubio-Palis *et al.*, 1992; Branquinho *et al.*, 1993; 1996; Póvoa *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2005).

2.5.2. Distribuição geográfica

Os complexos *A. oswaldoi* e *A. konderi* encontram-se distribuídos por toda a América do Sul, desde o leste dos Andes até o Norte da Argentina (Faran, 1980; Faran e Linthicum, 1981). Estudos relatam a ocorrência de *A. oswaldoi* s.l. no Panamá (Simmons, 1979), Costa Rica (Faran, 1980), Trinidad (Rozeboom, 1942), Colômbia (Ruiz *et al.*, 2005), Equador (Pinault e Hunter, 2011; Pinault e Hunter, 2012), Venezuela (Rubio-Palis e Curtis, 1992), Suriname (Lounibos e Conn, 2000), Guianas (Laubach *et al.*, 2001), Brasil (Peryassú, 1922; Klein e Lima, 1990; Forattini *et al.*, 1993; Tadei *et al.*, 1998; Scarpassa, 2005), Bolívia (Peyton *et al.*, 1983), Peru (Flores-Mendoza *et al.*, 2004) e Paraguai (Faran, 1980). O complexo *Anopheles konderi* s.l., segundo dados da literatura, foi registrado no Brasil (Estados do Amazonas, Amapá, Acre, Rondônia e Paraná), Peru (Departamento de Loreto) e Bolívia (Cochabamba) (Galvão e Damasceno 1942; Flores-Mendoza *et al.*, 2004; Bergo *et al.*, 2007; Motoki *et al.*, 2011) (Figura 1).



Figura 1. Áreas de ocorrência e estimativa de distribuição de *A. oswaldoi* s.l. na América do Sul. Fonte: Adaptado de Faran e Linthicum (1981).

No Brasil, *A. oswaldoi* s.l. e *A. konderi* s.l. podem ocorrer dentro ou próximo as áreas de floresta úmida na Amazônia (várzeas e florestas ripárias ou ciliares) e raramente são encontradas em grandes extensões de campos (cerrados), sendo classificadas como espécies umbrófilas, ou seja, que preferem criadouros sombreados no interior de florestas densas, denominadas de florestas Ombrófilas (Deane *et al.*, 1948; Forattini, 2002). De acordo com Guedes (2012) também podem ocorrer em alguns fragmentos de Caatinga, Mata Atlântica e Pantanal.

2.5.3. *Importância como vetor de malária e complexo de espécies crípticas*

Segundo Forattini (2002) *A. oswaldoi* s.l. é exofílica e zoofílica. Entretanto, Quiñones *et al.* (2006) relataram a captura de espécimes em ambiente domiciliar, alertando que a espécie possui alta plasticidade comportamental. Infecções por *Plasmodium* spp. neste complexo foram observadas por Hayes *et al.* (1987) no Peru, por Rúbio-Palis *et al.* (1992) na Venezuela, por Quiñones *et al.* (2006) na Colômbia, por Hiwat *et al.* (2011) no Suriname e por Dusfour *et al.* (2012) na Guiana Francesa. No Brasil, *A. oswaldoi* s.l. é capturada com frequência em regiões florestadas ou com moderada antropização (Póvoa *et al.*, 2001). Marrelli *et al.* (1999a) testaram a capacidade vetorial em condições de laboratório e obtiveram maior taxa de infecção para *A. oswaldoi* s.l. (13,8%) do que para *A. konderi* s.l. (3,3%) do Estado do Acre. Observações sobre a atividade hematófaga realizadas por Rúbio-Palis e Curtis (1992) na Venezuela, demonstraram que *A. oswaldoi* s.l. têm um pico de atividade por volta das 19:00 horas no extra domicílio, com um segundo pico menor que o primeiro próximo à meia-noite, com preferência por sangue humano. Enquanto que na grande maioria da sua distribuição na Amazônia brasileira comporta-se como vetor secundário ou sem importância vetorial de hábito zoofílico (Klein *et al.*, 1991; Rúbio-Palis *et al.*, 1992).

No Brasil, o primeiro registro de infecção por *Plasmodium* spp. em *A. oswaldoi* s.l. foi relatado por Arruda *et al.* (1986) no Estado do Pará, seguido por Ferreira *et al.* (1990) no Estado de Rondônia e Branquinho *et al.* (1993) no Estado do Acre. Em áreas de ocorrência de malária simiana na Amazônia, Lourenço-de-Oliveira e Luz (1996) capturaram esta espécie principalmente no interior da floresta, sendo ligeiramente mais abundante na copa das árvores do que no solo. Consequentemente, esses autores incriminaram como potencial vetor de *P. brasilianum*. Tadei *et al.* (1998) encontraram um espécime infectado com *P. falciparum* em

Cachoeira da Porteira, Estado do Pará e Póvoa *et al.* (2001) registraram um espécime infectado com o mesmo parasita no município de Serra do Navio, Estado do Amapá. O último relato de infecção foi descrito por Santos *et al.* (2005) que encontraram dois espécimes parasitados com *P. vivax* no município de Anajás, Estado do Pará. Com base em distribuição geográfica, Ruiz *et al.* (2013) incriminaram as espécies *A. oswaldoi* A, *A. oswaldoi* B e *A. sp. nr. konderi* como vetor de malária. Entretanto, Galardo *et al.* (2007) não obtiveram nenhum espécime de *A. oswaldoi* s.l. infectado com *Plasmodium* spp. em três localidades rurais no município de Mazagão, Estado do Amapá, onde *A. darlingi* e *A. marajoara* foram abundantes e incriminados como principais vetores. Este resultado, entretanto, pode ser decorrente da baixa densidade de *A. oswaldoi* s.l. nestes locais.

Considerando-se a diversidade comportamental do *A. oswaldoi* e *A. konderi*, e apesar das tentativas dos estudos morfológicos visando caracterizar e separar as espécies desses complexos, ainda é difícil a delimitação morfológica, mesmo concernente a estrutura dos estádios larvais estudados por Flores-Mendoza *et al.* (1998) e estrutura externa dos ovos por Lounibos *et al.* (1997). A principal diferença morfológica está no ápice do edeago que é mais dilatado do que a base e de contorno triangular em *A. konderi* s.l., enquanto em *A. oswaldoi* s.l. é aproximadamente cilíndrico e com o ápice arredondado ou oval (Flores-Mendoza *et al.*, 2004; Motoki *et al.*, 2007).

A correta identificação dos membros dos complexos *A. oswaldoi* s.l. e *A. konderi* s.l. é o ponto de partida para separar os potenciais vetores dos não vetores e, conseqüentemente, aprimorar as estratégias de controle, focando diretamente sobre aquelas espécies envolvidas na transmissão. É importante também identificar as espécies com precisão, a fim de resolver problemas taxonômicos, reconhecer novas espécies e estabelecer a sua distribuição (Esquivel *et al.*, 2009), contribuindo também para o conhecimento da biodiversidade dos anofelinos.

2.6. Marcadores moleculares na identificação de espécies crípticas

Espécie é a unidade fundamental da biologia, comparável em importância aos genes, células e organismos, daí a importância de sua delimitação (Queiroz, 2007). Mudanças morfológicas, entretanto, nem sempre ocorrem durante o processo de especiação (Queiroz *et al.*, 2006). Assim, metodologias alternativas à morfologia convencional são utilizadas, podendo ser destacados os estudos de cruzamentos experimentais (quando possível), citogenéticos, isoenzimáticos (produtos dos genes-pós-tradução) e os demais marcadores

moleculares analisados diretamente em nível de DNA (pré-tradução) presentes no genoma dos indivíduos.

Considerando que os caracteres morfológicos são o ponto de partida essencial na identificação das espécies de mosquitos, algumas vezes ela é dificultada em decorrência da presença de espécies crípticas e grupos de espécies morfológicamente semelhantes e filogeneticamente relacionadas (Wilkerson e Peyton, 1990; Reinert *et al.*, 1997; Rosa-Freitas *et al.*, 1998; Coluzzi *et al.*, 2002) podendo resultar em identificações incorretas. Nestes casos, o problema da identificação tem sido resolvido com o emprego da taxonomia integrada: uso conjunto de marcadores moleculares e análises morfológicas, ecológicas e comportamentais (Dayrat, 2005; Fujita *et al.*, 2012). Os marcadores moleculares mais utilizados são sequenciamento de genes ou fragmentos de genes do DNA mitocondrial e do DNA nuclear, que além de auxiliar na taxonomia, também proporcionam informações para a reconstrução das relações filogenéticas (Walton *et al.*, 1999; Sallum *et al.*, 2002; Foster *et al.*, 2013).

A região conhecida como DNA *barcode* do gene *COI* do DNA mitocondrial é atualmente a mais utilizada em estudos de taxonomia molecular (Hebert *et al.*, 2004; Barrett e Hebert, 2005; Hajibabaei *et al.*, 2006; Rubinoff, 2006; Kumar *et al.*, 2007). A idéia central do DNA *barcode* está fundamentada na premissa de que certos fragmentos de DNA possuem uma baixa taxa de variação intraespecífica e uma elevada variação interespecífica. Portanto, um limite de variação pode ser caracterizado para cada grupo taxonômico, acima do qual um grupo de indivíduos pode ser considerado como não pertencendo à mesma espécie, portanto, representando uma nova espécie (Hebert *et al.*, 2003). Esta abordagem, que explora a diversidade entre sequências de DNA para identificar organismos, teria vantagens, tal como identificar espécies crípticas ou muito similares quando analisadas por meio de caracteres morfológicos, mas que são geneticamente diferenciáveis (Stoeckle, 2003).

A região do DNA *barcode* compreende os 648 pares de bases (pb) a partir da extremidade 5' do gene *COI*, o qual consiste de aproximadamente 1.500 pb. O gene *COI* codifica a proteína *heme* (Citocromo *c*), que está envolvida no transporte de elétrons, na translocação de prótons da membrana, no mecanismo de apoptose celular e na respiração em diversos organismos. A terceira posição do códon mostra uma alta incidência de substituição de bases, com uma taxa de evolução de aproximadamente três vezes maior em relação à região *16S* ou *12S* (Hebert *et al.*, 2003). O DNA mitocondrial possui algumas vantagens quando comparado com os genes nucleares, pois possui taxa de evolução rápida, ausência de íntrons, herança predominantemente materna, elevado número de cópias por célula, portanto,

de fácil isolamento e disponibilidade de iniciadores (*primers*) conservados. Estas características, o torna atrativo para estudos de populações, taxonomia molecular e análises filogenéticas (Hajibabaei *et al.*, 2007).

O gene *COI* é amplamente utilizado para distinguir espécies de vários grupos de insetos, incluindo àquelas de divergência evolutiva extremamente recente e de difícil separação morfológica (Hajibabaei *et al.*, 2006) e com distância genética de 2% entre as espécies (Hebert *et al.*, 2003; Will e Rubinoff, 2004; Scarpassa e Conn, 2011), sendo possível resolver problemas de taxonomia interna (Ruiz *et al.*, 2012; 2013). A existência do *Barcoding gap* consiste na ausência de sobreposição de distância genética, entre as variações genéticas interespecífica e intraespecífica de tal forma que uma lacuna é evidenciada (Hebert *et al.*, 2004), permitindo atribuir aos indivíduos não identificados, a qual espécie este correspondente, com uma menor taxa de erro representada principalmente por espécies incipientes com linhagem ou a formação de linhagens incompletas (Hebert *et al.*, 2003; Hebert *et al.*, 2004; Barret e Hebert, 2005). Críticas relacionadas a esta abordagem são discutidas em Meyer e Paulay (2005), Wiemers e Fiedler (2007) e Meier *et al.* (2008).

Os primeiros códigos de barras analisados em mosquitos da família Culicidae foram realizados por Cywinska *et al.* (2006). As divergências nas sequências foram 20 vezes maiores em espécies congênicas do que entre membros de uma mesma espécie de mosquito (Culicidae), sendo este marcador recomendado para a identificação deste grupo. As mutações no gene *COI* ocorrem de forma lenta comparada a outros genes mitocondriais (Cywinska *et al.*, 2006); portanto, utilizado com sucesso em diversos estudos taxonômicos no gênero *Anopheles* (Sallum *et al.*, 2002; Scarpassa e Conn, 2006; Kumar *et al.*, 2007; Nagaki *et al.*, 2010; Pedro *et al.*, 2010; Laboudi *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012; Bourke *et al.*, 2013).

Além da região do DNA *barcode*, o DNA ribossomal DNAr (especialmente o *ITS2*) é frequentemente empregada para a distinção de espécies crípticas em anofelinos (Gómez *et al.*, 2015). Cada unidade de repetição do DNAr de eucarionte possui uma organização conservada, sendo constituída por um espaçador inter-gênico não transcrito (*IGS*) que é altamente variável, um espaçador externo transcrito (*ETS*), que é transcrito em uma sequência que contém a extremidade 5' da molécula precursora do RNAr, três regiões transcritas, cada uma delas com as respectivas sequências que codificam três genes ribossômicos: 5.8S, 18S e 28S (regiões conservadas) e dois espaçadores internos transcritos (*ITS1* e *ITS2*) (Collins e Paskewitz, 1996). A região *ITS2* também têm sido um marcador eficiente na identificação de membros de complexos de espécies crípticas de anofelinos pertencentes a vários subgêneros,

tais como os complexos *Anopheles (Cellia) maculipennis* (Porter e Collins 1991), *A. (Cellia) punctulatus* (Beebe e Saul 1995), *A. (Anopheles) quadrimaculatus* (Cornel *et al.* 1996), *A. (Anopheles) crucians* (Wilkerson *et al.*, 2004), *A. nuneztovari* (Calado *et al.*, 2008), *A. triannulatus* (Moreno *et al.*, 2013) e *A. (Nyssorhynchus) oswaldoi* (Marrelli *et al.* 1999; Motoki *et al.* 2011; Ruiz-Lopez *et al.* 2013). O *ITS2* é parte de um grupo de genes do DNA ribossomal dispostos em *tandem*, que evoluem por meio de um padrão em conserto. Assim, sequências de *ITS2* podem acumular rapidamente mutações dentro de populações reprodutivamente isoladas e podem ser o primeiro indicador de descontinuidade genética entre as populações. Adicionalmente, este marcador, apesar do alinhamento ser desafiador, apresenta diferenças no comprimento e substituições fixas entre as sequências, os quais são fortes evidências de divisão de linhagens ou de espécies distintas, especialmente se tais linhagens/espécies estão geograficamente co-distribuídas (Li e Wilkerson, 2007).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Estudar a taxonomia molecular dos complexos *A. oswaldoi* s.l. e *A. konderi* s.l. da Amazônia brasileira, com o emprego de dois marcadores moleculares, a região do DNA *barcode* do DNA mitocondrial e o Segundo Espaçador Interno Transcrito (*ITS2*) do DNA ribossomal.

3.2. Específicos

- Identificar o número de espécies nos complexos *A. oswaldoi* s.l. e *A. konderi* s.l.;
- Estimar a distância genética intra e interespecífica e as relações filogenética dos membros destes complexos;
- Testar a existência do *barcoding gap*;
- Estimar o tempo de divergência dos membros dos complexos;
- Inferir preliminarmente a distribuição geográfica e áreas de simpatria das espécies na Amazônia brasileira;
- Associar a distribuição e relatos anteriores de infecção por *Plasmodium* spp. com as prováveis espécies dos complexos na Amazônia brasileira.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Locais de coletas e preparo de amostras

Os mosquitos foram coletados em cinco Estados da região amazônica do Brasil (Acre, Amapá, Amazonas, Rondônia e Pará), totalizando 18 localidades amostradas. A escolha destas localidades se deve: 1) às lacunas de amostragens, 2) possíveis áreas de simpatria e 3) relatos de encontro de espécimes de *A. oswaldoi/konderi* s.l. infectados. A tabela 1 apresenta as informações geográficas dos locais amostrados neste estudo.

Tabela 1. Informações sobre as localidades de coletas de *A. oswaldoi* s.l./*A. konderi* s.l. por Estado (UF), Municípios, Localidades, Coordenadas geográficas e Coletores.

UF	Município	Localidade	Coordenadas UTM		Coletores
			Latitude	Longitude	
AC	Rio Branco	Senador Guiomar	-9,93266	-67,8667	Scarpassa, V. M.
	Sena Madureira	Sena Madureira	-9,05	-68,65	Scarpassa, V. M.
	Acrelândia	Transacreeana	-8,07663	-71,3935	Scarpassa, V. M.
AM	Autazes	Autazes	-3,69916	-59,1318	Saraiva, J. F.
	Coari	Igarapé do Isidoro	-0,08333	-63,1333	Scarpassa, V. M.
	Lábrea	Lábrea	-7,66452	-65,0697	Alencar, R. B.
	Nova Olinda do Norte	Rodovia AM254	-3,83694	-59,0215	Saraiva, J. F.
	Presidente Figueiredo	Pitinga	-0,78238	-60,0604	Saraiva, J. F.
AP	Calçoene	Lourenço	2,45713	-51,2675	Saraiva, J. F.
	Ferreira Gomes	Ferreira Gomes	0,83555	-51,2087	Saraiva, J. F.
	Macapá	Mata Fome	0,21266	-50,9727	Saraiva, J. F.
	Macapá	Fazenda Santa Barbara	0,29122	-50,902	Saraiva, J. F.
	Santana	Ilha de Santana	-0,08383	-51,1637	Saraiva, J. F.
	Serra do Navio	Pedra Preta	0,89363	-52,0116	Saraiva, J. F.
	Tartarugalzinho	Tartarugalzinho	1,51641	-50,9171	Saraiva, J. F.
PA	Oriximiná	Serra do Cachorro	-1,002	-57,1265	Alencar, R. B.
RO	Porto Velho	Parque Municipal	-8,70822	-63,9332	Scarpassa, V. M.
	São Miguel	São Miguel	-0,14333	-63,8166	Scarpassa, V. M.

* **UF** = Unidades Federativas: AC = Estado do Acre; AM = Estado do Amazonas; AP = Estado do Amapá; PA = Estado do Pará e RO = Estado de Rondônia. **Coletores:** Scarpassa, V. M.= Dra. Vera Margarete Scarpassa; Saraiva, J. F.= José Ferreira Saraiva e Alencar, R. B.= Dr. Ronildo Baiatone Alencar.

As coletas dos adultos foram realizadas entre 2013 a 2014 com uma armadilha luminosa de *Shannon* instalada no interior da floresta, nos horários entre 18:00 e 22:00 horas. Os espécimes adultos foram capturados com aspirador manual (capturador de Castro), transferidos vivos para copos plásticos ou parafinados, contendo no máximo 20 espécimes por

copo, para evitar danos aos mosquitos durante o transporte. Houve também coletas de larvas nos horários das 7:00 às 10:00 horas, como apresentado na **figura 2**. No criadouro natural, as larvas e pupas foram coletadas com auxílio de uma concha de cabo longo e, em seguida, transferidas para garrafas tipo *pet* (600 mL) com auxílio de um conta-gotas, juntamente com água do criadouro (Consoli e Oliveira, 1994). As amostras foram transportadas ao Laboratório de Genética e Evolução de Mosquitos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). No insetário, os imaturos foram criados até a emergência do estágio adulto. Em seguida os mosquitos foram mortos em freezer -20°C e imediatamente as fêmeas foram identificadas morfológicamente com auxílio de chaves dicotômicas de Lane (1953) e de Faran e Linthicum (1981). As identificações foram conforme as descrições de *A. oswaldoi* s.l., portanto, não houve separação entre *A. oswaldoi* e *A. konderi*. Após a identificação, os espécimes foram preservados em Etanol a 95% e armazenados no freezer -20°C até a extração do DNA genômico.



Figura 2. Coleta de mosquitos em campo: a) Armadilha de Shannon e b) Coleta dos estágios imaturos.

Para a extração do DNA genômico, uma das pernas de cada mosquito adulto foi removida e transferida para tubos *ependorf* o espécime adulto restante foi armazenado no freezer -80°C . Um exemplar de cada espécie provável foi depositado como *Voucher* na coleção entomológica do INPA.

4.2. Análise Molecular

4.2.1. Extração de DNA

O protocolo de extração foi com base em Sambrook e Russell (2001), com o método fenol-clorofórmio modificado no Laboratório de Genética e Evolução de Mosquitos Vetores. As amostras foram maceradas individualmente em tubos do tipo *eppendorf* de (1,5mL) contendo 100µL de solução tampão de lise, composta por NaCl [0,08M], Sucrose [0,16M], EDTA [0,06M], SDS (*Dodecil Sulfato de Sódio*) [0,05%] e Tris-Cl [0,1M]. Em seguida levadas ao banho-maria a temperatura de 65°C por 30 minutos, após este período de incubação foi acrescentado Acetato de Potássio (KAc) 8M para a precipitação das proteínas, incubadas a uma temperatura de 4°C por 30 minutos e centrifugadas. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo. O DNA foi precipitado com etanol 95% e em seguida deixado em *Overnight* no freezer à -20°C. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas e o precipitado foi lavado em Etanol 75% para uma nova centrifugação e descarte do sobrenadante. O *pellet* resultante foi seco em temperatura controlada (37°C). Por fim, o DNA foi ressuscitado em água *MilliQ* e armazenado em ultra-freezer à -80°C para posterior amplificação.

4.2.2. Amplificação do gene *COI*

A região do DNA *barcode* foi amplificada com os *primers* universais: LCO- 1490 [59 – GGTCAACAAA TCATAAAGTATTGG – 39] e HCO- 2198 [59 – TAAACTTCAG GGTGACCAAAAATCA – 39] descritos por Folmer *et al.* (1994). Cada reação de *PCR* consistiu de um volume de 25µL, contendo 1µL de DNA, 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, KCl 50mM, MgCl₂ [1,5mM], 5pmol de cada *primer*, 200mM de dNTP e 2,5U de *Taq* polimerase (*Invitrogen Inc., Carls bad, CA*). Na amplificação deste fragmento foi adotada a programação descrita por Motoki *et al.* (2011), com o seguinte perfil: uma desnaturação de três minutos a 94°C e 35 ciclos a 94°C, 55°C e 72°C durante um minuto cada, seguindo de uma extensão de sete minutos a 72°C.

4.2.3. Amplificação do ITS2

Na amplificação do *ITS2* foram utilizados os *primers* 5.8SF [59-ATCACTCGGCTCGTGGATCG-39] e 28SR [59-ATGCTTAAATTTAGGGGGTAGTC-39] de Sallum *et al.* (2008). A reação de *PCR* foi realizada em uma mistura aquosa de 25 μ L de reação contendo 1 μ L de DNA, 10 mM Tris-HCl, pH=8,3, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, 5 pmol de cada iniciador, 200 mM de cada *desoxinucleotídeo-trifosfatos* (dNTP), e 2,5U de *Taq* polimerase (*Invitrogen Inc., Carls bad, CA*). A programação de amplificação consistiu de uma desnaturação a 94°C por dois minutos e 34 ciclos de 94°C, 57°C, e 72°C durante 30 segundos cada, seguido por uma extensão de 10 minutos a 72°C (Motoki *et al.*, 2011).

4.2.4. Purificação do produto de PCR

Após a amplificação, os produtos de PCR foram checados em géis de agarose a 1% e fotodocumentados. Em seguida, os produtos de PCR foram purificados com *PEG 8000*, seguindo-se o protocolo já estabelecido no Laboratório de Genética e Evolução de Mosquitos do INPA. A purificação permite a eliminação de resíduos de baixo peso molecular, tais como, excessos de sais, *primers* e dNTP's, otimizando a reação de sequenciamento do DNA.

4.2.5. Reação de sequenciamento

No sequenciamento foi utilizado o kit *Big-Dye* (Life Technology). Para cada amostra, duas reações foram preparadas (*primers Forward* e *Reverse*) com volume total de 10 μ L, composto por 1 μ L de DNA, 2 μ L de *primer*, 2 μ L de tampão 5x, 0,6 μ L de *Big Dye* e água estéril (4,4 μ L) para completar o volume final de 10 μ L. As reações foram amplificadas e precipitadas e, por fim, diluídas em formamida e submetidas à eletroinjeção no Analisador de DNA *ABI* da *Applied Biosystems*, Modelo *3130 xl* disponível no INPA.

4.2.6. Alinhamento das sequências

O alinhamento das sequências foi realizado automaticamente no *Clustal W* e editadas manualmente com o Programa *Bioedit*, v. 7.1.11 (Hall, 1999) com o auxílio do Programa *Chromas Lite* (Technelysium, 2012). As sequências consenso de *COI* e *ITS2* geradas no presente estudo foram comparadas com as sequências previamente depositadas no *GenBank*,

utilizando a ferramenta *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*), disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Em seguida uma análise de Inferência Bayesiana usando o modelo HKY+I+G foi realizada com todas as sequências identificadas disponíveis no *GenBank* para identificar as sequências obtidas, por meio do critério de monofilia recíproca (**APÊNDICE A**).

4.3. Análises estatísticas e filogenéticas

A partir do banco de dados do *COI*, as análises populacionais e o número de haplótipos foram calculados no *DnaSP* e em seguida foram analisadas no programa *TCS* v.1.21 (Crandall e Templeton, 1993), utilizando um limite de conexão de 95%, com base no método da parcimônia, para investigar se *A. oswaldoi* s.l. e *A. konderi* s.l. consistem de metapopulações, ou seja, representadas por uma única rede, ou se compreendem táxons separados, ou seja, representados por duas ou mais redes de haplótipos não conectadas.

As Unidades Taxonômicas Operacionais Moleculares (MOTUS) foram identificadas de acordo com o critério de monofilia recíproca para as diferentes abordagens filogenéticas utilizando os marcadores separados (*COI* ou *ITS2*) ou concatenados (*COI* + *ITS2*). A distância genética dentro e entre os membros (distâncias genéticas intra e interespecíficas) foi estimada utilizando o modelo de substituição *Kimura 2-Parâmetros* (*K2P*). Esta análise foi realizada no programa *MEGA* v.6 (Tamura *et al.*, 2011). O modelo de *K2P* considera as substituições múltiplas e a razão de transições e transversões, assumindo que as frequências dos quatro nucleotídeos são as mesmas e que a taxa de substituição não varia entre os sítios (Kimura, 1980). O tempo de divergência entre as espécies foi estimado somente para o gene mitocondrial *COI*, na árvore de espécies com dados combinados, onde foi assumida uma calibração de 2.3% de divergência por cada milhão de ano (Brown, 1994). O programa **BEAST v 1.6.1* (*Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees*) foi utilizado para a inferência dos tempos de divergências durante a análise Bayesiana (Drummond *et al.*, 2010). Nesta análise, utilizou-se a opção *Relaxed clock: uncorrelated lognormal*, que assume taxas independentes de evolução molecular nos diferentes ramos de uma filogenia.

A partir das distâncias genéticas de *COI* foram construídas árvores com algoritmo de *Neighbor-Joining* (NJ) com 2.000 pseudoréplicas, que produziram árvores de consenso. Esta análise foi realizada no programa *MEGA* v.6. As relações filogenéticas utilizando Máxima Parcimônia (MP) no programa *PAUP** v.4 (Swofford, 2000) e Máxima Verossimilhança

(MV) no programa *Garli* v.0.95 (Adam *et al.*, 2014) foram realizadas somente com *COI* e a Inferência Bayesiana (IB) com os dados de *COI* e *ITS2* separados e concatenados (combinados) no programa *MrBayes* v.3.2.2 (Ronquist *et al.*, 2011). Uma árvore de espécies foi gerada no programa **BEAST* (Heled e Drummond, 2010).

Árvores mais parcimoniosas foram obtidas com pesquisas heurísticas com 1.000 réplicas, seguida de pesquisa da árvore de consenso estrito com suporte de *bootstrap* nos ramos. A análise de MV conduzida no *Garli*, utilizou o melhor modelo evolutivo selecionado no *jModelTest* v.2.1.5, usando o Critério de Informação Akaike (AIC) (Darriba *et al.* 2012). A IB realizada no *MrBayes*, foi gerada com 10.000.000 de gerações, sendo duas pesquisas paralelas, usando quatro cadeias de Markov (sendo três cadeias quentes e uma fria). Por fim, a árvore de espécies no programa **BEAST*, que infere as relações entre as espécies mesmo em casos onde existe incongruência entre árvores de genes, foi analisada usando 10.000.000 de gerações, descartando as árvores obtidas antes da corrente de Markov atingir valores de verossimilhança estáveis e convergentes ($\approx 25\%$) do total de árvores (Huelsenbeck e Ronquist, 2001). No programa *Tracer* v.1.4 (Rambaut e Drummond 2007) foi verificado se os valores de tamanho da amostra efetiva (ESS) atingiu valor superior a 200, segundo recomendação de Drummond *et al.* (2007), para em seguida assumir um *burnin* de 25%. As topologias foram avaliadas considerando a formação de clados fortemente suportados por valores de *bootstrap*, probabilidade posterior e quanto à monofilia das prováveis espécies. Em todas as análises foram utilizados como grupo externo *Anopheles goeldii* e *Anopheles marajoara*. As árvores foram visualizadas e editadas no *FigTree* v.1.4.1 (Rambaut, 2014).

Para mapear as distribuições geográficas dos membros foi utilizado o programa *Quantum Gis* v.2.4 (Qgis, 2013). Cada espécie foi plotada no mapa utilizando-se cores diferentes, sendo possível delimitar as áreas e pontos de simpatria. Mapas de distribuição geral das espécies foram estimados com base em dados gerados neste estudo e da literatura (Marrelli *et al.*, 1999b; Scarpassa e Conn, 2006; Motoki *et al.*, 2006; Sallum *et al.*, 2008; Motoki *et al.*, 2009; Motoki *et al.*, 2011; Ruiz *et al.*, 2013).

A incriminação preliminar de cada membro como possível vetor de malária, foi realizada cruzando os dados de ocorrências de cada espécie dos complexos e os relatos de infecção por *Plasmodium* spp. encontrados para *A. oswaldoi* s.l. disponíveis na literatura.

5. RESULTADOS

Considerando todos os anofelinos capturados, 95 fêmeas foram identificadas morfológicamente como *Anopheles oswaldoi/konderi* s.l. (83 adultos e 12 larvas) procedentes de 18 localidades. Destes, 83 extrações foram realizadas (78 adultos e 5 larvas) e amplificadas 83 (100%) para o *COI* e 27 (32%) para o *ITS2*, pertencentes a cinco prováveis espécies, sendo duas espécies formalmente descritas, *A. oswaldoi* s.s. e *A. konderi* e três espécies putativas (prováveis), que ainda não foram descritas morfológicamente: *A. oswaldoi* A, *A. oswaldoi* B e *A. sp. nr. konderi* (nr: referente a *near* = próximo de *A. konderi*), confirmadas por meio de comparações com as sequências depositadas no *GenBank* (**APÊNDICE B**) e identificadas por meio de Inferência Bayesiana conjunta dos dados coletados mais as sequências de estudos anteriores depositadas no *GenBank* (**APÊNDICE A**).

5.1. Análises do DNA barcode do Gene *COI*

As 83 sequências analisadas para a região do DNA *barcode*, consistiram de 663pb. Nas sequências consenso a região de sobreposição atingiu 626pb, excluindo os *primers*. O banco de dados não apresentou inserções e/ou deleções, assim como na tradução para aminoácidos não revelou a presença de *stop códons*, indicando a ausência de pseudogenes ou *NUMTs*. Portanto, este banco de dados representa genes que codificam proteínas funcionais. Das mutações observadas, as transições foram mais frequentes que as transversões (Figura 3). As relações entre as taxas de transição (T_S), transversão (T_V) e distância genética não evidenciaram a existência de saturação sugerindo que estes dados são informativos para as análises filogenéticas nestes complexos. A composição média de nucleotídeos foi de A=29%, C=15,5%, G=16,5% e T=39%, e o conteúdo de A+T foi de 68%. A tabela com sítios variáveis está apresentada no **APÊNDICE C**.

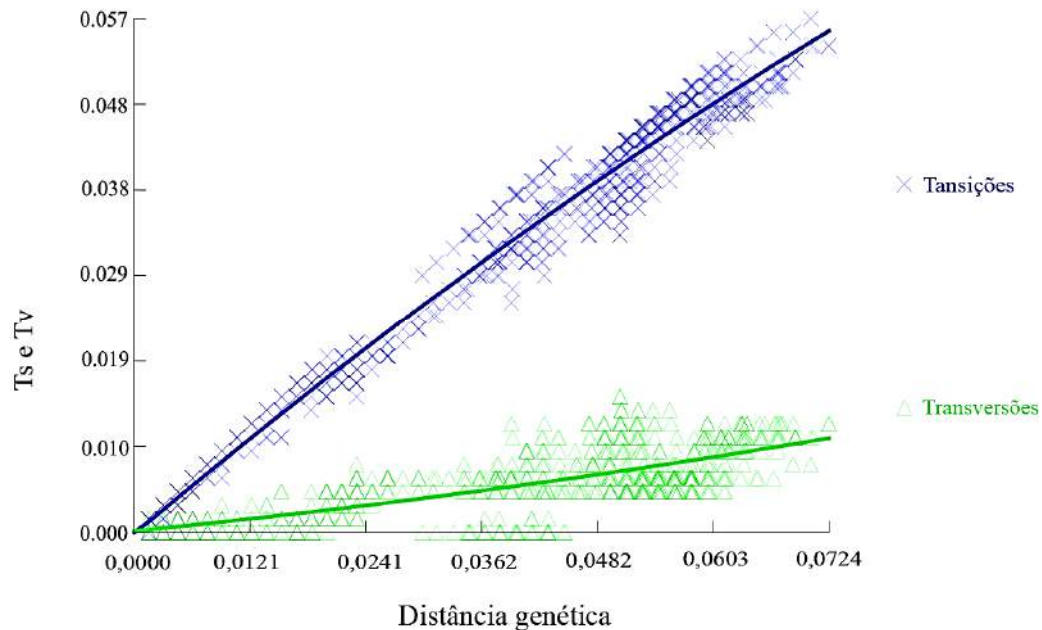


Figura 3. Relação das taxas de transição (Ts) e transversão (Tv) e distâncias genéticas (K2P) obtidas para as sequências de *COI*.

As espécies mais frequentes foram *A. konderi* (45,8%) e *A. oswaldoi* A (30,1%), seguidas por *A. oswaldoi* B (9,6%), *A. sp. nr. konderi* (8,4%) e *A. oswaldoi* s.s. (6%) apresentadas na tabela 2.

Tabela 2. Número de sequências de *COI* analisadas por localidade e espécie.

UF	Localidades	Adulto	Larva	*Espécies				
				<i>osw. ss</i>	<i>osw. A</i>	<i>osw. B</i>	<i>kond.</i>	<i>nr. kond.</i>
AC	Senador Guiomar	5		2				3
	Sena Madureira	1						1
	Transacraana	2		1				1
	Autazes	11					11	
AM	Igarapé do Isidoro	5		2	3			
	Lábrea	12			12			
	Rodovia AM254	1						1
	Pitinga	4			4			
	Lourenço		1		1			
	Ferreira Gomes	3				3		
	Mata Fome	4			1		3	
AP	Faz. Santa Barbara**	3					3	
	Ilha de Santana	4					4	
	Pedra Preta		4			4		
PA	Tartarugalzinho	1				1		
	Serra do Cachorro	7				3	4	
RO	Porto Velho	2					1	1
	São Miguel	15					15	
Total		78	5	5	25	8	38	7

**osw ss*: *A. oswaldoi* s.s., *oswA*: *A. oswaldoi* A, *oswB*: *A. oswaldoi* B, *kond*: *A. konderi*, *nr.kond*: *A. sp. nr. konderi*. **Faz.: Fazenda. Siglas: UF = Unidades Federativas, AC = Estado do Acre, AM = Estado do Amazonas, AP = Estado do Amapá, PA = Estado do Pará e RO = Estado de Rondônia.

De acordo com os dados desta tabela, *A. oswaldoi* s.s. foi registrada nos Estados do Amazonas e Acre. *A. oswaldoi* B foi observada somente no Estado do Amapá. *A. oswaldoi* A nos Estados do Amapá, Amazonas e Pará. *A. konderi* nos Estados do Amapá, Amazonas, Pará e Rondônia, enquanto a espécie *A. sp. nr. konderi* nos Estados do Acre, Amazonas e Rondônia (Figura 5). As áreas de simpatria foram detectadas em seis localidades das 18 amostradas neste estudo: Macapá, Mata Fome (*A. oswaldoi* A e *A. konderi*), Coari (*A. oswaldoi* A e *A. oswaldoi* s.s.), Rio Branco (*A. oswaldoi* s.s. e *A. sp. nr. konderi*), Acrelândia (*A. oswaldoi* s.s. e *A. sp. nr. konderi*), Serra do Cachorro (*A. oswaldoi* A e *A. konderi*) e Porto Velho (*A. konderi* e *A. sp. nr. konderi*).

A tabela 3 apresenta os 43 haplótipos observados para a região do DNA *barcode*, com suas respectivas frequências por espécie e por localidade. A maioria dos haplótipos identificados consistiu de apenas um indivíduo. A espécie *A. oswaldoi* A apresentou o maior número (n=20) de haplótipos (H6 a H25) e esteve presente em seis localidades das 18 amostradas, seguida por *A. konderi*, com oito haplótipos (H31 a H38) distribuídos em sete localidades.

A análise realizada no programa *TCS* subdividiu as sequências do DNA *barcode* em seis redes independentes, sugerindo a existência de prováveis espécies distintas, assim representadas: *A. oswaldoi* s.s. (vermelha), *A. oswaldoi* B (azul), *A. oswaldoi* A (verde), *A. konderi* (amarela) e *A. sp. nr. konderi* (roxa). No caso de *A. oswaldoi* B, dois haplótipos (H29 e H30) não foram conectados na rede, mas nas análises filogenéticas estes haplótipos foram incluídos no mesmo clado dos demais haplótipos detectados para *A. oswaldoi* B (Figura 5), excluindo a possibilidade de identificação errônea. A ausência de conexão entre estes dois haplótipos e os demais podem indicar sub-amostragem ou “*gaps* de amostragem” onde os haplótipos intermediários não foram amostrados ou extintos.

Tabela 3. Distribuição dos haplótipos observados para o gene *COI* por espécie e por localidade.

H	Nº	ESPÉCIE	LOCALIDADES
H1	1	<i>A. oswaldoi</i> s.s.	Rod. Transacreaana
H2	1	<i>A. oswaldoi</i> s.s.	Igarapé do Isidoro
H3	1	<i>A. oswaldoi</i> s.s.	Igarapé do Isidoro
H4	1	<i>A. oswaldoi</i> s.s.	Senador Guiomar
H5	1	<i>A. oswaldoi</i> s.s.	Senador Guiomar
H6	2	<i>A. oswaldoi</i> A	Pitinga
H7	2	<i>A. oswaldoi</i> A	Pitinga (1) e Lourenço (1)
H8	1	<i>A. oswaldoi</i> A	Pitinga
H9	1	<i>A. oswaldoi</i> A	Serra do Cachorro
H10	1	<i>A. oswaldoi</i> A	Serra do Cachorro
H11	2	<i>A. oswaldoi</i> A	Lábrea
H12	1	<i>A. oswaldoi</i> A	Lábrea
H13	1	<i>A. oswaldoi</i> A	Lábrea
H14	1	<i>A. oswaldoi</i> A	Lábrea
H15	1	<i>A. oswaldoi</i> A	Lábrea
H16	2	<i>A. oswaldoi</i> A	Lábrea
H17	1	<i>A. oswaldoi</i> A	Lábrea
H18	1	<i>A. oswaldoi</i> A	Lábrea
H19	1	<i>A. oswaldoi</i> A	Lábrea
H20	2	<i>A. oswaldoi</i> A	Lábrea (1) e Igarapé do Isidoro (1)
H21	1	<i>A. oswaldoi</i> A	Igarapé do Isidoro
H22	1	<i>A. oswaldoi</i> A	Igarapé do Isidoro
H23	1	<i>A. oswaldoi</i> A	Mata Fome
H24	1	<i>A. oswaldoi</i> A	Fazenda Santa Barbara
H25	1	<i>A. oswaldoi</i> A	Serra do Cachorro
H26	4	<i>A. oswaldoi</i> B	Ferreira Gomes (1) e Pedra Preta (3)
H27	1	<i>A. oswaldoi</i> B	Tartarugalzinho
H28	1	<i>A. oswaldoi</i> B	Ferreira Gomes
H29	1	<i>A. oswaldoi</i> B	Pedra Preta
H30	1	<i>A. oswaldoi</i> B	Ferreira Gomes
H31	7	<i>A. konderi</i>	Fazenda Santa Barbara (1), Ilha de Santana (3) e Mata Fome (3)
H32	3	<i>A. konderi</i>	Autazes
H33	3	<i>A. konderi</i>	Autazes
H34	3	<i>A. konderi</i>	Autazes
H35	2	<i>A. konderi</i>	Autazes
H36	17	<i>A. konderi</i>	São Miguel (14) e Serra do Cachorro (3)
H37	2	<i>A. konderi</i>	São Miguel (1) e Porto Velho (1)
H38	1	<i>A. konderi</i>	Serra do Cachorro
H39	2	<i>A. sp. nr. konderi</i>	Senador Guiomar
H40	1	<i>A. sp. nr. konderi</i>	Porto Velho
H41	1	<i>A. sp. nr. konderi</i>	Rodovia AM254
H42	1	<i>A. sp. nr. konderi</i>	Rodovia Transacreaana
H43	2	<i>A. sp. nr. konderi</i>	Sena Madureira (1) e Senador Guiomar (1)

*H= haplótipos.

A tabela 4 apresenta um sumário das medidas de diversidade genética intraespecífica para as cinco espécies identificadas molecularmente. Embora o tamanho da amostra tenha variado entre as espécies, o que dificulta a comparação entre elas, *A. oswaldoi* s.s. e *A. oswaldoi* A apresentaram os maiores valores de diversidade genética quando comparadas com *A. konderi*. Por outro lado, *A. sp. nr. konderi*, *A. oswaldoi* A e *A. oswaldoi* B apresentaram os

maiores valores de diferenças nucleotídicas (*K*), sugerindo a existência de linhagens distintas ou a presença de haplótipos altamente divergente.

Tabela 4. Resumo das medidas de diversidade genética intraespecífica estimadas para cada espécie dos complexos *A. oswaldoi* e *A. konderi* da Amazônia brasileira.

Espécie	n°	NH	NS	K	h ± SD	π ± SD
<i>A. oswaldoi</i> s.s.	5	5	10	4,60	1,000±0,126	0,00694±0,0015
<i>A. oswaldoi</i> A	25	20	29	8,94	0,983±0,015	0,01349±0,0014
<i>A. oswaldoi</i> B	8	5	19	8,03	0,786±0,151	0,01212±0,0029
<i>A. konderi</i>	38	8	14	3,02	0,761±0,058	0,00455±0,0005
<i>A. sp. nr. konderi</i>	7	5	20	8,95	0,905±0,103	0,01350±0,0020
Total	83	43	89	23,3	0,947±0,017	0,03513±0,0017

***n°**; número de sequências, **NH**; número de haplótipos, **NS**; número de sítios variáveis, **K**; média de diferenças nucleotídicas, **h**; diversidade haplotípica, **π**; diversidade nucleotídica, **SD**; desvio padrão.

Considerando todas as sequências analisadas dentro de cada espécie, a tabela 5 apresenta os valores mínimos e máximos de distâncias genéticas intraespecíficas, e os valores médios estimados sob o modelo de *K2P*. *A. oswaldoi* A foi a espécie que mostrou a maior variação entre os valores mínimo (0,000) e máximo (0,029=2,9%) e uma média de 0,015 ± 0,010, seguidas por *A. oswaldoi* B e *A. sp. nr. konderi*, que apresentaram um limite de variação idêntico, com mínima (0,000) e máxima (0,023=2,3%) e com médias de 0,012± 0,008. As outras duas espécies (*A. oswaldoi* s.s. e *A. konderi*) tiveram os menores valores médios (0,006 ± 0,003 e 0,006 ± 0,004, respectivamente). No entanto, as cinco espécies apresentaram os valores máximos de distâncias acima de 1%. Embora *A. oswaldoi* A tenha apresentado a maior variação genética e prováveis linhagens nas análises filogenéticas, todos os haplótipos foram conectados em uma única rede sugerindo a existência de apenas uma espécie.

Tabela 5. Valores mínimos, máximos e médios de distância genética intraespecífica por meio do modelo *K2P* para o gene *COI*.

Espécies	Distância genética		
	Mínima	Máxima	Média ± D.P.
<i>A. oswaldoi</i> s.s.	0,002	0,011	0,006± 0,003
<i>A. oswaldoi</i> A	0,000	0,029	0,015± 0,010
<i>A. oswaldoi</i> B	0,000	0,023	0,012± 0,008
<i>A. konderi</i>	0,000	0,012	0,006± 0,004
<i>A. sp. nr. konderi</i>	0,000	0,023	0,012± 0,008

*± D.P. – Desvio padrão.

A tabela 6 apresenta os valores mínimos, máximos e médios de distância genética interespecífica inferida com o modelo *K2P*. O valor mínimo de 0,033 (3,3%) foi observado

entre *A. oswaldoi* s.s. e *A. konderi*, e entre *A. konderi* e *A. sp. nr. konderi*, e o valor máximo foi de 0,070 (7,0%) entre *A. oswaldoi* A e *A. oswaldoi* B. O maior valor médio foi observado entre *A. oswaldoi* A e *A. oswaldoi* B (6,2%).

Tabela 6. Valores mínimos, máximos, médios e desvio padrão das distâncias genéticas interespecíficas calculadas por meio do modelo *K2P* para o gene *COI*.

Espécies	Min.	Máx.	Med ± D.P.
<i>A. oswaldoi</i> s.s. Versus <i>A. oswaldoi</i> A	0,041	0,061	0,052 ± 0,014
<i>A. oswaldoi</i> s.s. Versus <i>A. oswaldoi</i> B	0,034	0,044	0,039 ± 0,007
<i>A. oswaldoi</i> s.s. Versus <i>A. konderi</i>	0,033	0,044	0,039 ± 0,008
<i>A. oswaldoi</i> s.s. Versus <i>A. sp. nr. konderi</i>	0,044	0,052	0,048 ± 0,006
<i>A. oswaldoi</i> A Versus <i>A. oswaldoi</i> B	0,057	0,070	0,062 ± 0,009
<i>A. oswaldoi</i> A Versus <i>A. konderi</i>	0,039	0,061	0,052 ± 0,016
<i>A. oswaldoi</i> A Versus <i>A. sp. nr. konderi</i>	0,047	0,062	0,054 ± 0,011
<i>A. oswaldoi</i> B Versus <i>A. konderi</i>	0,051	0,061	0,053 ± 0,007
<i>A. oswaldoi</i> B Versus <i>A. sp. nr. konderi</i>	0,050	0,069	0,059 ± 0,013
<i>A. konderi</i> Versus <i>A. sp. nr. konderi</i>	0,033	0,044	0,038 ± 0,008

Valores de distância genética: Min. = mínima, Máx. = máxima, Med = média e DP = desvio padrão.

A divergência média interespecífica encontrada foi 0,038 entre *A. konderi* e *A. sp. nr. konderi* e entre *A. oswaldoi* s.s. e *A. konderi*, e de 0,039 entre *A. oswaldoi* s.s. e *A. oswaldoi* B, que estão relacionados nas análises filogenéticas. Dentro de cada espécie (em negrito), os maiores valores foram observados para *A. oswaldoi* A (0,013), *A. oswaldoi* B (0,012) e *A. sp. nr. konderi* (0,014) (Tabela 7).

Tabela 7. Média das distâncias entre as sequências de nucleotídeos do gene *COI* nos complexos *A. oswaldoi* e *A. konderi*, utilizando o modelo *K2P*.

Espécie	osw ss	oswA	oswB	kond	nr.kond
<i>A. oswaldoi</i> s.s.	0,007				
<i>A. oswaldoi</i> A	0,052	0,013			
<i>A. oswaldoi</i> B	0,039	0,062	0,012		
<i>A. konderi</i>	0,039	0,052	0,053	0,005	
<i>A. sp. nr. konderi</i>	0,048	0,054	0,059	0,038	0,014

***osw ss:** *A. oswaldoi* s.s., **oswA:** *A. oswaldoi* A, **oswB:** *A. oswaldoi* B, **kond:** *A. konderi*, **nr.kond:** *A. sp. nr. konderi*.

O histograma da figura 4 apresenta as frequências das distâncias genéticas intraespecíficas (azul) e interespecíficas (vermelha) estimadas sob o modelo *K2P*. As distâncias resultaram no valor mínimo interespecífico de 0,033 (3,3%) e máxima intraespecífica de 0,029 (2,9%) resultando em um *barcoding gap* de 0,004 (0,4%). A maior

distância intraespecífica foi observada entre os espécimes de Lábrea (406oswALab-AM, 408oswALab-AM) e Coari (473oswACoa-AM).

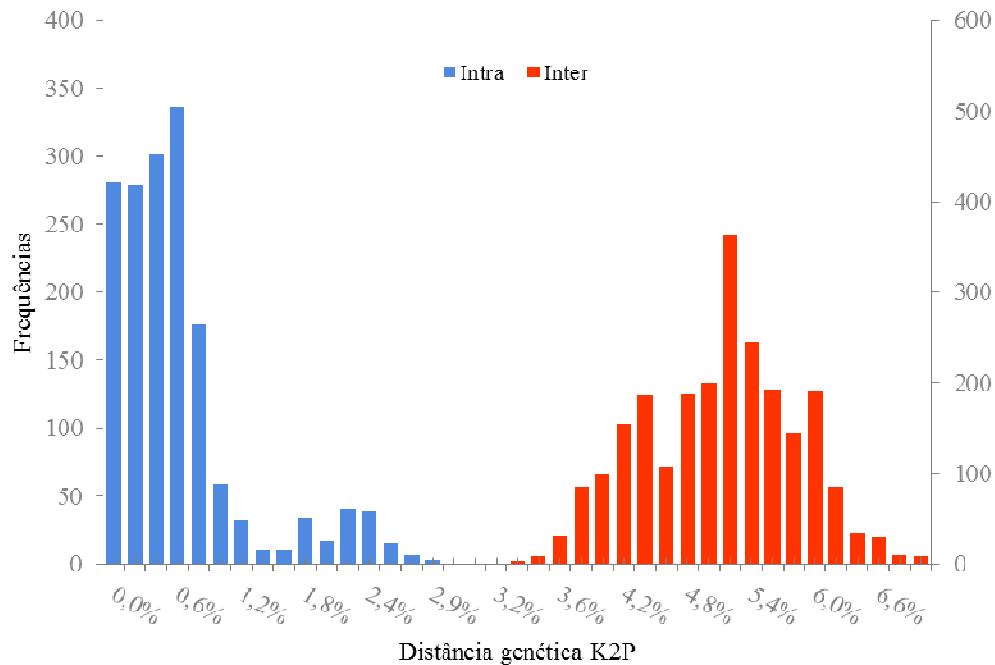


Figura 4. Histograma representando as distâncias genéticas intra e interespecífica para as cinco espécies candidatas dos complexos *A. oswaldoi* s.l. e *A. konderi* s.l.

A figura 5 sumariza as análises do gene *COI barcode* nas espécies dos complexos *A. oswaldoi* e *A. konderi*, onde são representadas a distribuição geográfica, as redes de haplótipos e a árvore de *Neighbor Joining* (NJ) gerada a partir do modelo *K2P* e as respectivas linhagens.

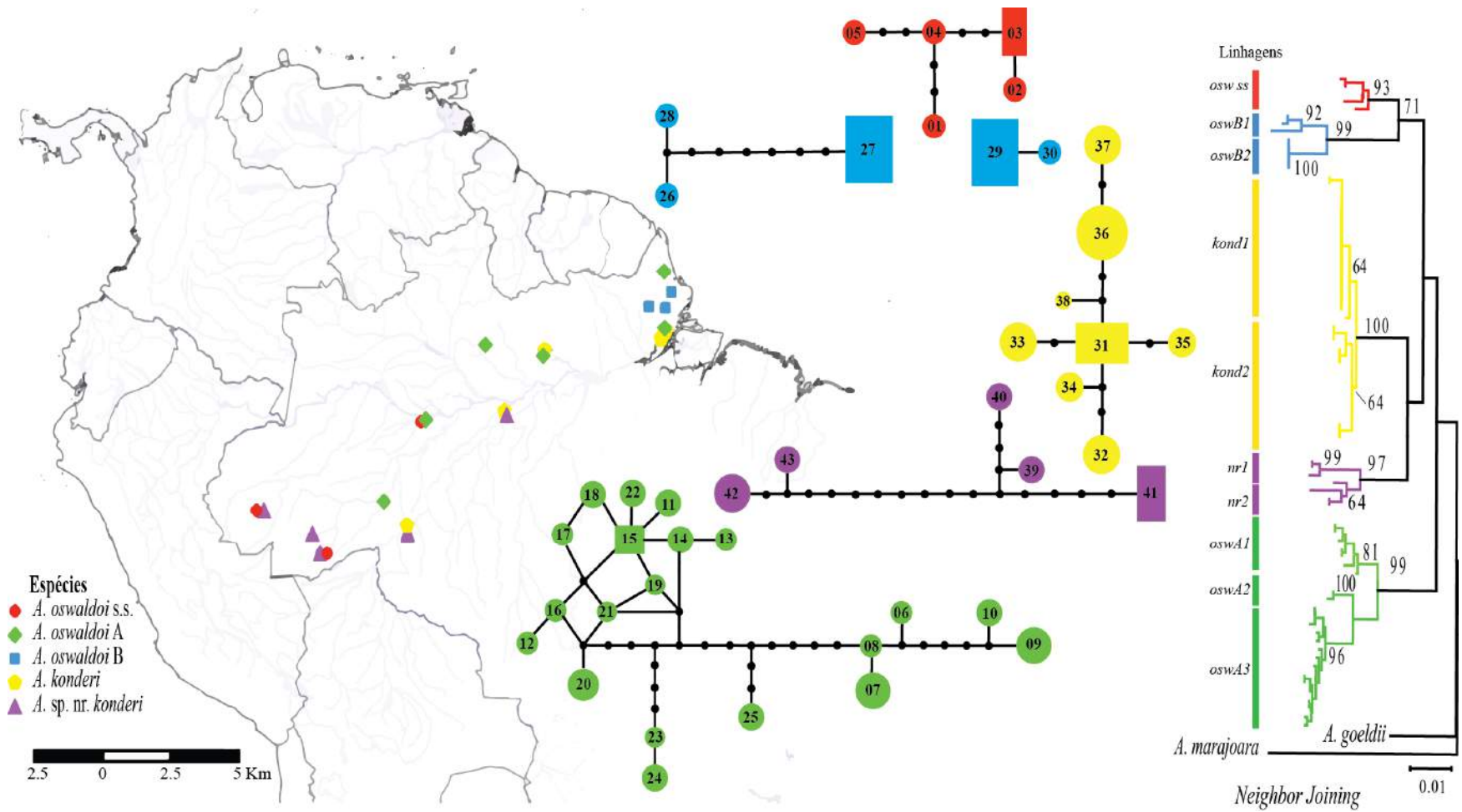


Figura 5. Distribuição das espécies dos complexos *A. oswaldoi* s.l. e *A. konderi* s.l., rede de haplótipos e árvore de *Neighbor Joining* construídas com base em *COI*.

A tabela 8 apresenta os valores de distâncias genéticas calculadas entre as linhagens de *A. oswaldoi* A, *A. oswaldoi* B e *A. sp. nr. konderi*. Três prováveis linhagens dentro de *A. oswaldoi* A, cujos valores variaram de 1,5% (entre *oswA2* e *oswA3*) a 2,4% (entre *oswA1* e *oswA2*). Similarmente, o valor entre as duas linhagens de *A. oswaldoi* B foi de 2,1%.

Tabela 8. Distâncias genéticas calculadas entre as linhagens de *A. oswaldoi* A, *A. oswaldoi* B, *A. konderi* e *A. sp. nr. konderi*.

Linhagens	Média ± D.P.
<i>A. oswaldoi</i> A	
<i>oswA1 Versus oswA2</i>	0,024 ± 0,004
<i>oswA1 Versus oswA3</i>	0,023 ± 0,002
<i>oswA2 Versus oswA3</i>	0,015 ± 0,003
<i>A. oswaldoi</i> B	
<i>oswB1 Versus oswB2</i>	0,021 ± 0,002
<i>A. konderi</i>	
<i>kond1 Versus kond2</i>	0,006 ± 0,006
<i>A. sp. nr. konderi</i>	
<i>nr 1 Versus nr 2</i>	0,019 ± 0,002

***osw ss**: espécie *A. oswaldoi* s.s.; **oswA1** a **A3**: linhagens de *A. oswaldoi* A; **oswB1** a **B2**: linhagens de *A. oswaldoi* B; **kond1** a **2**: linhagens de *A. konderi*; **nr 1** a **2**: linhagens de *A. sp. nr. konderi*.

5.2. Segundo Espaçador Interno Transcrito - *ITS2*

Foram analisadas 27 sequências de *ITS2*, que variaram em comprimento entre os membros dos complexos. Em *A. oswaldoi* s.s. este fragmento apresentou entre 445 pb e 506 pb, em *A. oswaldoi* A comprimentos de 441 pb e 507 pb, em *A. konderi* comprimentos de 441 pb e 506 pb e em *A. sp. nr. konderi* comprimentos de 441 pb e 511 pb. As sequências de *A. oswaldoi* B não apresentaram variação no comprimento, sendo todas do mesmo tamanho (502 pb). Observou-se 20 pb variáveis entre os sítios 194 e 497, concentrando-se do meio para o final do fragmento. Indels (inserções/deleções) foram observados nas posições 325, 351, 471, 479 e 497 (**APÊNDICE D**). A composição média de nucleotídeos foi de; A=28%, C=27%, G=25% e T=20%. O conteúdo de C+G=52% foi maior que o conteúdo de A+T=48%, como esperado para este marcador.

O *ITS2* apresentou indels (inserções/deleções) que distinguiram cada uma das espécies analisadas dos complexos (**APÊNDICE D**). *A. oswaldoi* s.s. apresentou uma transversão na posição 393 (A-T) e uma transição na posição 432 (C-T). *Anopheles oswaldoi* A apresentou uma transição na posição 194 (A-G), *A. oswaldoi* B foram detectadas uma deleção na posição

351, quatro transversões nas posições 389 (C-A), 393 (C-G), 397 (A-C) e 453 (G-C) e uma transição na posição 462 (G-A). *A. konderi* mostrou apenas uma transição na posição 440 (C-T) e em *A. sp. nr. konderi* foi detectada uma inserção na posição 325 (G). Neste mesmo sítio também ocorreram inserções do nucleotídeo adenosina (A) em *A. oswaldoi* B e *A. konderi*.

No *ITS2* divergência média interespecífica, com base na distância *K2P*, alcançou máxima de 0,021 (2,1%) entre *A. oswaldoi* s.s. e *A. oswaldoi* B, e mínima de 0,007 (0,7%) entre *A. oswaldoi* A e *A. konderi*. O maior valor médio de divergência intraespecífica (0,007) ocorreu na espécie *A. konderi*. (Tabela 9).

Tabela 9. Média das distâncias entre as sequências de nucleotídeos do gene *ITS2* nos complexos *A. oswaldoi* e *A. konderi*, utilizando o modelo *K2P*.

Espécie	<i>osw ss</i>	<i>oswA</i>	<i>oswB</i>	<i>kond</i>	<i>nr.kond</i>
<i>A. oswaldoi</i> s.s.	0,003				
<i>A. oswaldoi</i> A	0,012	0			
<i>A. oswaldoi</i> B	0,021	0,017	0		
<i>A. konderi</i>	0,015	0,007	0,017	0,007	
<i>A. sp. nr. konderi</i>	0,019	0,012	0,020	0,009	0,002

**osw ss*: *A. oswaldoi* s.s., *oswA*: *A. oswaldoi* A, *oswB*: *A. oswaldoi* B, *kond*: *A. konderi*, *nr.kond*: *A. sp. nr. konderi*.

A tabela 10 apresenta o número de genótipos e sua distribuição. Dentre os membros, *A. sp. nr. konderi* apresentou maior diversidade de genótipos (n=3), seguida por *A. oswaldoi* s.s., *A. oswaldoi* A e *A. konderi*, cada uma com dois genótipos. *A. oswaldoi* B apresentou apenas um genótipo.

Tabela 10. Relação e número de genótipos do marcador molecular *ITS2* seguidos de espécies e localidades.

GEN.	Nº	ESPÉCIE	LOCALIDADES
HI	1	<i>A. oswaldoi</i> s.s.	Igarapé do Isidoro
HII	2	<i>A. oswaldoi</i> s.s.	Igarapé do Isidoro (1) e Rio Branco (1).
HIII	9	<i>A. oswaldoi</i> A	Pitinga (3), Coari (1), Serra do Cachorro (4) e Calçoene (1).
HIV	1	<i>A. oswaldoi</i> A	Mata Fome.
HV	5	<i>A. oswaldoi</i> B	Pedra Preta (2), Ferreira Gomes (2) e Tartarugalzinho (1).
HVI	2	<i>A. konderi</i>	Fazenda Santa Barbara (1) e Mata Fome (1).
HVII	3	<i>A. konderi</i>	Mata Fome (2) e São Miguel (1).
HVIII	1	<i>A. sp. nr. konderi</i>	Rod. Transcreana.
HIX	2	<i>A. sp. nr. konderi</i>	Sena Madureira (1) e Rod. AM254 (1).
HX	1	<i>A. sp. nr. konderi</i>	Rio Branco.

*GEN = genótipos, Nº = Número de indivíduos sequenciados. Entre parênteses representa o número de indivíduos analisados dentro das localidades.

Este marcador, ao contrário do que ocorreu com o gene *COI*, apresentou rápida saturação das taxas de Transição (Ts) e Transversão (Tv). Aproximadamente entre 3,0 e 3,5% de distância genética a taxa de Tv ultrapassa a taxa de Ts (Figura 6).

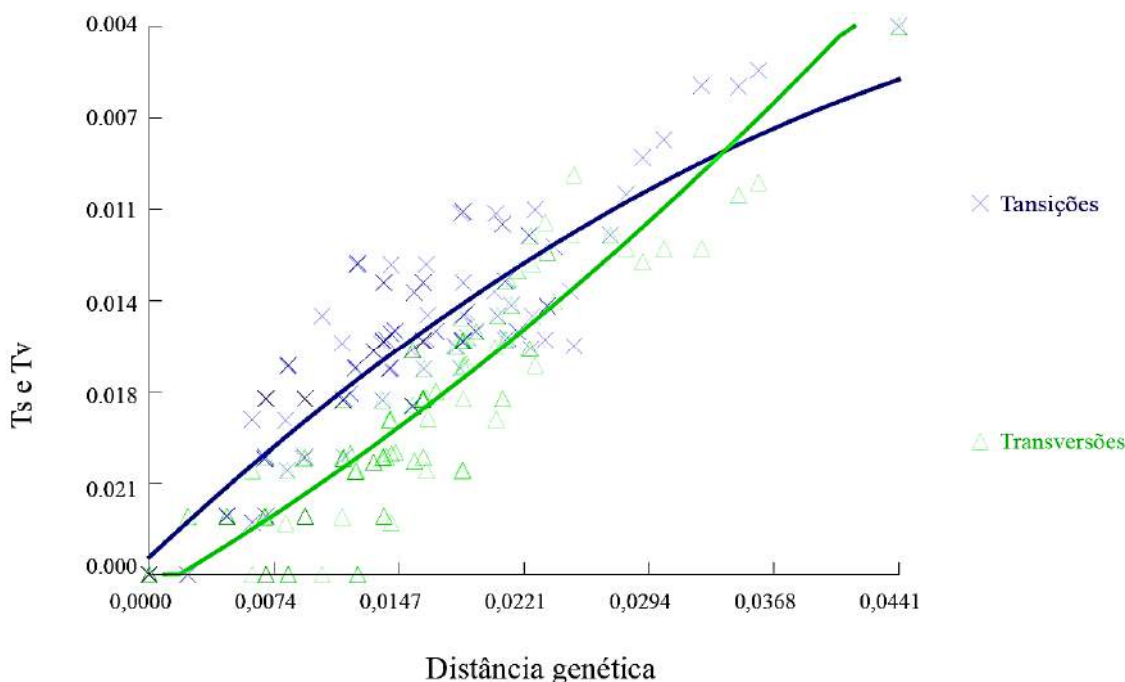


Figura 6. Relação das taxas de transição (Ts) e transversão (Tv) e distância genética (K2P) para as sequências de *ITS2*.

5.3. Análises filogenéticas

A topologia da árvore de *Neighbor Joining* (NJ) do gene *COI* separou os membros dos complexos em cinco prováveis espécies, com valores de suporte de *bootstrap* igual ou superior a 93%. O clado representado por *A. oswaldoi* A, apresentou alto suporte para três linhagens respectivamente, 81%, 96% e 100%, e as espécies *A. oswaldoi* B e *A. sp. nr. konderi* tiveram suporte para divisão em duas linhagens, a primeira com 92% e 100% e a segunda espécie com 64% e 99% (Figura 5).

As análises filogenéticas com dados do gene *COI*, por meio da MP, MV e IB e a análise concatenada com os dois marcadores (*COI* + *ITS2*) por meio de IB, também recuperaram cinco clados reciprocamente monofiléticos (Figura 8). Estes clados representam as cinco espécies dos complexos *A. oswaldoi* s.l. e *A. konderi* s.l. As análises com os dados do *COI* apresentaram topologias distintas, principalmente em relação a *A. oswaldoi* A que foi incluído em posições distintas das árvores.

Na MP foram obtidas 448 árvores igualmente parcimoniosas, com comprimento de ramos igual a 218. De um total de 663 caracteres, apenas 81 foram informativos, com índices de C.I. = 0.615 e R.I. = 0.935. A topologia interna da árvore gerou uma politomia, mas os clados que representam as espécies tiveram alto suporte de *bootstrap*, como segue: *A. oswaldoi* s.s. (87%), *A. oswaldoi* B (100%), *A. oswaldoi* A (96%), *A. konderi* (99%) e *A. sp. nr. konderi* (93%). *Anopheles oswaldoi* A, *A. oswaldoi* B, *A. sp. nr. konderi* e *A. konderi* apresentaram subdivisões em seus respectivos clados, com valores de *bootstrap* que variaram de 57% a 100%. Na MP apenas a relação filogenética entre *A. oswaldoi* s.s. e *A. oswaldoi* B como clados próximos, foi resolvida (Figura 7).

A análise de MV (Figura 8) do gene *COI* foi inferida com o modelo de evolução molecular HKY + I + G (Hasegawa *et al.* 1985), que assume taxas de variação ao longo dos sítios seguindo uma distribuição gama e uma proporção dos sítios tida como invariável. Desta forma foi obtida a árvore do gene *COI* mais verossímil com $Ln = -1182.9913$. Esta árvore apresentou melhor resolução em relação a MP, com cinco clados reciprocamente monofiléticos. *Anopheles oswaldoi* s.s. e *A. oswaldoi* B tiveram relação filogenética próxima. O outro grande clado basal representado por dois subgrupos que incluíram *A. konderi* e *A. sp. nr. konderi*. Este resultado sugere que estas duas espécies são filogeneticamente mais relacionadas entre si. A partir deste clado basal foi gerado outro clado representado por *A. oswaldoi* A, sugerindo que esta última espécie pode ser mais estreitamente relacionada com *A.*

konderi e *A. sp. nr. konderi* do que com *A. oswaldoi* s.s. e *A. oswaldoi* B. As possíveis linhagens (subclados) detectadas na árvore de NJ para *A. oswaldoi* A, *A. oswaldoi* B, *A. konderi* e *A. sp. nr. konderi* também foram recuperadas na árvore de MV (Figura 8), com suportes variados.

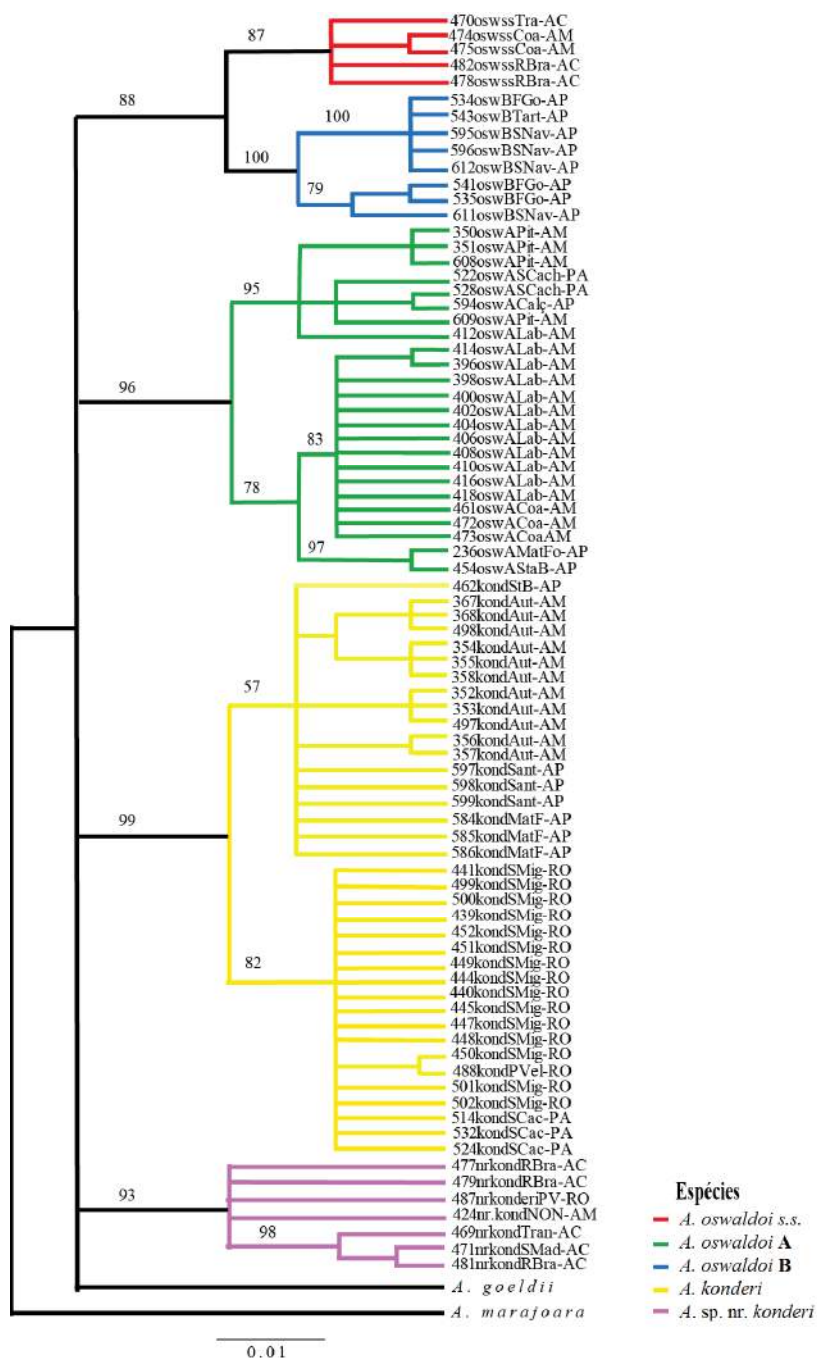


Figura 7. Árvore de consenso estrito da máxima parcimônia (MP) de *COI*, com valores de *bootstrap* apresentados sobre os ramos.

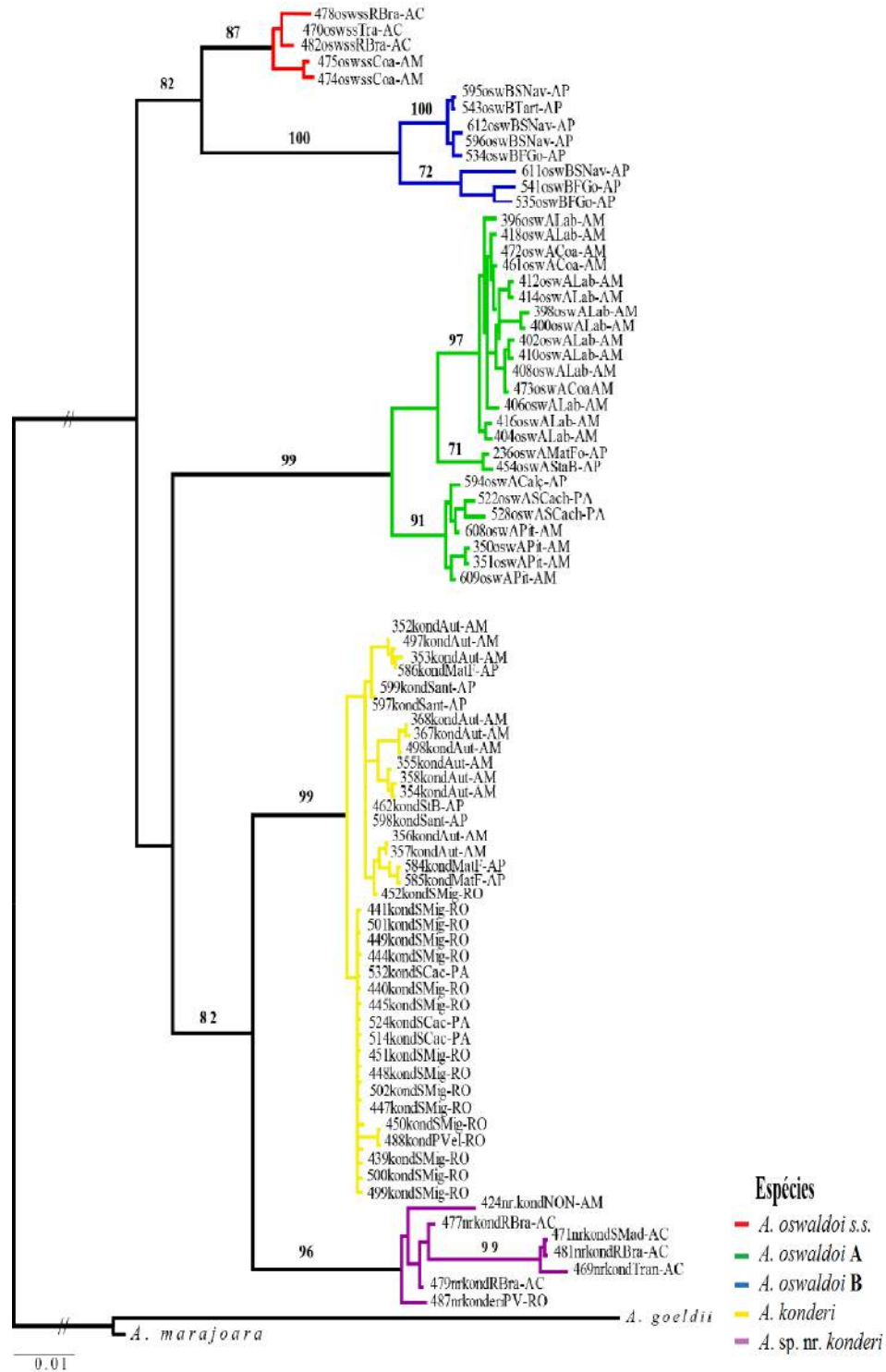


Figura 8. Árvore de máxima verossimilhança (MV) de *COI*, com valores de *bootstrap* sobre os ramos para 2.000 pseudo-réplicas analisadas.

Antes da IB, as sequências de *COI* e *ITS2* foram testadas quanto à incongruência nos comprimentos de ramos diferentes *ILD* (*Incongruence Length Difference*) no programa *PAUP**. Esta análise resultou no valor de $p=0,001$ que indica incongruência entre os marcadores. Na IB realizada separadamente, os modelos evolutivos utilizados foram, respectivamente, HKY + I + G para *COI* e o GTR + G (*General Time Reversible*) para *ITS2*.

A topologia gerada por IB com dados do gene *COI* também revelou a separação dos clados, representando as espécies com alto suporte de probabilidade posterior (Figura 9). Entretanto, as topologias das árvores foram distintas para cada marcador. No gene *COI* todas as espécies tiveram alto valor de probabilidade posterior e monofilia recíproca. As espécies *A. oswaldoi* s.s. e *A. oswaldoi* B, mantiveram relação filogenética próxima, assim como *A. konderi* e *A. sp. nr. konderi*. A diferença foi encontrada em *A. oswaldoi* A, que teve relação basal com o clado maior que representa as quatro espécies. Na árvore do gene *ITS2*, *A. oswaldoi* s.s. ficou próxima de *A. oswaldoi* A e estes dois subclados mais estreitamente relacionados a *A. oswaldoi* B, formando assim, um clado somente de espécies do complexo *A. oswaldoi* s.l. Enquanto que, as espécies *A. konderi* e *A. sp. nr. konderi* apresentaram baixa resolução, com ramos curtos (Figura 9).

Na IB com dados concatenados, em que a matriz de dados do *COI* foi reduzida para o mesmo número de sequências de *ITS2* ($n=27$), o modelo evolutivo para *COI* foi GTR + I + G. Neste modelo, além dos parâmetros descritos acima, assume também a proporção de *sítios* invariáveis. A árvore de gene com dados concatenados separou as cinco espécies em clados com elevado suporte de probabilidade posterior, mas as relações filogenéticas entre espécies só foram observadas, novamente, entre *A. oswaldoi* s.s. e *A. oswaldoi* B. As subdivisões (prováveis linhagens) observadas nos subclados representados por *A. oswaldoi* B, *A. oswaldoi* A, *A. konderi* e *A. sp. nr. konderi* também foram obtidas na análise de IB com dados concatenados (Figura 10).

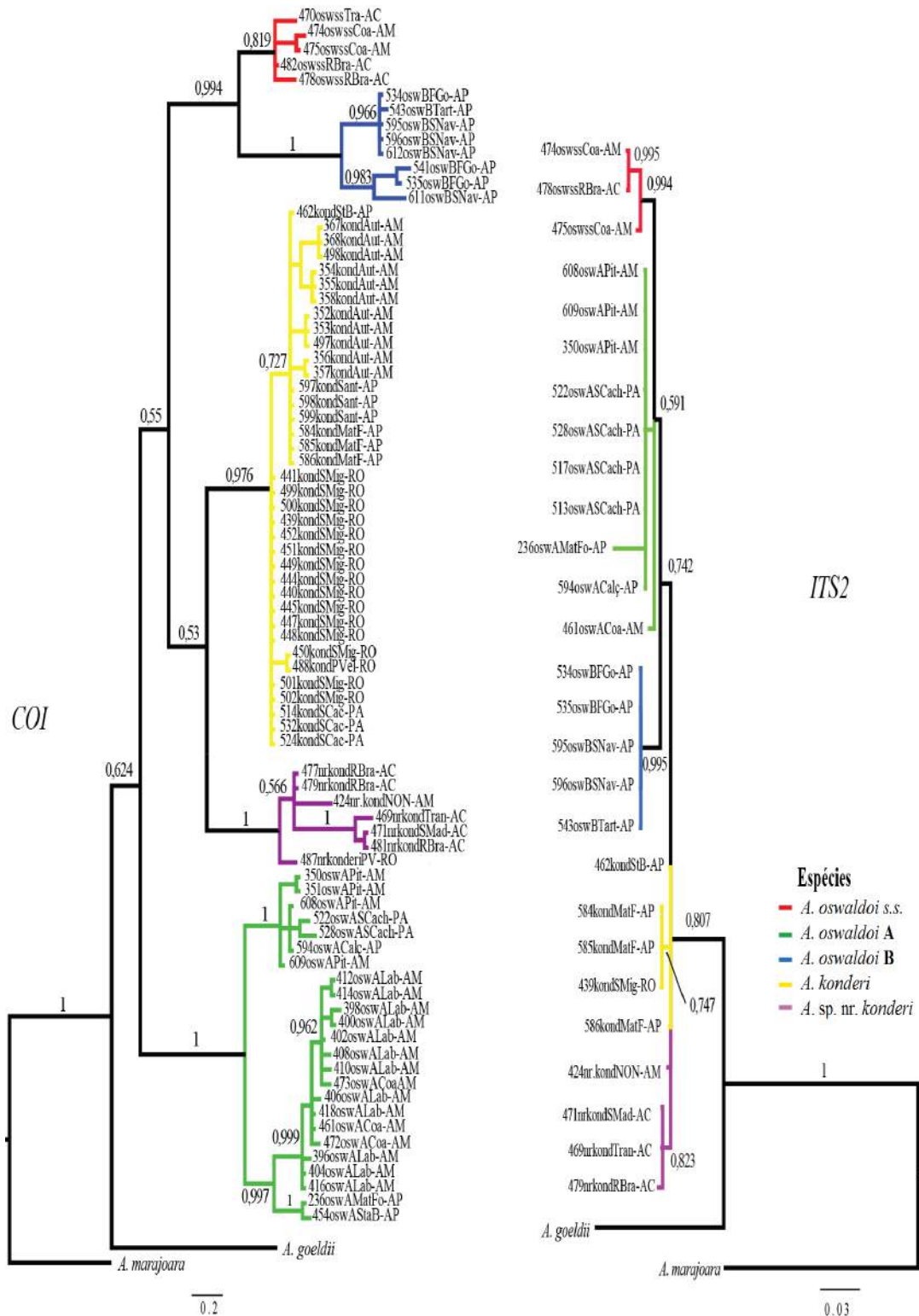


Figura 9. Árvore de genes inferidas por meio de Inferência Bayesiana (IB) separada (*COI* e *ITS2*), utilizando os respectivos modelos evolutivos HKY + I + G e GTR + G. Os valores de probabilidade posterior estão representados sobre os ramos.



Figura 10. Árvore de genes analisadas por meio de Inferência Bayesiana (IB) com dados concatenados (*COI* + *ITS2*), utilizando modelos evolutivos distintos (*COI* = GTR + I + G e *ITS2* = GTR + G). Os valores de probabilidade posterior estão representados sobre os ramos.

A análise de IB realizada no **BEAST*, com dados combinados (*COI* e *ITS2*), para estimar uma árvore de espécies, utilizou os mesmos modelos selecionados na IB. A árvore

gerada resultou da análise de métodos de inferência conjunta das topologias das árvores, assumindo um *prior Yule-Coalescence (YC)*, com uma taxa (desconhecido) constante de nascimento de linhagens para cada ramo da árvore, considerando o tamanho das populações e das árvores de genes amostrados. A relação recuperada entre as espécies foi, respectivamente, *A. oswaldoi* s.s. e *A. oswaldoi* B como clados próximos. *A. oswaldoi* A, *A. konderi* e *A. sp. nr. konderi* em um outro grande clado, sendo esta última espécie a irmã das demais (Figura 11). Dentre as análises evolutivas realizadas, a árvore de espécies forneceu resolução filogenética.

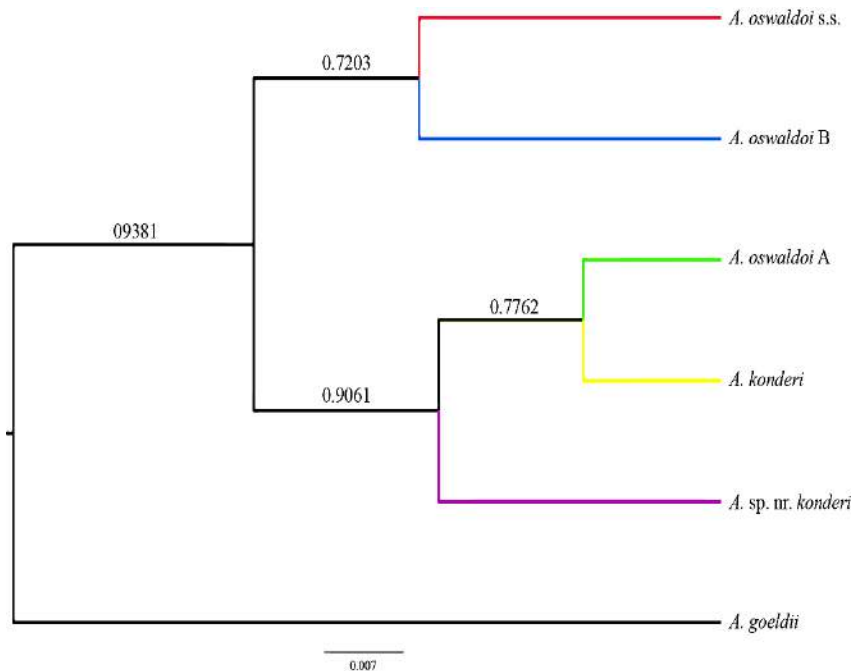


Figura 11. Árvore de espécies por meio de Inferência Bayesiana com dados concatenados. Os valores de probabilidade posterior representados sobre os ramos. Análise realizada no programa **BEAST*.

O tempo de divergência obtido a partir da análise bayesiana (Figura 12) indicou uma idade de 0,9 (0.7 a 1.0) Milhões de anos (Ma) para o evento de diversificação mais recente que foi entre *A. oswaldoi* s.s. e *A. oswaldoi* B. Em seguida, 1.1 (0.8 a 1.3) Ma para as espécies *A. oswaldoi* A e *A. konderi* e o evento de cladogênese entre *A. sp. nr. konderi* com o clado formado por *A. oswaldoi* A e *A. konderi* foi datado de aproximadamente 1.8 (1.3 a 2.2) Ma. Por fim, o nó que indica o primeiro evento de cladogênese entre os dois grandes clados foi de aproximadamente 2.8 (1.4 a 5.0) Ma. Portanto, o processo de diversificação deste grupo de espécies ocorreu no limite entre os períodos do Neogeno (Plioceno) e do Quaternário (Pleistoceno).

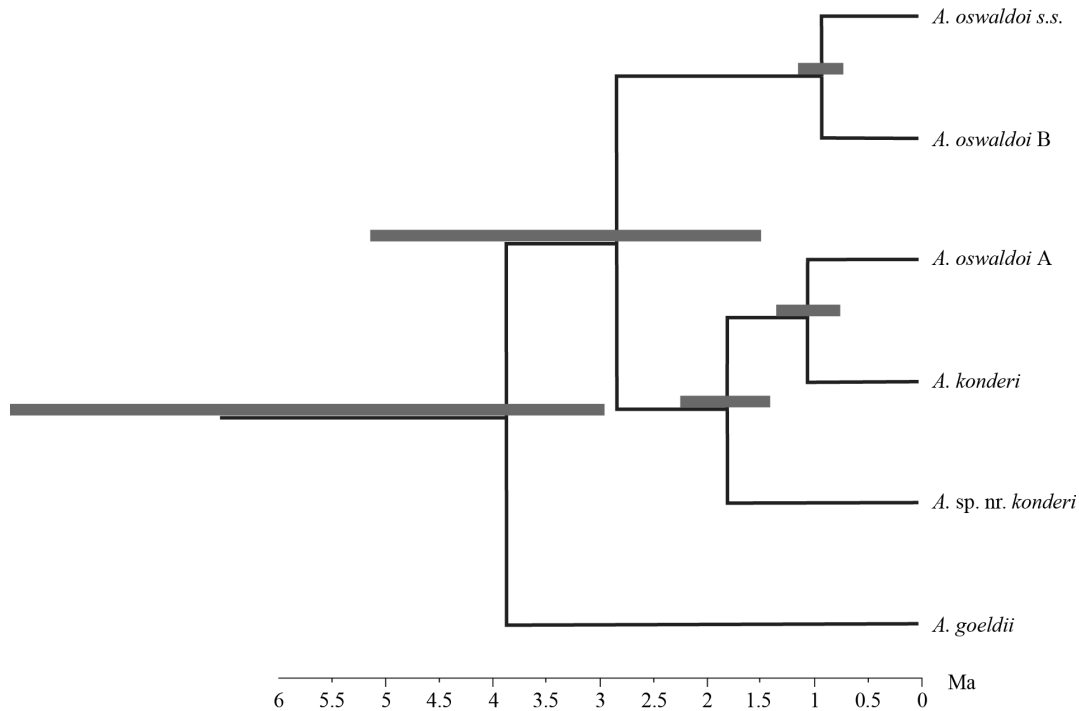


Figura 12 Tempo de diversificação das espécies estimado no Programa *BEAST* com dados mitocondriais (*COI barcode*) usando critério de Inferência Bayesiana e taxa de calibração de 2.3% para cada milhão de anos.

5.4. Distribuição dos complexos *A. oswaldoi* e *A. konderi*

A partir dos dados existentes na literatura (Marrelli *et al.*, 1999b; Scarpassa e Conn, 2006; Motoki *et al.*, 2006; Sallum *et al.*, 2008; Motoki *et al.*, 2009; Motoki *et al.*, 2011; Ruiz *et al.*, 2013) e do presente estudo foi possível estimar preliminarmente a distribuição geral dos membros de *A. oswaldoi* s.l. e *A. konderi* s.l.

Anopheles oswaldoi s.s. apresentou distribuição disjunta, com ocorrência até o momento na Amazônia oriental brasileira e na região sudeste do Brasil. Os estudos anteriores indicavam a presença de *A. oswaldoi* s.s. nos Estados de Espírito Santo e Rio de Janeiro (localidades tipo) por Peryassú (1922), Estado de São Paulo por Motoki *et al.* (2007), Amazonas (Tefé) por Ruiz *et al.* (2013) e no Estado de Rondônia por Scarpassa e Conn (2006). Os resultados do presente estudo confirmam a presença desta espécie nos Estados do Acre, Amazonas e Rondônia. *Anopheles oswaldoi* B foi registrada por Ruiz *et al.* (2013) na Colômbia (Antioquia, Caquetá, Meta, Norte de Santander e Putumayo), Equador (Orellana) e Trinidad e Tobago (Valência), na Venezuela (Ocamo), Peru (Yurimaguas) e por Marrelli *et al.* (1999b) no Brasil (Estado do Amapá, município de Santana). O presente estudo confirmou

a ocorrência de *A. oswaldoi* B em três localidades do Estado do Amapá (municípios de: Serra do Navio, Ferreira Gomes e Tartarugalzinho). Estudos anteriores indicaram a espécie *A. oswaldoi* A nos municípios de Tefé (Amazonas), Mato Grosso e na Amazônia colombiana por Ruiz *et al.* (2013), município de Acrelândia (Acre) por Sallum *et al.* (2008), Plácio de Castro (Acre), Costa Marques (Rondônia) e Novo Airão/ (Amazonas) por Marrelli *et al.* (1999b) e Moju (Pará) por Scarpassa e Conn (2006). O presente estudo registrou esta espécie nos municípios de: Coari, Lábrea, Presidente Figueiredo (todas no Amazonas), Calçoene, Macapá (Amapá) e Oriximiná (Pará) (Figura 12A).

No complexo *A. konderi* s.l., a espécie *A. konderi* também apresentou distribuição geográfica disjunta, com populações no sul e norte do Brasil. Esta espécie foi registrada no município de Coari (Amazonas) (localidade tipo) por Galvão e Damasceno (1942), nos Estados do Acre e Amapá por Sallum *et al.* (2008) e Paraná por Motoki *et al.* (2011). Neste estudo, esta espécie foi registrada também nos municípios de Autazes (Amazonas), Santana (Amapá) e Oriximiná (Pará). A espécie *A. sp. nr. konderi* só havia sido registrada no Equador, Peru e no Brasil (Estado do Acre) por Ruiz *et al.* (2013). No presente estudo, *A. sp. nr. konderi* foi encontrada nos municípios de Sena Madureira/ (Acre), Porto Velho (Rondônia) e Nova Olinda do Norte (Amazonas) (Figura 12B).

Com base na distribuição geral dos membros dos complexos e dos resultados deste estudo, áreas de simpatria, entre as cinco espécies na Amazônia brasileira foram constatadas nos Estados do Amapá (Mata Fome), Pará (Serra do Cachorro), Amazonas (Coari), Acre (Rio Branco e Transacreana) e Rondônia (Porto Velho) (Figura 13).

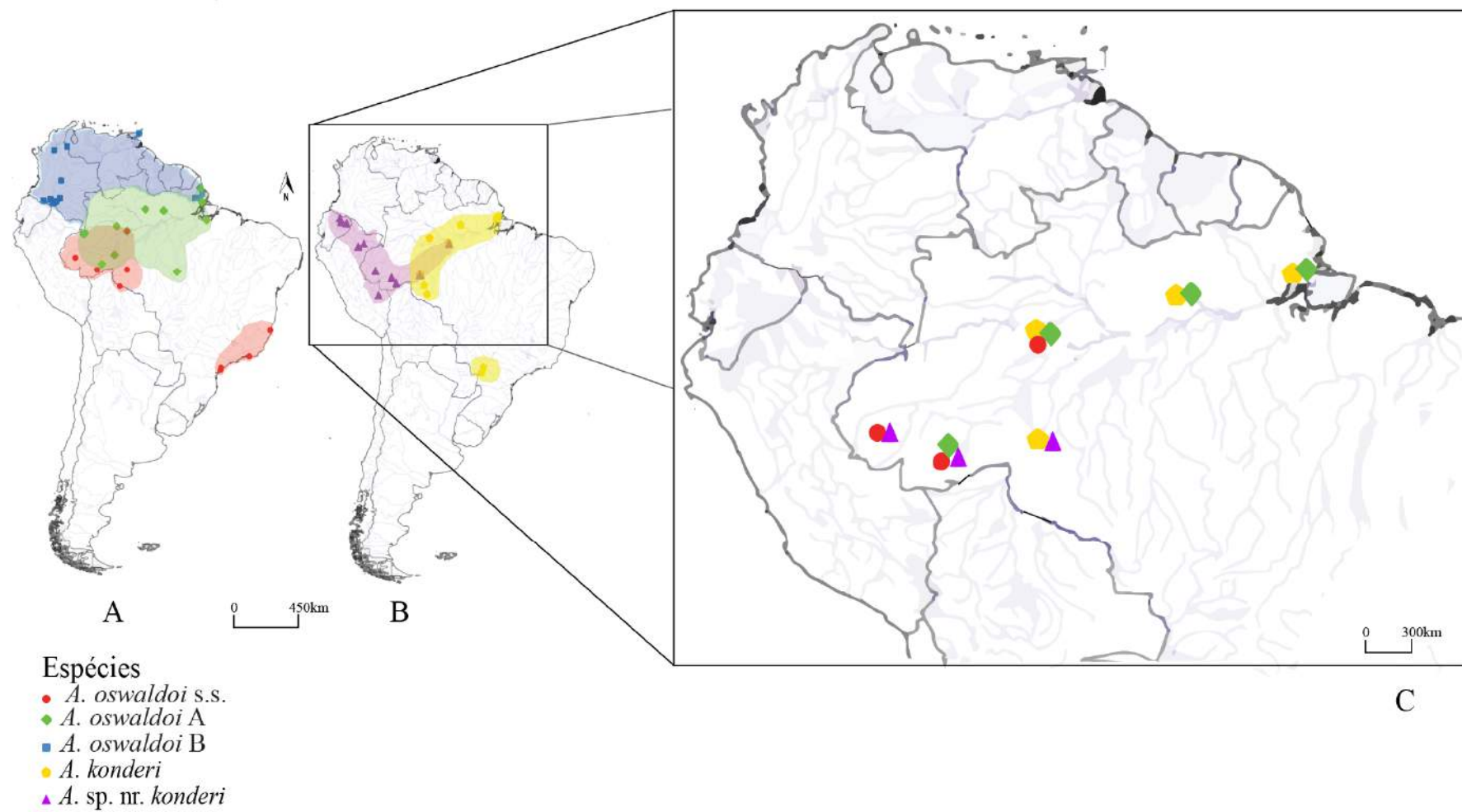


Figura 13. Estimativa das áreas de ocorrência das espécies nos complexos *A. oswaldoi* (A), *A. konderi* (B) e os pontos de simpatria (C).

6. DISCUSSÃO

6.1. Taxonomia molecular de *A. oswaldoi* s.l. e *A. konderi* s.l.

As análises realizadas com os dois marcadores moleculares mostraram clara evidência de que os complexos *A. oswaldoi* s.l. e *A. konderi* s.l. são constituídos de cinco espécies distintas com evidências de parafilia entre *A. konderi* e *A. oswaldoi* A. As análises filogenéticas realizadas com o fragmento *COI* barcode evidenciaram o processo de formação de linhagens, especialmente para *A. oswaldoi* A. Todas as espécies destes complexos ocorrem na região amazônica brasileira, conforme previsto por Ruiz *et al.* (2013).

Neste estudo, os dois marcadores utilizados foram eficientes para separar taxonomicamente os membros de cada complexo, como foi observado por Motoki *et al.* (2011) no complexo *A. konderi* s.l., por Ruiz *et al.* (2013) no complexo *A. oswaldoi* s.l. e por Marrelli *et al.* (1999b) e Scarpassa e Conn (2006) em separar grupos em ambos os complexos. Estes marcadores foram utilizados com sucesso na identificação taxonômica de membros de complexos de espécies crípticas em mosquitos por Hackett *et al.* (2000), Sedaghat *et al.* (2003), Cywinska *et al.* (2006) e Kumar *et al.* (2007).

As distâncias genéticas obtidas com o *COI barcode* (modelo *K2P*) evidenciaram *barcoding gap* de 0,004 (0,4%). Hebert *et al.* (2004) demonstraram que o *barcoding gap* permite a descoberta de novas espécies. Contudo, em espécies estreitamente relacionadas, como em complexos de espécies crípticas, pode ocorrer sobreposição de distâncias, isso se deve principalmente aos processos de formação de linhagens (Meyer e Paulay, 2005; Elias *et al.*, 2007) e de divisão incompleta de linhagens. Os resultados sugerem a presença de três linhagens genética em *A. oswaldoi* A, com distância genética de 1,5% entre *oswA2* e *oswA3*, de 2,3% entre *oswA1* e *oswA3* e de 2,4% entre *oswA1* e *oswA2*. Além de *A. oswaldoi* A, detectou-se também provável existência de linhagens genéticas dentro de *A. oswaldoi* B, de *A. konderi* e de *A. sp. nr. konderi*, cada uma com duas prováveis linhagens. A presença de linhagens dentro destas espécies, especialmente para *A. oswaldoi* A, provavelmente tenha influenciado no baixo *barcoding gap* (0,4%) obtido neste estudo. Além da divisão incompleta de linhagens e de espécies com divergência muito recente, outros fatores também podem influenciar no baixo ou na ausência do *barcoding gap*, tais como, espécies que contém populações significativamente estruturadas, populações com tamanhos efetivos elevados ou

ainda a presença de haplótipos altamente divergentes entre populações (Scarpassa e Alencar, 2013).

Ruiz *et al.* (2013), utilizando o mesmo gene, obtiveram distâncias genéticas intraespecíficas de 0,7% em *A. oswaldoi* s.s. e de 2% em *A. oswaldoi* B. As distâncias genéticas interespecíficas atingiram 6,4% entre *A. oswaldoi* A e *A. oswaldoi* B. Motoki *et al.* (2011) obtiveram diferenças de 0,3% a 1,2% em espécimes do Paraná e Rondônia de *A. konderi* s.l. e variação de 2,9% a 3,7% entre espécimes do Amapá e as do Paraná e Rondônia. Apenas um espécime do Acre diferiu de todos os outros em 3,4% a 4,6%. Este resultado não foi observado no presente estudo, em que as linhagens *kond1* e *kond2* de *A. konderi* (Figura 5) mostraram valores muito baixos de distância genética, de 0,006 (0,6%) e sobreposição de 0,009 (0,9%) entre as distâncias intra e inter-linhagem. Sobreposições de distâncias genéticas intra e interespecíficas foram evidenciadas por Bourke *et al.* (2013) no complexo *A. strodei* que é atualmente reconhecido com sete espécies estreitamente relacionadas. Similarmente, Moreno *et al.* (2013) encontraram valores de distâncias genéticas de 0,2% entre *A. halophylus* e *A. triannulatus* C, onde os autores interpretaram que estas “espécies” são mais estreitamente relacionadas e podem ser consideradas como espécies incipientes.

Gutiérrez *et al.* (2010) estudaram populações de *A. janconnae* da Venezuela e Brasil e obtiveram valor médio de distância genética de 2,8% (2,4%-3,1%). Ruiz *et al.* (2005) recomendaram um limite de distância mínima de 2% para separar espécies de anofelinos. No entanto, distâncias inferiores ou sobreposição de distâncias segundo Meyer e Paulay, (2005) também podem ser resultados de subamostragens de espécies estreitamente relacionadas. Scarpassa e Alencar, (2013) estudaram o DNA *barcoding* de dois vetores de *Leishmania* na Amazônia brasileira, *Lutzomyia umbratilis* e *Lutzomyia anduzei* e obtiveram distância genética média intraespecífica de 0,8% (0,2%-1,0% e 0,8%-1,4%, respectivamente), enquanto que a distância genética média interespecífica foi 4,4% (4,1%-4,6%), apoiando o *barcoding gap*. Entretanto, em grupos altamente diversos como o gênero *Culex* estudado por Laurito *et al.* (2013), este método foi sensível ao reconhecimento de linhagens. Os autores identificaram 12 linhagens em cinco espécies morfológicas deste gênero, onde as divergências intraespecíficas alcançaram 3%, quase o dobro da distância interespecífica entre *Culex quinquesfasciatus* e *Culex pipiens* (1,6%).

Embora no presente estudo tenha havido *barcoding gap* de 0,4%, este valor está muito abaixo do recomendado para separar espécies. Por outro lado, as análises filogenéticas e a análise de haplótipos (rede de haplótipos) do *COI barcode* evidenciaram uma clara separação

das espécies com elevado suporte estatístico, além da constatação que os dois complexos são parafiléticos.

Os haplótipos identificados formaram seis redes independentes representando as cinco espécies identificadas. De acordo com um conceito biológico de espécie, o que permite algum grau de hibridação entre espécies (Coyne e Orr, 2004), uma espécie deve corresponder a uma população interconectada na rede de haplótipos. Estas populações são subconjuntos de nós com uma densidade elevada de ligações dentro do grupo e uma densidade baixa ou ausência de ligações entre diferentes grupos (Newman, 2003).

As cinco espécies foram representadas por seis redes de haplótipos no gene *COI barcode*, indicando ausência de fluxo gênico. A maior estruturação genética encontrada foi na espécie *A. oswaldoi* A e *A. konderi* (Avisé e Wollenberg, 1997) e a menor estruturação foi evidenciada nas espécies *A. sp. nr. konderi*. *A. oswaldoi* B apresentou duas populações desconexas, mesmo após serem inseridas sequências disponíveis no *GenBank* e uma nova análise no *TCS*, os haplótipos H29 e H30 (Ferreira Gomes e Serra do Navio) permaneceram isolados. Hipóteses de especiação incipiente dentro de *A. oswaldoi* A não são conclusivas com nossos dados. Portanto, estes dados sugerem a necessidade de se realizar estudo de genética de populações analisando espécimes e localidades adicionais, com o objetivo de identificar haplótipos perdidos e/ou inferir se existe ou não estrutura genética nesta espécie ou ainda, confirmar um evento de cladogênese recente em *A. oswaldoi* A.

Na divergência média intraespecífica das espécies, calculada com o marcador *ITS2*, as distâncias foram baixas (0,4% em *A. konderi*, 0,3% em *A. oswaldoi* s.s., 0,2% em *A. sp. nr. konderi* e 0% em *A. oswaldoi* A e *A. oswaldoi* B). Entretanto, o gene *ITS2* analisado separadamente, por meio de IB, foi sensível para subdividir as cinco espécies observadas nas análises com o gene *COI barcode*, embora tenha apresentado ramos curtos, suporte baixo e topologia distinta de *COI*. Em estudos de taxonomia molecular, o marcador *ITS2* teve sucesso na separação dos membros de cada complexo (Porter e Collins, 1991; Crabtree *et al.*, 1997; Miller *et al.*, 1996; Lounibos *et al.*, 1998; Marrelli *et al.*, 1999b, Hackett *et al.*, 2000; Manonmari *et al.*, 2001; Garros *et al.*, 2004; Wilkerson *et al.*, 2004 e Motoki *et al.*, 2007). Por outro lado, estudos que abrangem a sistemática molecular e a filogeografia em anofelinos, os resultados com *ITS2* não são conclusivos (Gómez *et al.*, 2015). Enquanto que diversos processos no marcador mitocondrial, como introgressão ou divisão incompleta de linhagens, também podem ser responsáveis pela análise filogenética inconclusiva dentro de espécies crípticas (Moreno *et al.*, 2013).

6.2. Relações filogenéticas

As análises filogenéticas evidenciaram cinco clados reciprocamente monofiléticos com alto suporte de *bootstrap*. No entanto, variaram na topologia interna de acordo com as análises filogenéticas realizadas. O teste *ILD* de Farris *et al.* (1995) aplicado nas sequências de *COI barcode* e *ITS2* foram incongruentes. O teste de incongruência foi realizado em caráter exploratório e não restritivo, pois estudos prévios mostram que mesmo diante de uma provável incongruência, resultados importantes podem ser obtidos em análises concatenadas de grupos aparentemente conflitantes (Remsen e DeSalle, 1988, Driskell *et al.*, 2004 e Gatesy *et al.*, 2004). Além disso, os valores de P, do teste de incongruência (ILD), apresentam baixa correlação com a melhora na resolução filogenética resultante da concatenação (Barker e Lutzoni, 2002).

Dessa forma, neste estudo mesmo diante de heterogeneidade estatística, a concatenação e análise simultânea das sequências foram realizadas. A principal diferença encontrada foi em relação à espécie *A. oswaldoi* A que apresentou estar mais relacionada ao complexo *A. konderi* s.l. na análise de MV e obteve uma posição basal em relação aos demais clados, na análise de IB, ambas com o gene *COI barcode*. Diferenças nas topologias das árvores também foram observadas com a IB analisada separadamente com *COI barcode* e *ITS2*. Na IB com *ITS2*, *A. oswaldoi* A foi mais estreitamente relacionado ao *A. oswaldoi* s.s. e *A. oswaldoi* B foi mais basal em relação as duas espécies. Na análise concatenada esta relação não foi recuperada permanecendo apenas alto valor de probabilidade posterior nos grupos identificados, levando a considerar que na realidade os complexos *A. oswaldoi* s.l. e *A. konderi* s.l. compreendem um único complexo de espécies com estreito relacionamento filogenético, como foi sinalizado por Ruiz *et al.* (2013), no entanto, estes autores analisaram apenas uma sequência de *A. konderi* s.l., enquanto que no presente estudo, 38 sequências de *A. konderi* foram avaliadas conjuntamente com as demais sequências de *A. oswaldoi* s.l.

No complexo *A. oswaldoi* s.l. as análises filogenéticas evidenciam subclados (linhagens), nas espécies *A. oswaldoi* A, *A. oswaldoi* B, *A. sp. nr. konderi* e *A. konderi*. Com exceção de *A. oswaldoi* A e *A. konderi*, o limitado número de espécimes analisados, tornam a evidência de linhagens inconclusivas (Meier *et al.*, 2008). Na espécie *A. oswaldoi* A todas as análises filogenéticas apresentaram uma topologia comum com três subclados. O primeiro

subclado formado por espécimes de Lábrea e Coari (Amazonas), o segundo por indivíduos da Serra do Cachorro (Pará), Pitinga (Amazonas) e Calçoene (Amapá) e o terceiro por Mata Fome e Fazenda Santa Barbara (Amapá).

Para *A. konderi* Motoki *et al.* (2011) sugeriram três espécies para este complexo. Nossos dados corroboram apenas a ocorrência de dois clados no complexo *A. konderi* s.l., o primeiro representa a espécie *A. sp. nr. konderi* e o segundo *A. konderi*. No presente estudo, também foram constatados dois subclados dentro da espécie *A. konderi*, mas o suporte e as distâncias genéticas foram baixos. Um dos subclados está representado por espécimes do Amapá e Amazonas, e o segundo por indivíduos de Rondônia e Pará. Porém, na análise conjunto dos dados obtidos e as sequências do *GenBank*, as amostras de Motoki *et al.* (2011), especificamente o clado representando os Estados do Paraná e Rondônia, agruparam no clado de *A. oswaldoi* s.s. refutando a existência de uma terceira ‘espécie’ neste complexo. Portanto, com base na nossa IB o clado *A. konderi* (Paraná/Rondônia) de Motoki *et al.* (2011) são na verdade *A. oswaldoi* s.s. Esta informação foi confirmada com as demais sequências disponíveis neste banco de dados, incluindo as de Motoki *et al.* (2007) e de Ruiz *et al.* (2013).

Na análise de IB realizada com o *ITS2*, a topologia da árvore gerou grupos que permitiram separar as cinco espécies identificadas. Contudo, em decorrência da presença dos ramos curtos obtidos, nenhuma linhagem ou subclado dentro das espécies identificadas foi observada com este marcador. O *ITS2* apresenta elevada taxa de variação, comparado a outros marcadores nucleares e as suas múltiplas cópias *in tandem* tendem a evoluir de forma semelhante dentro de uma mesma população, devido à ação de mecanismos conhecidos como evolução em conserto (Dover, 1982). O efeito da evolução em conserto em homogeneizar as múltiplas cópias dos espaçadores de DNAr intra-populacionalmente, associado com a tendência à rápida divergência de suas sequências entre populações, conferem a este gene a propriedade de marcador molecular recomendável para separar espécies próximas (Correa *et al.*, 2014). Para contornar os vícios da opção de se utilizar apenas um marcador em taxonomia molecular, o uso concatenado de dois ou mais genes têm sido o método de escolha em muitos estudos recentes (McKeon *et al.*, 2010; Foster *et al.*, 2013; Bourke *et al.*, 2013; Moreno *et al.*, 2013).

Na análise de IB concatenada, as relações evolutivas das espécies não foram recuperadas, exceto na análise Bayesiana para inferência da árvore de espécie (Figura 11). A IB concatenada suportou grupos separados. A árvore de espécies gerou dois grandes clados. Um dos clados agrupou *A. oswaldoi* s.s. e *A. oswaldoi* B, sugerindo que as duas são mais

estritamente relacionadas. O outro clado foi constituído por *A. oswaldoi* A e *A. konderi*, seguido por *A. sp. nr. konderi*, esta última de posição basal. A topologia obtida na árvore de espécie sugere que *A. oswaldoi* A e *A. konderi* são mais estreitamente relacionadas do que entre *A. konderi* e *A. nr. konderi*. Todos os ramos na árvore de espécies apresentaram probabilidade posterior que variou de baixo a moderado, e de moderado a alto nas demais inferências bayesianas.

6.3. Tempo de divergência, distribuição e incriminação de vetor da malária

De acordo com a datação molecular, estimada por meio do gene *COI*, o primeiro evento de diversificação neste grupo ocorreu no limite entre os períodos Neogeno (Plioceno) e Quaternário (Pleistoceno). Durante o Plioceno, grandes lagos formava a paisagem amazônica resultante de intervalos de incursão marinha provocadas provavelmente pela orogênese da cordilheira dos Andes e a elevação no nível do mar (Webb, 1995). Segundo Conn e Mirabello, (2007) o primeiro evento de diversificação em *Anopheles nuneztovari* ocorreu no intervalo do Mioceno-Plioceno. Este evento teria isolado três regiões com relevo mais altos, representado pelos Escudos das Guianas, Escudo brasileiro e a cordilheira dos Andes. Esta hipótese também é corroborada pela distribuição e tempo de divergência entre *A. marajoara* e *A. albitarsis* E por Conn e Mirabello, (2007), em *Lutzomyia longipalpis* s.l. por Arrivillaga *et al.* (2002) e entre *Rhodinus prolixus* e *Rhodinus robustus* por Monteiro *et al.* (2003).

Segundo revisão recente, de Turchetto-Zolet *et al.* (2013), sobre os padrões filogeográficos na América do Sul, oscilações climáticas ocorridas no Pleistoceno como os eventos orogênicos do Mioceno/Plioceno ajudaram a moldar a diversidade e a distribuição das linhagens recentes. Durante os ciclos glaciais do Pleistoceno, acredita-se que os eventos de expansão e retração florestal somado a presença de grandes rios teriam possivelmente funcionado como barreiras físicas para as espécies terrestres promovendo eventos de diversificação por vicariância. Haffer (1969) sugeriu que no Pleistoceno a floresta amazônica retraiu e expandiu segundo os eventos climáticos, gerando refúgios florestais que teriam isolado as populações fundadoras. Entretanto, evidências recentes apontam que neste período a floresta amazônica se manteve resiliente, e, portanto, florestada (Colinvaux *et al.*, 2000; Bush e de Oliveira, 2006). Com base nas evidências apontadas por estes estudos, é possível que as incursões marinhas, com a formação de três regiões contribuíssem no processo inicial de diversificação dos membros de *A. oswaldoi* s.l. e *A. konderi* s.l. via especiação alopátrica

(Mayr, 1998) e posteriormente, devido ao isolamento dos ambientes e conseqüentemente as grandes extensões dos rios estas populações, ao longo do tempo, foram acumulando diferenças a cada um dos ambientes e mais tarde com a expansão de seus limites geográficos tiveram contato secundário, no entanto, já como espécies distintas (zonas de contato secundário). Contudo, enfatizamos que estas estimativas de tempo de diversificação poderão ser mais bem suportadas com o emprego de outros marcadores genético-moleculares, incluindo o nuclear (Mirabello e Conn, 2006, 2008; Conn e Mirabello, 2007).

Quanto a distribuição geográfica, a espécie *A. oswaldoi* s.s. teve sua ocorrência confirmada, além da localidade tipo Espírito Santo e Rio de Janeiro, também para os Estados de Amazonas (município de Coari) e Acre (rodovia Transacrea e Rio Branco). Estudos prévios também registraram esta distribuição (Motoki *et al.* 2007, Ruiz *et al.*, 2013).

Anopheles oswaldoi B foi detectada no município de Serra do Navio, Tartarugalzinho e Ferreira Gomes, todas no Estado do Amapá. Marrelli *et al.* (1999b) registraram esta espécie na Ilha de Santana (Estado do Amapá). Neste estudo, apenas *A. konderi* foi registrada na Ilha de Santana. A espécie denominada por Ruiz *et al.* (2013) como *A. sp. nr. konderi* foi registrada neste estudo nas localidades de Nova Olinda do Norte (Estado do Amazonas), Senador Guimar, Sena Madureira e Rodovia Transacrea (Estado do Acre).

Dentre as espécies encontradas neste estudo, verificou-se preliminarmente que espécies podem apresentar preferências ecológicas específicas, que agora precisam ser **melhores investigadas**. Estudos que fornecem as preferências ambientais e comportamentais para *A. oswaldoi* s.l. e *A. konderi* s.l. já haviam detectado esta heterogeneidade na bionomia (Flores-Mendoza, 2004; Quiñones *et al.*, 2006; Dusfour *et al.*, 2012; Pinault e Hunter, 2012).

A grande área de simpatria na Amazônia oriental, que compreende os Estados do Acre, Amazonas e Rondônia, dificulta a incriminação dos membros de *A. oswaldoi* e *A. konderi*. Marrelli *et al.* (1999b) detectaram maior taxa de inoculação em *A. oswaldoi* s.l. do que em *A. konderi*, Ruiz *et al.* (2013) haviam incriminado as espécies *A. oswaldoi* A, *A. oswaldoi* B e *A. sp. nr. konderi*, considerando a origem geográfica das mesmas. Nossos dados registram três membros do complexo *A. oswaldoi* s.l. nesta região. Portanto, a presença de três espécies simpátricas deste complexo gera dúvidas de qual espécie Marrelli *et al.* (1999b) haviam incriminado como vetor.

Tadei *et al.* (1998) coletaram um espécime infectado por *P. falciparum* em Cachoeira da Porteira (Pará), localidade próxima a Serra do Cachorro (Pará) registrada como área de simpatria entre *A. oswaldoi* A e *A. konderi* deste estudo. Segundo os resultados de Marrelli *et*

al. (1999b) e de Ruiz *et al.* (2013), a espécie *A. oswaldoi* A poderia ser incriminada como vetor, entretanto, as amostras analisadas por Marrelli *et al.* (1999b) foram de localidades detectadas posteriormente como áreas de simpatria (AC e RO), em que nossos dados e da literatura confirmaram a presença de três espécies (*A. oswaldoi* s.s., *A. konderi* e *A. sp. nr. konderi*). Santos *et al.* (2005) coletaram dois espécimes infectados com *P. vivax* em Anajás (Pará). De acordo com dados da literatura, nesta localidade foi somente capturada *A. konderi*. Portanto, nossos resultados demonstraram que ao menos uma espécie ou linhagem do complexo *A. konderi* s.l. possa ser vetor de malária na porção oriental da Amazônia brasileira.

Nossos resultados confirmam que *A. oswaldoi* B é potencialmente vetor de malária no norte da Amazônia (Escudo das Guianas). Ruiz *et al.* (2013) e Quiñones *et al.* (2006) incriminaram *A. oswaldoi* B na Colômbia e Rubio-Palis *et al.* (2013) na Venezuela. Dusfour *et al.* (2012) encontraram um espécime de *A. oswaldoi* s.l. infectado na Guiana Francesa e Póvoa *et al.* (2001) na Serra do Navio (Amapá), ambos com *P. falciparum*. Nossos estudos confirmam a ocorrência de *A. oswaldoi* B em Serra do Navio (Amapá). Com base em nossos resultados e dos estudos anteriores, é possível inferir a ocorrência de *A. oswaldoi* B em toda a faixa norte da América do Sul. Devido à possível distribuição alopátrica de *A. oswaldoi* B, bionomia e relatos confirmados com identificação molecular e infecção desta espécie, é possível também que *A. oswaldoi* B seja vetor de malária, além das listadas acima, no norte do Estado do Amapá, Guiana Francesa, Suriname, Guiana Inglesa e norte do Estado de Roraima (Brasil).

Uma amostragem mais ampla na Amazônia brasileira deve ser realizada, com identificação molecular acompanhada com testes de infecção para *Plasmodium* spp. nas espécies dos complexos *A. oswaldoi* e *A. konderi*, com o objetivo de identificar os potenciais vetores, considerando que apenas uma espécie foi incriminada neste estudo e que pelo menos duas ou mais sejam vetores (locais, secundários ou potenciais) de malária na região amazônica (Tadei *et al.*, 1998, Marrelli *et al.*, 1999a e Santos *et al.*, 2005).

7. CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos neste estudo foi possível formular as seguintes conclusões:

- Os dois marcadores moleculares mostraram-se eficientes para separar os membros do (s) complexo (s) *A. oswaldoi* s.l. e *A. konderi* s.l. corroboradas por meio de redes de haplótipos, distâncias genéticas e relações filogenéticas. Confirmou-se a presença de cinco prováveis espécies: *A. oswaldoi* s.s., *A. oswaldoi* A, *A. oswaldoi* B, *A. konderi* e *A. sp. nr. konderi* na Amazônia brasileira.

- As análises filogenéticas permitiram inferir que os dois complexos são parafiléticos, e, portanto, podem ser considerados como um único complexo (complexo *Oswaldoi-Konderi*).

- Os elevados valores de distâncias genéticas intra/interespecífica, média de diferenças nucleotídicas (*K*) e as relações filogenéticas sugerem formação de linhagens especialmente em *A. oswaldoi* A. O baixo valor do *barcoding gap* ocorreu devido ao elevado valor de distância genética encontrada dentro da espécie *A. oswaldoi* A.

- O tempo de divergência estimado a partir do DNA *barcode* indicou que o mais antigo evento de diversificação ocorreu há aproximadamente 2.8 milhões de anos atrás (Plioceno), suportando a hipótese de incursão marinha.

- A partir de dados de distribuição geográfica e relatos positivos de infecção por *Plasmodium* spp. só foi possível inferir que *A. oswaldoi* B é potencialmente vetor de malária no extremo norte da Amazônia, conforme sua distribuição. Para as regiões: Central e Sul da Amazônia possivelmente existe (m) outra (s) espécie (s) com capacidade de transmitir o parasita da malária neste complexo.

- Considerando as áreas de simpatria, estudos concomitantes de taxonomia molecular e análises de infecção para detecção de *Plasmodium* spp. em espécimes procedentes da natureza são agora necessários para avaliar o potencial envolvimento de cada membro na transmissão da malária.

- Por fim, o presente estudo apresenta uma contribuição significativa ao entendimento das relações evolutivas dos membros do complexo *A. oswaldoi* s.l. e *A. konderi* s.l., assim como a distribuição geográfica destes membros, incluindo as áreas de simpatria e o provável vetor no extremo norte da Amazônia brasileira.

8. REFERENCIAS

- Adam L. B.; Derrick J. Z.; Michael P. C. 2014. A Gateway for phylogenetic Analysis Powered by Grid Computing Featuring GARLI 2.0. *Syst. Biol*, 63 (5): 812-818
- Alquezar, D. E.; Hemmerter, S.; Cooper, R. D.; Beebe, N. W. 2010. Incomplete concerted evolution and reproductive isolation at the rDNA locus uncovers nine cryptic species within *Anopheles longirostris* from Papua New Guinea. *BMC Evolutionary Biology*, 10: 392.
- Arrivillaga, J. C.; Norris, D. E.; Feliciangeli, M. D.; Lanzaro, G. C. 2002. Phylogeography of the Neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* inferred from mitochondrial DNA sequences. *Vol. 2(2)* pp. 83-95.
- Arruda, M.; Carvalho, M.B.; Nussenzweig, R.S.; Maracic, M.; Ferreira, A.W. E Cochrane, A.H. 1986. Potential vectors of malaria and their different susceptibility to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in northern Brazil identified by immunoassay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35: 873-881.
- Avise, J.; Wollenberg, K. 1997. Phylogenetics and the origin of species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 94, pp. 7748-7755.
- Barrett, R.; Hebert, P. 2005. Identifying spiders through DNA barcodes. *Can J Zool*, 83: 481 - 491.
- Barker, F. K.; Lutzoni, F. M. 2002. The Utility of the Incongruence Length Difference Test. *Syst. Biol.* Vol. 51, n°4, pp. 625-637.
- Beebe, N. W; Saul, A. 1995. Discrimination of all members of the *Anopheles punctulatus* complex by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis. *Am J Trop Med Hyg* 53:478-481.

- Bergo, E. S.; Souto, R. N. P.; Galardo, A. K. R.; Nagaki, S. S.; Calado, D. C.; Sallum, M. A. M. 2007. Systematic notes on *Anopheles* Meigen (Diptera:Culicidae) species in the state of Amapá, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Vol. 102, nº3, pp. 373-376.
- Bonne, C. 1923. Variability of *Anopheles tarsimaculata* Goeldi (Diptera: Culicidae). *Insecutor Inscitiae Menstruus*. 127-128 p.
- Bourke, B. P.; Oliveira, T. P.; Suesdek, L.; Bergo, E. S.; Sallum, M. A. M. 2013. A multi-locus approach to barcoding in the *Anopheles strodei* subgroup (Diptera: Culicidae). *Parasites & Vectors*, 6 (1): p. 111.
- Bousema, T.; Drakeley, C.; Gesase, S.; Hashim, R.; Magesa, S.; Mosha, F.; Otieno, S.; Carneiro, I.; Cox, J.; Msuya, E.; Kleinschmidt, I.; Maxwell, C.; Greenwood, B.; Riley, E.; Sauerwein, R.; Chandramohan, D.; Gosling, R. 2010 Identification of *Hot Spots* of Malaria Transmission for Targeted Malaria Control. *Journal of Infectious Diseases*, 201(11): 1764-1774.
- Branquinho, M.; Araújo, M.S.; Natal, D.; Marrelli, M.T.; Rocha, R. M.; Taveira, F.A.L.; Kloetzel, J. K. 1996. *Anopheles oswaldoi* a potencial malaria vector in Acre, Brazil. Short Report, *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 90:p 233.
- Branquinho, M. S.; Taípe Lagos, C. B.; Rocha, R. M.; Natal, D.; Barata, J. M. S.; Cochrane, A. H.; Nardin, E.; Nussenzweig, R. S.; Kloetzel, J. K. 1993. Anopheline in the state of Acre, Brazil, infected with *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, the variant *P. vivax* VK247 and *P. malariae*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 87(4): 391-394.
- Brochero, H.; Li, C.; Wilkerson, R. 2007. A newly recognized species in the *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *albitarsis* complex (Diptera: Culicidae) from Puerto Carreno, Colombia. *Am J Trop Med Hyg*, 76: 1113 - 1117.
- Brown A., 1994. Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 6491 – 6495.

- Bush, M. B.; Oliveira, P. E. D. 2006. The rise and fall of the refugial hypothesis of Amazonian speciation: a paleoecological perspective. *Biota Neotropica*, 6(1), 0-0.
- Calado, D.; Foster, P.; Bergo, E.; Dos Santos, C.; Galardo, A.; Sallum, M. 2008. 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*, 103: 791 - 799.
- Cidades, I.B.G.E. 2014. Informações estatísticas 2013. *Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas (IBGE)*. Acesso em, 24(02).
- Chromas Lites Technelysium, 2012. Disponível em: <http://technelysium.com.au/?page_id>.
- Coetzee, M.; Hunt, R. H.; Wilkerson, R.; Torre, A. D.; Coulibaly, M. B.; Besansky, N. J. 2013. *Anopheles coluzzi* and *Anopheles amharicus*, new members of the *Anopheles gambia* complex. *Zootaxa*: 3(3619): 246-274.
- Coluzzi, M.; Sabatini, A.; Della Torre, A.; Di Deco, M. A.; Petrarca, V. 2002. A polytene chromosome analysis of the *Anopheles gambiae* species complex. *Science*, 298 (5597): 1415-1418.
- Colinvaux, P. A.; De Oliveira, P. E.; Bush, M. B. 2000. Amazonian and neotropical plant communities on glacial time-scales: the failure of the aridity and refuge hypotheses. *Quaternary Science Reviews*, 19(1), 141-169.
- Collins, F. H.; Paskewitz, S. M. 1996. A review of the use of ribosomal DNA (DNAr) to differentiate among cryptic *Anopheles* species. *Insect Mol Biol* 5:1-9.
- Conn, J. E.; Mirabello, L. 2007. Biogeography and population genetics of neotropical vector species. *Heredity*, Vol. 99, 245-256.
- Conn, J. E.; Vineis, J. H.; Bollback, J. P.; Onyabe, D. Y.; Wilkerson, R. C.; Póvoa, M. M. 2006. Population structure of the malaria vector *Anopheles darlingi* in a malaria-

endemic region of eastern Amazonian Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* Vol. 74, n°5: 798-806.

Consoli, R. A. G. B.; Oliveira, R. L. D. 1994. *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. Ed. Fiocruz Rio de Janeiro, 225p.

Correa, M. M.; Giovan, F. G.; Natalí, Á.; Yadira, G.; Jan, E. C. 2014 (September). ITS2 SECONDARY STRUCTURE DIVERGENCE AMONG FIVE CLOSELY RELATED *Anopheles* SPECIES FROM COLOMBIA. In *8th Cuban Congress on Microbiology and Parasitology, 5th National Congress on Tropical Medicine and 5th International Symposium on HIV/aids infection in Cuba*.

Coyne, J. A; Orr, H. A. 2004. *Speciation*. Vol. 37. Sunderland, MA: Sinauer Associates.

Coura, J. R. 2013. *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Ed. Guanabara Koogan, 2ª Ed., Rio de Janeiro, 2080p.

Cornel, A. J.; Porter, C. H.; Collins, F. H. 1996. A PCR species diagnostic assay for the *Anopheles quadrimaculatus* cryptic species (Diptera: Culicidae) based on ribosomal DNA ITS2 sequences. *J Med Entomol* 33:109-116.

Cox-Singh, J.; Singh, B. 2008. Knowlesi malaria: newly emergent and of public health importance? *Trends in Parasitology*. 24: 406-410 p.

Clement, M.; Posada, D. C. K. A.; Crandall, K. A. "TCS: a computer program to estimate gene genealogies." *Molecular ecology* 9.10 (2000): 1657-1659.

Crandall, K. A.; Templeton, A. R. 1993. Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics* 134: 959 – 969.

Crabtree, M. B.; Savage, H. M.; Miller, B. R. 1997. Development of a polymerase chain reaction assay for differentiation between *Culex pipiens pipiens* and *Cx. p. quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in North America based on genomic

differences identified by subtractive hybridization. *Journal of medical entomology*, 34(5), 532-537.

Cywinska, A.; Hunter, F.; Hebert, P. 2006. Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. *Med Vet Entomol*, 20: 413 - 424.

Darriba, D.; Taboada, G. L.; Doallo, R.; Posada, D. 2012. *jModelTest 2*: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature methods*, 9(8), 772-772.

Davis, N. C. 1931. *A Note on the Malaria-carrying Anophelines in Belém, Pará, and in Natal, Rio Grande Do Norte, Brazil...* La Cardinal Ferrari.

Deane, L. M.; Causey, O. L.; Deane, M. P. 1948. Notas sobre a distribuição e a biologia dos anofelinos das Regiões Nordeste e Amazônica do Brasil. *Rev. Serv. Esp. Saúde Públ.* 1: 827-966.

Deane, L. M.; Causey, O. R.; Deane, M. P. 1947. Chave ilustrada para identificação de 35 espécies de anofelinos das regiões nordestina e amazônica do Brasil pelos caracteres da fêmea, com notas sobre os transmissores da malária. *Rev Serv Esp Saude Publ*, 1 (2): 293 - 308.

Drummond, A. J.; Rambaut, A. 2007. **BEAST*: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC evolutionary biology*, 7(1), 214.

Dover, G. 1982. Molecular drive: a cohesive mode of species evolution.

Driskell, A. C.; Ané, C.; Burleigh, J. G.; McMahon, M. M.; O'Meara, B. C.; Sanderson, M. J. 2004. Prospects for building the tree of life from large sequence databases. *Science*, 306(5699), 1172-1174.

Dusfour, I.; Issaly, J.; Carinci, R.; Gaborit, P.; Girod, R. 2012. Incrimination of *Anopheles (Anopheles) intermedius* Peryassú, An. (*Hyssorhynchus*) *nuneztovari* Gabaldón, An.

(*Nys.*) *oswaldoi* Peryassú as natural vectors of *Plasmodium falciparum* in French Guiana. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro. 107: 429-432.

Dyar, H. G. 1923. The mosquitoes of paraná (Diptera: Culicidae). *Insecutor Inscitiae Menstruus*: 167-186 p.

Elias, M.; Hill, R. I.; Willmott, K. R.; Dasmahapatra, K. K.; Brower, A. V.; Mallet, J.; Jiggins, C. D. 2007. Limited performance of DNA barcoding in a diverse community of tropical butterflies. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1627), 2881-2889.

Esquivel, C. P.; Donnelly, M. J.; Harbach, R. E.; Townson, H. 2009. A molecular phylogeny of mosquitoes in the *Anopheles barbirostris* subgroup reveals cryptic species: implications for identification of disease vectors. *Mol Phyl Evol*, 50: 141 - 151.

Fajardo Ramos, M.; Gonzalez Obando, R.; Fidel Suarez, M.; Lopez, D.; Wilkerson, R.; Sallum, M. A. M. 2008. Morphological analysis of three populations of *Anopheles (Nyssorhynchus) nuneztovari* Gabaldón (Diptera: Culicidae) from Colombia. *Rev. Mem Inst Oswaldo Cruz*, 103(1): 85 - 92.

Faran, M.; Linthicum, K. 1981. A handbook of the Amazonian species of *Anopheles (Nyssorhynchus)* (Diptera: Culicidae). *Rev. Mosq Syst*, 13(1): 1 - 81.

Faran, M. 1980. Mosquito studies (diptera, culicidae). XXXIV. A revision of the *Albimanus* section of the Subgenus *Nyssorhynchus* of *Anopheles*. *J. Contrib Amer Entomol Inst*, 15: 1 - 215.

Farris, J. S.; Källersjö, M.; Kluge, A. G.; Bult, C. 1995. Constructing a significance test for incongruence. *Systematic Biology*, 44(4), 570-572.

Ferreira, J. O.; Oliveira, R. F.; Teva, A.; Deane, L. M.; Ribeiro, C. T. D. 1990. Natural malaria infections in anophelines in Rondonia State, Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg*, 43: 6 - 10.

- Rosa-Freitas, M. G.; Lourenço-de-Oliveira, R.; Carvalho-Pinto, C. J. D.; Flores-Mendoza, C.; Silva-do-Nascimento, T. F. 1998. Anopheline species complexes in Brazil. Current knowledge of those related to malaria transmission. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93(5), 651-655.
- Flores-Mendoza, C.; Peyton, E. L.; Wilkerson, R. C.; Lourenço-de-Oliveira, R. 2004. *Anopheles (Nyssorhynchus) konderi* Galvão & Damasceno: neotype designation and resurrection from synonymy with *Anopheles (nyssorhynchus) oswaldoi* (Peryassú) (Diptera: Culicidae). *Proc Entomol Soc Washington* 106: 118-132.
- Foley, D. H.; Wilkerson, R. C.; Cooper, R. D.; Volovsek, M. E.; Bryan, J. H. 2007. A molecular phylogeny of *Anopheles annulipes* (Diptera: Culicidae) sensu lato: The most species-rich anopheline complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 43: 283-297.
- Folmer, O.; Black, M.; Hoeh, W.; Lutz, R.; Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 3: 294 - 299.
- Forattini, O. P. 2002. *Culicidologia médica*. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo 864p.
- Forattini, O.; Kakitani, I.; Massad, E.; Marucci, D. 1993. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment. 3. Survey of adult stages at the rice irrigation system and the emergence of *Anopheles albitarsis* in south-eastern, Brazil. *Rev Saude Publica*, 27: 313 - 325.
- Foster, P. G.; Bergo, E. S.; Bourke, B. P.; Oliveira, T. M. P.; Nagaki, S. S.; Sant'Ana, D. C.; Sallum, M. A. M. 2013. Phylogenetic analysis and DNA-based species confirmation in *Anopheles (Nyssorhynchus)*. *PLoS One* 8 (2): e54063

- Galardo, A. K. R.; Zimmerman, R. H.; Lounibos, L. P.; Young, L. J.; Galardo, C. D.; Arruda, M.; D'Almeida, Couto. 2009. Seasonal abundance of anopheline mosquitoes and their association with rainfall and malaria along the Matapi River, Amapi, Brazil. *Medical and veterinary entomology*, 23(4), 335-349.
- Galardo, A.; Arruda, M.; D'almeida Couto, A.; Wirtz, R.; Lounibos, L.; Zimmerman, R. 2007. Malaria vector incrimination in three rural riverine villages in the Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg*, 76: 461 - 469.
- Garziona, C. N.; Hoke, G. D.; Libarkin, J. C.; Withers, S.; MacFadden, B.; Eiler, J.; Mulch, A. 2008. Rise of the Andes. *science*, 320(5881), 1304-1307.
- Galvão, A. L. A.; Damasceno, R. G. 1942. *Anopheles (Nyssorhynchus) konderi* nova espécie de *Anopheles* do vale do Amazonas e considerações sobre as espécies do complexo *tarsimaculatus* (Diptera, Culicidae).
- Galvão, A. L.; Barreto, M. P. 1938. Observações sobre o *Anopheles albitarsis* Arribálzaga, 1878 e *A. triannulatus* (Neiva & Pinto, 1922) de São Paulo. *Rev. Biol. Hyg.* 9 (2): 144-157.
- Galvão, A. L. A.; Lane, J. 1937. Nota sobre os *Nyssorhynchus* de São Paulo. VII. Estudo sobre as variedades deste grupo com a descrição de *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* Arrib., 1878 var. *limai* n. var. . *Ann Fac Med.*, (13): 211-238.
- Garros, C.; Koekemoer, L. L.; Kamau, L.; Awolola, T. S.; Van Bortel, W.; Coetzee, M.; Manguin, S. 2004. Restriction fragment length polymorphism method for the identification of major African and Asian malaria vectors within the *Anopheles funestus* and *An. minimus* groups. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 70(3), 260-265.
- Gatesy, J.; Baker, R. H.; Hayashi, C. 2004. Inconsistencies in arguments for the supertree approach: supermatrices versus supertrees of Crocodylia. *Systematic Biology*, 342-355.

- Gorham, J. R.; Stojanovich, C. J.; Scott, H. G. 1973. Illustrated key to the *Anopheles* mosquitoes of Western South America. *Mosquito Systematics*, 5(2): 97-156.
- Goeldi, E. 1905. Os mosquitos do Pará: resumo provisório da campanha de experiências executadas em 1903, especialmente em relação às espécies *Stegomyia fasciata* e *Culex fatigans*, sob o ponto de vista sanitário. *Belém: Estabelecimento Graphico C. Wiegandt*.
- Gómez, G. F.; Bickersmith, S. A.; González, R.; Conn, J. E.; Correa, M. M. 2015. Molecular Taxonomy Provides New Insights into *Anopheles* Species of the Neotropical Arribalzagia Series. *PlosOne*, 10(3), e0119488.
- Guedes, M. L. P. 2012. Culicidae (Diptera) no Brasil: relação entre diversidade, distribuição e enfermidades. *Oecologia australis*. 16: 283-296 p.
- Gutierrez, L.; Orrego, L.; Gomez, G.; Lopez, A.; Luckhart, S.; Conn, J.; Correa, M. 2010. A new mtDNA *COI* gene lineage closely related to *Anopheles janconnae* of the *Albitarsis* complex in the Caribbean region of Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 105: 1019 - 1025.
- Hackett, B. J.; Gimnig, J.; Guelbeogo, W.; Costantini, C.; Koekemoer, L. L.; Coetzee, M.; Besansky, N. J. 2000. Ribosomal DNA internal transcribed spacer (*ITS2*) sequences differentiate *Anopheles funestus* and *An. rivulorum*, and uncover a cryptic taxon. *Insect molecular biology*, 9(4), 369-374.
- Haffer, J. 1969. Speciation in Amazonian forest birds. *Science*, 165(3889), 131-137.
- Hajibabaei, M.; Singer, G. A.; Hebert, P. D.; Hickey, D. A. 2007. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetic and population genetics. *TRENDS in Genetics*, 23(4), 167-172.
- Hajibabaei, M.; Janzen, D.; Burns, J.; Hallwachs, W.; Hebert, P. 2006. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 968 - 971.

- Hall, T. 2011. BioEdit: An important software for molecular biology. *GERF Bulletin of Biosciences*. 2: 60-61 p.
- Harbach, R. E. 2007. The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. *Zootaxa* 1668: 591-638
- Harbach, R. 2004. The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. *Bull Entomol Res*,94: 537 - 553.
- Harbach, R.; Roberts, D.; Manguin, S. 1993. Variation in the hindtarsal markings of *Anopheles darlingi* (Diptera; Culicidae) in Belize. *Mosquito Systematics*,25: 192 - 197.
- Hasegawa, M.; Kishino, H.; Yano, T. A. 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of molecular evolution*, 22(2), 160-174.
- Hayes, J.; Calderon, G.; Falcon, R.; Zambrano, V. 1987. Newly incriminated anopheline vectors of human malaria parasites in Junin Department, Peru. *J Am Mosq Control Assoc*,3: 418 - 422.
- Hebert, P. D.; Gregory, T. R. 2005. The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic biology*,54(5): 852-859.
- Hebert, P.; Stoeckle, M.; Zemlak, T.; Francis, C. 2004. Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biol*,2: 312.
- Hebert, P.; Cywinska, A.; Ball, S.; Dewaard, J. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc Lond B*,270: 313 - 321.
- Heled, J.; Drummond, A. J., 2010. Bayesian inference of species trees from multilocus data. *Molecular Biology and Evolution*. 27, 570 – 580.

- Huelsenbeck, J.P.; Ronquist, F., 2001. *MRBAYES*: Bayesian inference of phylogenetic trees. *BMC Bioinformatics*,17, 754 – 755.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*,16: 111 - 120.
- Klein, T. A.; Lima, J. B.; Tada, M. S. 1991. Comparative susceptibility of anopheline mosquitoes to *Plasmodium falciparum* in Rondônia, Brazil. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 44(6), 598-603.
- Klein, T.; Lima, J. 1990. Seasonal distribution and biting patterns of *Anopheles* mosquitoes in Costa Marques, Rondonia, Brazil. *J Am Mosq Control Assoc*,6: 700 - 707.
- Kumar, N.; Rajavel, A.; Natarajan, R.; Jambulingam, P. 2007. DNA barcodes can distinguish species of Indian mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*, 44: 1 - 7.
- Laboudi, M.; Faraj, C.; Sadak, A.; Harrat, Z.; Boubidi, S.; Harbach, R.; El Aouad, R.; Linton, Y. 2011. DNA barcodes confirm the presence of a single member of the *Anopheles maculipennis* group in Morocco and Algeria: *An. sicaulti* is conspecific with *An. labranchiae*. *Rev. Acta Trop*,118: 6 - 13.
- Lane, J. 1953. *Neotropical Culicidae*. Universidade de São Paulo, v. 1, 548p.
- Laubach, H. E.; Validium, L.; Bonilla, J. A.; Agar., A.; Cummings, R.; Mitchell, C.; Cuadrado, R. R.; Palmer, C. J. 2001. Identification of *Anopheles aquasalis* as a possible vector of malaria in Guyana, South America. *J. West Indian Med*, (50): 319-321.
- Laurito, M.; de Oliveira, T. M.; Almiron, W. R.; Sallum, M. A. M. 2013. *COI* barcode versus morphological identification of *Culex (Culex)*(Diptera: Culicidae) species: a case study using samples from Argentina and Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108, 110-122.

- Li, C.; Wilkerson, R. C. 2007. Intragenomic rDNA ITS2 variation in the neotropical *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* complex (Diptera: Culicidae). *J Hered* 98:51-59.
- Lima, A. C. 1928. Sobre algumas anophelinas encontradas no Brasil. *Rev. Memórias do Instituto Oswaldo cruz*,(3): 91-113.
- Linton, Y. M.; Pecor, J. E.; Porter, C. H.; Mitchell, L. B.; Garzón-Moreno, A.; Foley, D. H.; Wilkerson, R. C. 2013. Mosquitoes of eastern Amazonian Ecuador: biodiversity, bionomics and barcodes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108, 100-109.
- Lounibos, L.; Conn, J. 2000. Malaria vector heterogeneity in South America. *Am Entomol*.46: 238 - 249.
- Lounibos, L. P.; Wilkerson, R. C.; Conn, J. E.; Hribar, L. J.; Fritz, G. N.; Danoff-Burg, J. A. 1998. Morphological, molecular, and chromosomal discrimination of cryptic *Anopheles (Nyssorhynchus)*(Diptera: Culicidae) from South America. *Journal of medical entomology*, 35(5), 830-838.
- Lounibos, L. P.; Duzak, D.; Linley, J. R. 1997. Comparative egg morphology of six species of the Albimanus section of *Anopheles (Nyssorhynchus)* (Diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology*, 34(2), 136-155.
- Lourenço-de-Oliveira, R. 1995. Qual a importância da hematofagia extradomiciliar do *Anopheles darlingi* na Amazônia. *Rev Patol Trop*,23.
- Lourenço-de-Oliveira, R.; Luz, S. 1996. Simian malaria at two sites in the Brazilian Amazon. II. Vertical distribution and frequency of anopheline species inside and outside the forest. *Mem Inst Oswaldo Cruz*,91: 687 - 694.
- McKeon, S. N.; Lehr, M. A.; Wilkerson, R. C.; Ruiz, J. F.; Sallum, M. A.; Lima, J. B.; Conn, J. E. (2010). Lineage divergence detected in the malaria vector *Anopheles marajoara* (Diptera: Culicidae) in Amazonian Brazil. *Malar J*, 9(271), 10-1186.

- Manguin, S.; Carnevale, P.; Mouchet, J.; Coosemans, M.; Julvez, J.; Richard-Lenoble, D.; Sircoulon, J. 2008. *Biodiversity of malaria in the world*. Montrouge, France, John Libbey Eurotext, 428p.
- Manonmani, A.; Townson, H.; Adeniran, T.; Jambulingam, P.; Sahu, S.; Vijayakumar, T. 2001 rDNA-ITS2 polymerase chain reaction assay for the sibling species of *Anopheles fluviatilis*. *Acta Tropica*, 78, 3–9.
- Marrelli, M. T.; Honório, N. A.; Flores-Mendoza, C.; Lourenço-De-Oliveira, R.; Marinotti, O.; Kloetzel, J. K. 1999a. Comparative susceptibility of two members of the *Anopheles oswaldoi* complex, *An. oswaldoi* and *An. konderi*, to infection by *Plasmodium vivax*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 93: 381-384.
- Marrelli, M. T.; Malafrente, R. S.; Flores-Mendoza, C.; Lourenco-De-Oliveira, R.; Kloetzel, J. K.; Marinotti, O. 1999b. Sequence analysis of the second internal transcribed spacer of ribosomal DNA in *Anopheles oswaldoi* (Diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology*, 36(6): 679-684.
- Marrelli, T. M.; Sallum, M. A. M.; Marinotti, O. 2006. The second internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA as a tool for Latin America anopheline taxonomy - A critical review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101 (8): 817-832
- Meyer, C. P.; Paulay, G. 2005. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS biology*, 3(12), e 422.
- Meier, R.; Zhang, G.; Ali, F. 2008. The use of mean instead of smallest interspecific distances exaggerates the size of the “barcoding gap” and leads to misidentification. *Systematic Biology*, 57(5), 809-813.
- Michalakis, Y.; Renaud, F. 2009. Malaria: Evolution in vector control. *Nature*. 462: 298-300 p.

- Miller, B. R.; Crabtree, M. B.; Savage, H. M. 1997. Phylogenetic relationship of the Culicomorpha inferred from 18S and 5.8S ribosomal DNA sequences (Diptera: Nematocera). *Insect Mol Biol*, 6(2): 105-114.
- Monteiro, F. A.; Barrett, T. V.; Fitzpatrick, S.; Cordon-Rosales, C.; Feliciangeli, D.; Beard, C. B. 2003. Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. *Molecular Ecology*, 12(4), 997-1006.
- Mirabello, L.; Conn, J. 2008. Population analysis using the nuclear white gene detects Pliocene/Pleistocene lineage divergence within *Anopheles nuneztovari* in South America. *Med Vet Entomol*, 22(2): 109 - 119.
- Mirabello, L.; Conn, J. E. 2006. Molecular population genetics of the malaria vector *Anopheles darlingi* in Central and South America. *Heredity*, 96(4), 311-321.
- Moreno, M.; Bickersmith, S.; Harlow, W.; Hildebrandt, J.; Mckee, S.; Silva-Donascimento, T. F.; Loaiza, J.; Ruiz, F.; Lourenco-De-Oliveira, R.; Sallum, M. A. M.; Bergo, E. S.; Fritz, G. N.; Wilkerson, R. C.; Linton, Y. M.; Juri, M. J. D.; Rangel, Y.; Póvoa, M. M.; Gutierrez-Builes, L. A.; Correa, M. M.; Conn, J. E. 2013. Phylogeography of the neotropical *Anopheles triannulatus* complex (Diptera: Culicidae) supports deep structure and complex patterns. *Parasites & Vectors*, 6(1): p. 47.
- Motoki, M.; Bourke, B.; Bergo, E.; Silva, A.; Sallum, M. 2011. Systematic notes of *Anopheles konderi* and its first record in Parana State, Brazil. *J Am Mosq Control Assoc*, 27: 191 - 200.
- Motoki, M. T.; Dos Santos, C. L. S.; Sallum, M. A. M. 2009. Intraspecific Variation of the Aedeagus of *Anopheles oswaldoi* (Peryassú) (Diptera: Culicidae). *Neotropical Entomology* 38 (1): 144-148.

- Motoki, M. T.; Linton, Y.M.; Ruiz, F.; Flores-Mendoza, C.; Sallum., M. A. M. 2007. Redescription of *Anopheles oswaldoi* (Peryassú, 1922) (Diptera: Culicidae), with formal lectotype designation. *Zootaxa*: 1588: 31-51 p.
- Mulamba, C.; Irving, H.; Riveron, J. M.; Mukwaya, L. G.; Birungi, J.; Wondji, C. S. 2014. Contrasting *Plasmodium* infection rates and insecticide susceptibility profiles between the sympatric sibling species *Anopheles parensis* and *Anopheles funestus* ss: a potential challenge for malaria vector control in Uganda. *Parasit Vectors*, 7, 71.
- Nagaki, S. S.; Motta, M. D. A.; Sallum, M. A. M. 2010. Redescription of *Anopheles (Nyssorhynchus) antunesi* Galvão & Amaral and description of a new species of the Myzorrhynchella Section (Diptera: Culicidae) from Serra da Mantiqueira, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(3): 278-285.
- Naranjo-Diaz, N.; Rosero, D.; Rua-Uribe, G.; Luckhart, S.; Correa, M. 2013. Abundance, behavior and entomological inoculation rates of anthropophilic anophelins from a primary Colombian malaria endemic area. *Parasites & Vectors*, 6(1): p. 61.
- Newman, M. E. 2003. The structure and function of complex networks. *SIAM review*, 45(2), 167-256.
- Pedro, P.; Uezu, A.; Sallum, M. 2010. Concordant phylogeographies of 2 malaria vectors attest to common spatial and demographic histories. *J Hered*, 101: 618 - 627.
- Peryassú, A. 1922. Duas novas espécies de mosquitos do Brasil. *A folha médica*, 3: 179.
- Peyton, E. L.; Roberts, D. R.; Pinheiro, F. P.; Vargas, R.; Balderama, F. 1983. Mosquito collections from a remote unstudied area of southeastern Bolivia. *Mosquito Systematics*, 15: 61-89.
- Pinault, L. L.; Hunter, F. F. 2012. Characterization of larval habitats of *Anopheles albimanus*, *Anopheles pseudopunctipennis*, *Anopheles punctimacula*, and *Anopheles oswaldoi* sl.

populations in lowland and highland Ecuador. *Journal of Vector Ecology*,37(1): 124-136.

Pinault, L. L.; Hunter, F. F. 2011. New highland distribution records of multiple *Anopheles* species in the Ecuadorian Andes. *Malaria Journal*,10(1): p. 236.

Porter, C. H.; Collins, F. H. 1991. Species-diagnostic differences in a ribosomal DNA internal transcribed spacer from the sibling species *Anopheles freeborni* and *Anopheles hermsi* (Diptera: Culicidae). *Am J Trop Med Hyg* 45:271-279.

Póvoa, M. M.; Wirtz, R.; Lacerda, R.; Miles, M.; Warhurst, D. 2001. Malaria vectors in the municipality of Serra do Navio, State of Amapa, Amazon region, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 96(2): 179 - 184.

QGIS. 2013. Development Team. QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. <<http://qgis.osgeo.org>>.

Queiroz, K. D. 2007. Species concepts and species delimitation. *Syst Biol*,56: 956 - 974.

Queiroz, R. V.; Coutinho-Abreu, I. V.; Sonoda, I. V.; Melo, M. A.; Andrade, P. P. D.; Castro, J. A. D.; Rebelo, J. M.; Carvalho, S. M.; Ramalho-Ortigao, M. 2006. Genetic structure of natural populations of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from the Brazilian northeastern region. *Acta Trop*,98: 15 - 24.

Quiñones, M.; Ruiz, F.; Calle, D.; Harbach, R.; Erazo, H.; Linton, Y. 2006. Incrimination of *Anopheles (Nyssorhynchus) rangeli* and *An. (Nys.) oswaldoi* as natural vectors of *Plasmodium vivax* in Southern Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*,101: 617 - 624.

Rambaut, A. Drummond, A. J. 2007. Tracer version 1.4.

Rambaut, A. 2014. FigTree: tree figure drawing tool, version 1.4. 0.

- Reinert, J.; Kaiser, P.; Seawright, J. 1997. Analysis of the *Anopheles* (*Anopheles*) *quadrimaculatus* complex of sibling species (Diptera: Culicidae) using morphological, cytological, molecular, genetic, biochemical, and ecological techniques in an integrated approach. *J Am Mosq Control Assoc*,13: p. 1 - 102.
- Reinert, J. F. 2009. List of abbreviations for currently valid generic-level taxa in family Culicidae (Diptera). *Journal of the European Mosquito Control Association*, 27: 68-76.
- Remsen, J.; DeSalle, R. 1998. Character congruence of multiple data partitions and the origin of the Hawaiian Drosophilidae. *Molecular phylogenetics and evolution*, 9(2), 225-235.
- Root, F. M. 1924. Further notes on the male genitalia of American *Anopheles*. *Am. J. Hyg.* 4: 456-465.
- Rosa-Freitas, M. G.; Lourenco-de-Oliveira, R.; Carvalho-Pinto, C. J.; Flores-Mendoza, C.; Silva-do-Nascimento, T. F. 1998. Anopheline species complexes in Brazil. Current knowledge of those related to malaria transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz*,93: 651 - 655.
- Rosero, D. A.; Jaramillo, L.; Gutierrez, L.; Conn, J.; Correa, M. 2012. Genetic diversity of *Anopheles triannulatus* s.l. (Diptera: Culicidae) from Northwestern and Southeastern Colombia. *Am J Trop Med Hyg*, 87: 910 - 920.
- Rosero, D. A.; Naranjo-Diaz, N.; Alvarez, N.; Cienfuegos, A. V.; Torres, C.; Luckhard, S.; Correa, M. M. 2013. Colombian *Anopheles triannulatus* (Diptera: Culicidae) Naturally Infected with *Plasmodium* spp. *Parasitology*: 1-10.
- Rozeboom, L. E. 1942. Subspecific variations among Neotropical *Anopheles* mosquitoes, and their importance in the transmission of malaria. *Am. J. Trop. Med.*22: 235-255.

- Rubinoff, D. 2006. Utility of Mitochondrial DNA *Barcodes* in Species Conservation Utilidad de los Códigos de Barras de DNA Mitocondrial en la Conservación de Especies. *Conservation Biology*,20(4): 1026-1033.
- Rubio-Palis, Y.; Curtis, C. 1992. Biting and resting behaviour of anophelines in western Venezuela and implications for control of malaria transmission. *Med Vet Entomol*.6: 325 - 334.
- Rubio-Palis, Y.; Wirtz, R.; Curtis, C. 1992. Malaria entomological inoculation rates in western Venezuela. *Acta Trop*, 52: 167 - 174.
- Rubio-Palis, Y.; Bevilacqua, M.; Medina, D. A.; Moreno, J. E.; Cárdenas, L.; Sánchez, V.; Martínez, Á. (2013). Malaria entomological risk factors in relation to land cover in the Lower Caura River Basin, Venezuela. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(2), 220-228.
- Rueda, L. M. 2008. Global diversity of mosquitoes (Insecta: Diptera: Culicidae) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595: 477-487.
- Ruiz-Lopez, F.; Wilkerson, R. C.; Ponsonby, D. J.; Herrera, M.; Sallum, M. A. M.; Velez, I. D.; Quiñones, M. L.; Flores-Mendoza, C.; Chadee, D. D.; Alarcon, J.; Alarcon-Ormasa, J.; Linton, Y. M. 2013. Systematics of the Oswaldoi Complex (*Anopheles*, *Nyssorhynchus*) in South America. *Parasites & Vectors*, 6:324.
- Ruiz-Lopez, F.; Wilkerson, R.; Conn, J.; Mckee, S.; Levin, D.; Quinones, M.; Póvoa, M.; Linton, Y.M. 2012. DNA barcoding reveals both known and novel taxa in the *Albitarsis* group (*Anopheles*: *Nyssorhynchus*) of neotropical malaria vectors. *Parasite & Vectors*,5: 44.
- Ruiz, F.; Quiñones, M. L.; Erazo, H. F.; Calle, D. A.; Alzate, J. F.; Linton, Y.M. 2005. Molecular differentiation of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *benarrochi* and *An.*(*Nys.*) *oswaldoi* from Southern Colômbia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*,100(2): 155-160.

- Sallum, M.; Schultz, T.; Foster, P.; Aronstein, K.; Wirtz, R.; Wilkerson, R. 2002. Phylogeny of Anophelinae (diptera: culicidae) based on nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequences. *Syst Entomol*,27: 361 - 382.
- Sallum, M. A. M.; Marrelli, M. T.; Nagaki, S. S.; Laporta, G. Z.; dos Santos, C. L. 2008. Insight into *Anopheles* (Nyssorhynchus) (Diptera: Culicidae) species from Brazil. *J. Med Entomol* 45:970-981.
- Sallum, M. A. M.; Wilkerson, R. C.; Forattini, O. P. 1999. Taxonomic study of species formerly identified as *Anopheles mediopunctatus* and resurrection of *An. costai* (Diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology*,36(3), 282-300.
- Sambrook, J.; Russel., D. W. 2001. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. PRESS, C. S. H. L. New York. 4^aEd., v. 3.
- Santos, R. L.; Sucupira, I. M. C.; Lacerda, R. N. L.; Fayal, A. S.; Póvoa., M. M. 2005. Inquério entomológico e infectividade durante epidemia de malária no município de Anajás, Estado do Pará. *Revista Brasileira de Medicina Tropical*, 38:202-204.
- Scarpassa, V. M.; Alencar, R. B. 2013. Molecular taxonomy of the two *Leishmania* vectors *Lutzomyia umbratilis* and *Lutzomyia anduzei* (Diptera: Psychodidae) from the Brazilian Amazon. *Parasit Vectors*, 6, 258.
- Scarpassa, V. M.; Conn, J. E. 2006. Molecular differentiation in natural populations of *Anopheles oswaldoi* sensu lato (Diptera: Culicidae) from the Brazilian Amazon, using sequences of the *COI* gene from mitochondrial DNA. *Gen Mol Res*, 5: 493-502.
- Scarpassa, V. M.; Conn, J. E. 2011. Mitochondrial DNA detects a complex evolutionary history with Pleistocene Epoch divergence for the neotropical malaria vector *Anopheles nuneztovari* sensu lato. *Am J Trop Med Hyg*,85: 857 - 867.

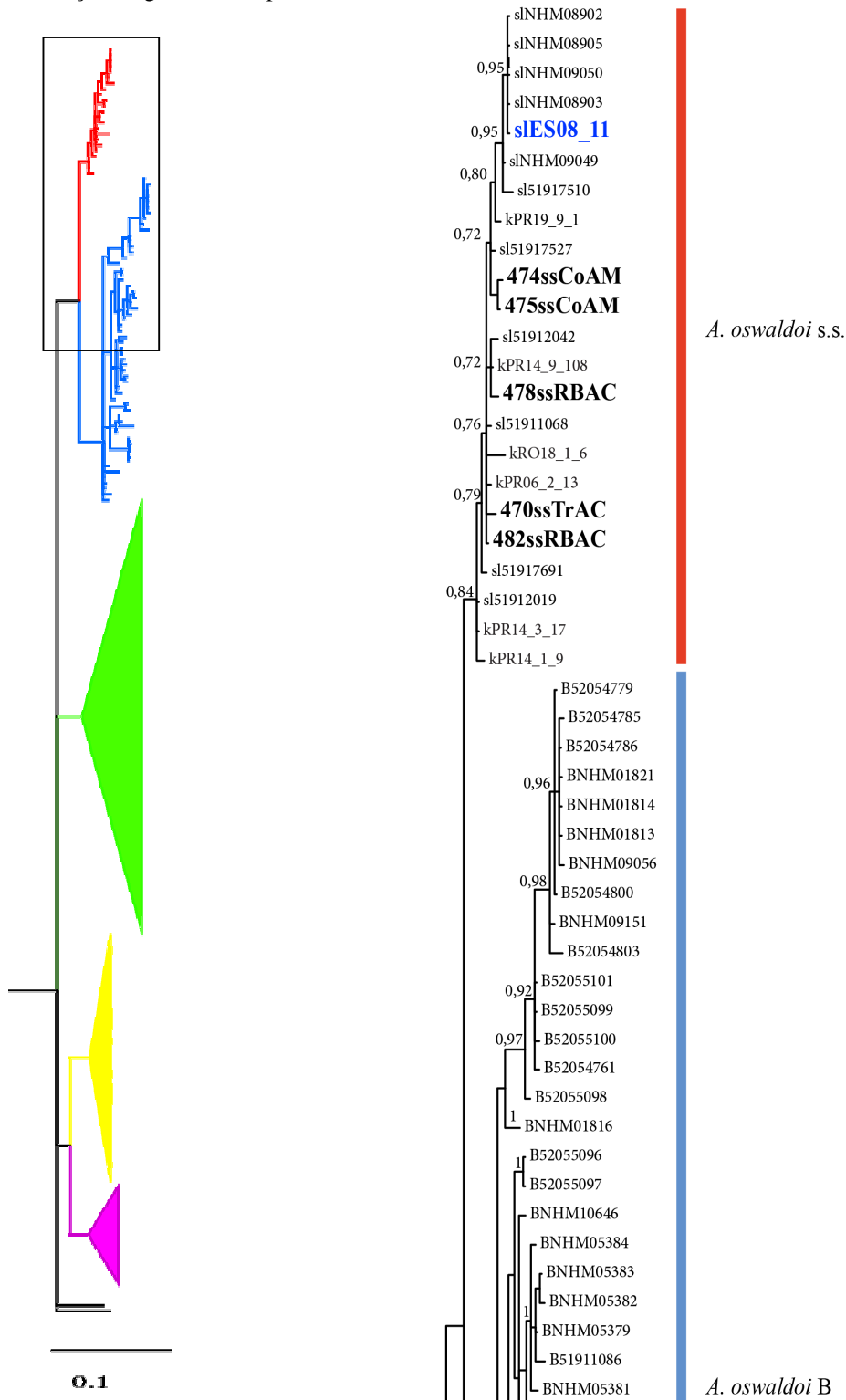
- Scarpassa, V. M. 2005. Isozyme similarity in *Anopheles oswaldoi* sensu lato (Diptera: Culicidae) from the Amazon Region, Brazil. *Journal of medical entomology*, 42(3): 319-326.
- Sedaghat, M. M.; Linton, Y. M.; Oshaghi, M. A.; Vatandoost, H.; Harbach, R. E. 2003. The *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) in Iran: molecular characterization and recognition of a new species. *Bulletin of entomological research*, 93(6), 527-536.
- Silva-do-Nascimento, T. F.; Pitaluga, L. D.; Peixoto, A. A.; Lourenço-de-Oliveira, R. 2011. Molecular divergence in the *timeless* and *cpr* genes among three sympatric cryptic species of the *Anopheles triannulatus* complex. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 106: 218 - 222.
- SIVEP. 2014. Sistema de Informação de vigilância Epidemiológica - Notificação de casos. disponível em: <http://portalweb04.saude.gov.br/sivep_malaria/default.asp>
- Simmons, J. S. 1979. *Malaria in Panama*. Arno Press. 326p., Disponível em: <http://books.google.com.br/books?id=arMN_3pqxDcC>, acesso em 23/07/2013.
- Stoeckle, M. 2003. Taxonomy, DNA, and the bar code of life. *Biosciences*, 53:796-797.
- Swofford, D.L. 2000. *PAUP**. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods). Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- Tadei, W. P.; Santos, J. D.; Costa, W. D. S.; Scarpassa, V. M. 1988. Biologia de anofelinos amazônicos. XII. Ocorrência de espécies de *Anopheles*, dinâmica da transmissão e controle da malária na zona urbana de Ariquemes (Rondônia). *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 30, 221-251.
- Tadei, W. P.; Dutary-Thatcher, B. 2000. Malaria vectors in the Brazilian Amazon: *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus*. *Rev Inst Med Trop, São Paulo*, 42: 87 - 94.

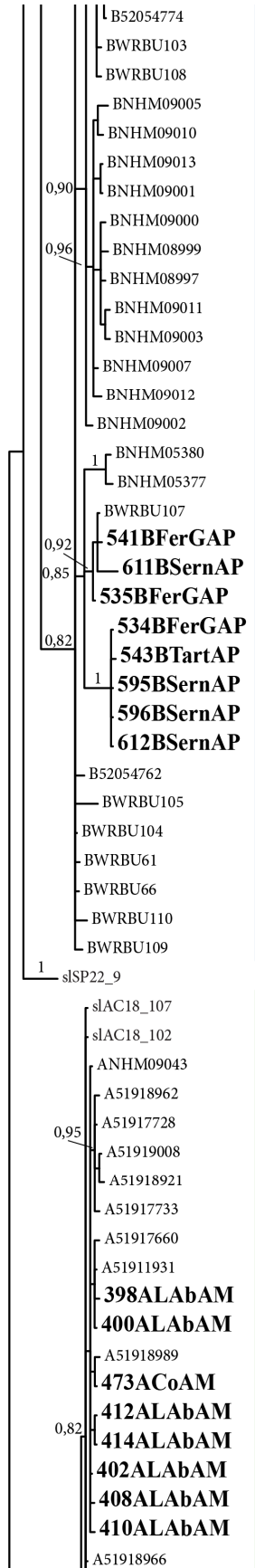
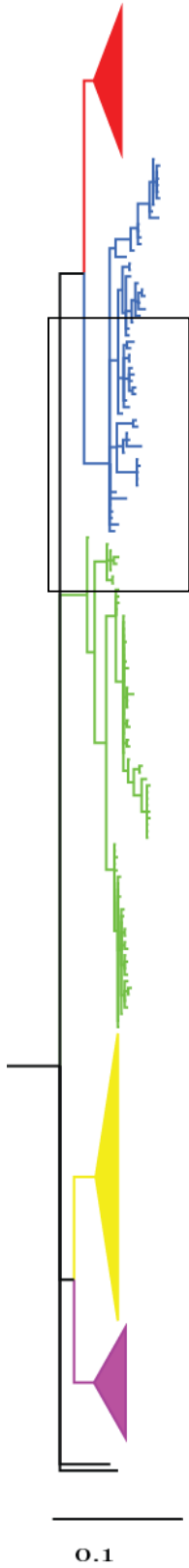
- Tadei, W.; Thatcher, B.; Santos, J.; Scarpassa, V.; Brandão, R. I.; Rafael, M. 1998. Ecological observations on Anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg*,59: 325 - 345.
- Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M.; Kumar, S.2011. Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28: 2731-2739 p.
- Turchetto-Zolet, A. C.; Pinheiro, F.; Salgueiro, F.; Palma-Silva, C. 2013. Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Molecular Ecology*, 22(5), 1193-1213.
- Walton, C.; Handley, J.; Kuvangkadilok, C.; Collins, F.; Harbach, R.; Baimai, V.; Butlin, R. 1999. Identification of five species of the *Anopheles dirus* complex from Thailand, using allele-specific polymerase chain reaction. *Medical and Veterinary Entomology*,13(1): 24-32.
- Wang, G.; Li, C.; Guo, X.; Xing, D.; Dong, Y.; Wang, Z.; Zhang, Y.; Liu, M.; Zheng, Z.; Zhang, H.; Zhu, X.; Wu, Z.; Zhao, T. 2012. Identifying the Main Mosquito Species in China Based on DNA Barcoding. *Plos one*,7(10):47051.
- Webb, S. D. 1995. Biological implications of the middle Miocene Amazon seaway. *Science*, 269, 361-362.
- WHO. 2014. *Who Global Malaria Programe: World Malaria Report 2014*, World Health Organization, 124p.
- Wilkerson, R. C.; Reinert, J.; Li, C. 2004. Ribosomal DNA ITS2 sequences differentiate six species in the *Anopheles crucians* complex (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*,41:392 - 401.

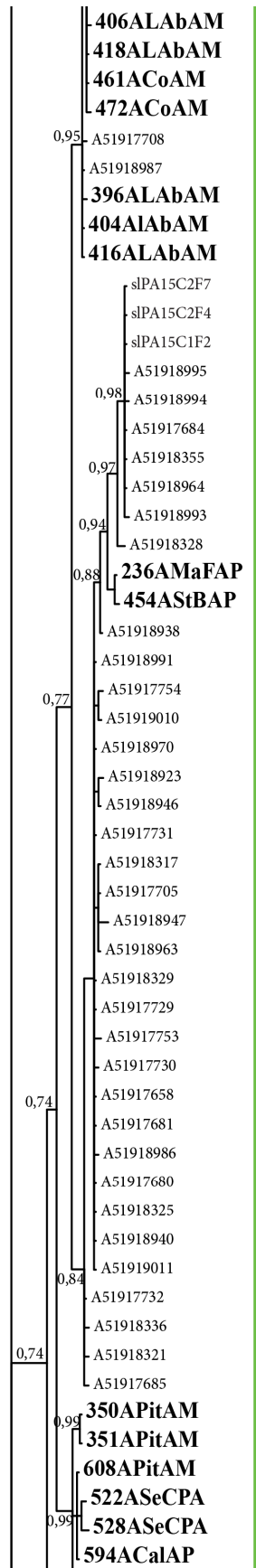
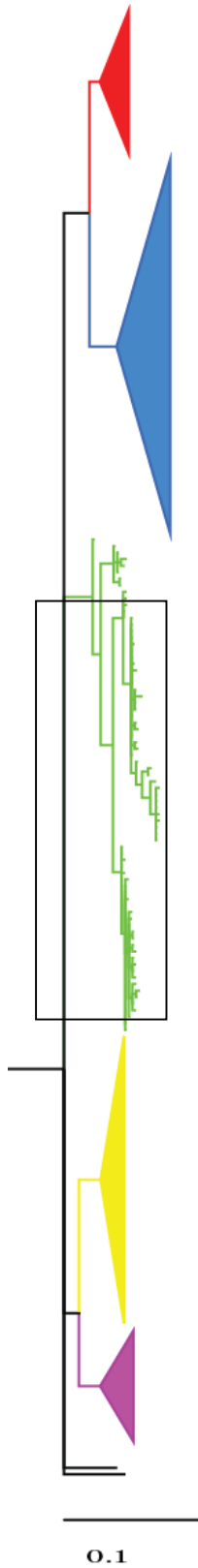
- Wilkerson, R. C.; Peyton, E. 1990. Standardized nomenclature for the costal wing spots of the genus *Anopheles* and other spotted-wing mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*,27(2): 207-224.
- Will, K. W.; Rubinoff, D. 2004. Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification. *Cladistics*,20(1): 47-55.
- W.R.B.U. 2015. Walter Reed Biosystematics Unit, Online Mosquito Catalogue. Disponível em: <<http://www.mosquitocatalog.org>>, acesso em 12/01/15.

APÉNDICES

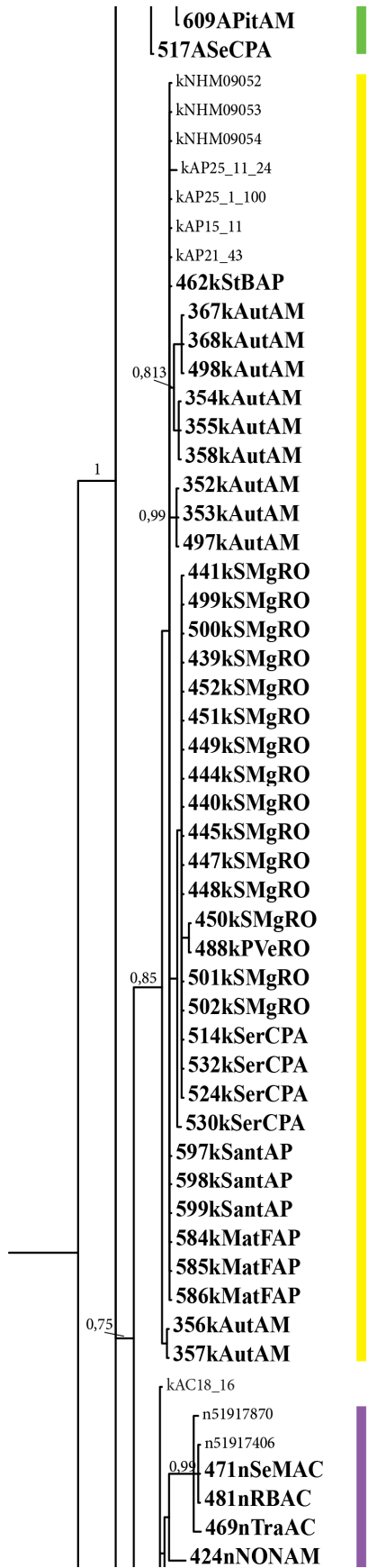
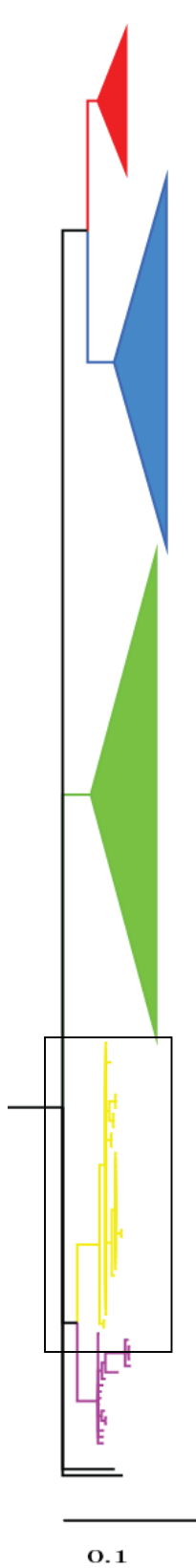
APÊNDICE A. IB dos espécimes de *A. oswaldoi* s.l. e *A. konderi* s.l. coletados (**Negrito**) e seqüências identificadas no *GenBank* (Sallum *et al.*, 2008; Motoki *et al.*, 2011; Linton *et al.*, 2013; Rúbio-Palis *et al.*, 2013 e Ruiz *et al.*, 2013). Modelo evolutivo – HKY+I+G. Seqüência destacada em **azul** pertence à espécie *Anopheles oswaldoi* ss. da localidade tipo: Estado de Espírito Santo. À esquerda, cladograma geral e à direita detalhe da relação filogenética recuperada.



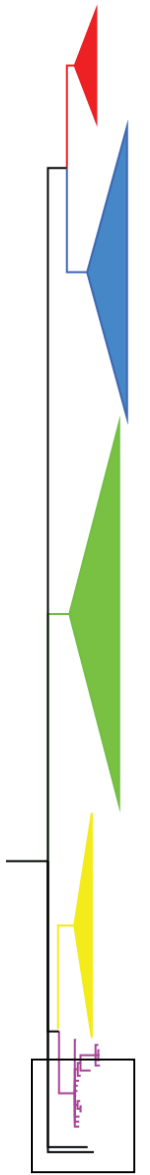




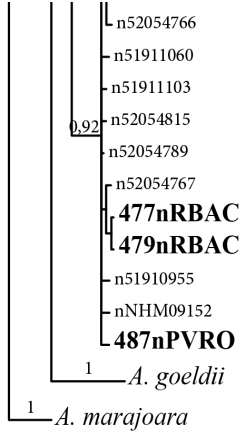
A. oswaldoi A



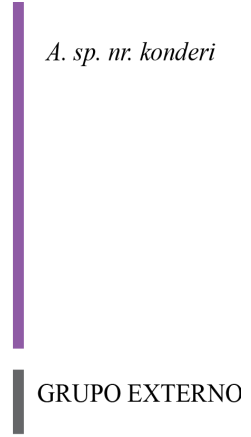
A. konderi



0.1



0.1



APÊNDICE B. Identificação dos espécimes de *A. oswaldoi* s.l. coletados (código, localidade e Estado) comparadas com sequências do *GenBank*. São apresentados os valores máximos de *Score* da identidade e a respectiva sequência que apresentou maior identidade com as amostras obtidas.

AMOSTRAS OBTIDAS			SCORE DA IDENTIDADE	IDENTIFICAÇÃO NO BLASTn		
Nº	CÓDIGO USADO	LOCALIDADE/ESTADO		AUTOR	ESPÉCIE	Nº SEQUÊNCIA COMPARADA
1	474oswssCoa-AM	Coari/AM	99%	Ruiz <i>et al.</i> , (2013)	<i>A. oswaldoi ss</i>	KF809129
2	475oswssCoa-AM	Coari/AM	99%	Ruiz <i>et al.</i> , (2013)	<i>A. oswaldoi ss</i>	KF809129
3	478oswssRBra-AC	Rio Branco/AC	99%	Ruiz <i>et al.</i> , (2013)	<i>A. oswaldoi ss</i>	KF809126
4	482oswssRBra-AC	Rio Branco/AC	99%	Ruiz <i>et al.</i> , (2013)	<i>A. oswaldoi ss</i>	KF809124
5	470oswssTra-AC	Transacreeana/AC	99%	Ruiz <i>et al.</i> , (2013)	<i>A. oswaldoi ss</i>	KF809126
6	534oswBFGO-AP	Ferreira Gomes/AP	99%	Rúbio-Palis <i>et al.</i> , (2013)	<i>A. oswaldoi B</i>	KC555073
7	535oswBFGO-AP	Ferreira Gomes/AP	99%	Rúbio-Palis <i>et al.</i> , (2013)	<i>A. oswaldoi B</i>	KC555056
8	541oswBFGO-AP	Ferreira Gomes/AP	99%	Rúbio-Palis <i>et al.</i> , (2013)	<i>A. oswaldoi B</i>	KC555056
9	595oswBSNav-AP	Pedra preta/AP	98%	Rúbio-Palis <i>et al.</i> , (2013)	<i>A. oswaldoi B</i>	KC555073
10	596oswBSNav-AP	Pedra preta/AP	98%	Rúbio-Palis <i>et al.</i> , (2013)	<i>A. oswaldoi B</i>	KC555073
11	611oswBSNav-AP	Pedra preta/AP	99%	Rúbio-Palis <i>et al.</i> , (2013)	<i>A. oswaldoi B</i>	KC555056
12	612oswBSNav-AP	Pedra preta/AP	98%	Rúbio-Palis <i>et al.</i> , (2013)	<i>A. oswaldoi B</i>	KC555073
13	543oswBTart-AP	Tartarugalzinho/AP	98%	Rúbio-Palis <i>et al.</i> , (2013)	<i>A. oswaldoi B</i>	KC555073
14	461oswACoa-AM	Coari/AM	100%	Ruiz <i>et al.</i> , (2013)	<i>A. oswaldoi A</i>	KF809050
15	472oswACoa-AM	Coari/AM	99%	Ruiz <i>et al.</i> , (2013)	<i>A. oswaldoi A</i>	KF809050
16	473oswACoa-AM	Coari/AM	99%	Ruiz <i>et al.</i> , (2013)	<i>A. oswaldoi A</i>	KF809079
17	396oswALab-AM	Lábrea/AM	99%	Ruiz <i>et al.</i> , (2013)	<i>A. oswaldoi A</i>	KF809068
18	398oswALab-AM	Lábrea/AM	99%	Ruiz <i>et al.</i> , (2013)	<i>A. oswaldoi A</i>	KF809034
19	400oswALab-AM	Lábrea/AM	100%	Ruiz <i>et al.</i> , (2013)	<i>A. oswaldoi A</i>	KF809034
20	402oswALab-AM	Lábrea/AM	100%	Ruiz <i>et al.</i> , (2013)	<i>A. oswaldoi A</i>	KF809079
21	404oswALab-AM	Lábrea/AM	100%	Ruiz <i>et al.</i> , (2013)	<i>A. oswaldoi A</i>	KF809068
22	406oswALab-AM	Lábrea/AM	99%	Ruiz <i>et al.</i> , (2013)	<i>A. oswaldoi A</i>	KF809050
23	408oswALab-AM	Lábrea/AM	99%	Ruiz <i>et al.</i> , (2013)	<i>A. oswaldoi A</i>	KF809079
24	410oswALab-AM	Lábrea/AM	99%	Ruiz <i>et al.</i> , (2013)	<i>A. oswaldoi A</i>	KF809079
25	412oswALab-AM	Lábrea/AM	99%	Ruiz <i>et al.</i> , (2013)	<i>A. oswaldoi A</i>	KF809079
26	414oswALab-AM	Lábrea/AM	99%	Ruiz <i>et al.</i> , (2013)	<i>A. oswaldoi A</i>	KF809079
27	416oswALab-AM	Lábrea/AM	100%	Ruiz <i>et al.</i> , (2013)	<i>A. oswaldoi A</i>	KF809068
28	418oswALab-AM	Lábrea/AM	100%	Ruiz <i>et al.</i> , (2013)	<i>A. oswaldoi A</i>	KF809050
29	594oswACalc-AP	Calçoene/AP	98%	Ruiz <i>et al.</i> , (2013)	<i>A. oswaldoi A</i>	KF809069

30	236oswAMatFo-AP	Mata-fome/AP	99%	Ruiz <i>et al.</i> , (2013)	<i>A. oswaldoi</i> A	KF809054
31	350oswAPit-AM	Pitinga/AM	98%	Ruiz <i>et al.</i> , (2013)	<i>A. oswaldoi</i> A	KF809039
32	351oswAPit-AM	Pitinga/AM	98%	Ruiz <i>et al.</i> , (2013)	<i>A. oswaldoi</i> A	KF809039
33	608oswAPit-AM	Pitinga/AM	98%	Ruiz <i>et al.</i> , (2013)	<i>A. oswaldoi</i> A	KF809069
34	609oswAPit-AM	Pitinga/AM	98%	Ruiz <i>et al.</i> , (2013)	<i>A. oswaldoi</i> A	KF809069
35	517oswASCach-PA	Se.do cachorro/PA	98%	Ruiz <i>et al.</i> , (2013)	<i>A. oswaldoi</i> A	KF809068
36	522oswASCach-PA	Se.do cachorro/PA	98%	Ruiz <i>et al.</i> , (2013)	<i>A. oswaldoi</i> A	KF809034
37	528oswASCach-PA	Se.do cachorro/PA	98%	Ruiz <i>et al.</i> , (2013)	<i>A. oswaldoi</i> A	KF809069
38	454oswAStaB-AP	Sta. Barbara/AP	99%	Ruiz <i>et al.</i> , (2013)	<i>A. oswaldoi</i> A	KF809054
39	352kondAut-AM	Autazes/AM	99%	Sallum <i>et al.</i> , (2008)	<i>A. konderi</i>	JF923716
40	353kondAut-AM	Autazes/AM	99%	Sallum <i>et al.</i> , (2008)	<i>A. konderi</i>	JF923716
41	354kondAut-AM	Autazes/AM	99%	Sallum <i>et al.</i> , (2008)	<i>A. konderi</i>	JF923716
42	355kondAut-AM	Autazes/AM	99%	Sallum <i>et al.</i> , (2008)	<i>A. konderi</i>	JF923716
43	356kondAut-AM	Autazes/AM	99%	Sallum <i>et al.</i> , (2008)	<i>A. konderi</i>	JF923716
44	357kondAut-AM	Autazes/AM	99%	Sallum <i>et al.</i> , (2008)	<i>A. konderi</i>	JF923716
45	358kondAut-AM	Autazes/AM	99%	Sallum <i>et al.</i> , (2008)	<i>A. konderi</i>	JF923716
46	439kondSMig-RO	São Miguel/RO	99%	Sallum <i>et al.</i> , (2008)	<i>A. konderi</i>	JF923716
47	440kondSMig-RO	São Miguel/RO	99%	Sallum <i>et al.</i> , (2008)	<i>A. konderi</i>	JF923716
48	441kondSMig-RO	São Miguel/RO	99%	Sallum <i>et al.</i> , (2008)	<i>A. konderi</i>	JF923716
49	444kondSMig-RO	São Miguel/RO	99%	Sallum <i>et al.</i> , (2008)	<i>A. konderi</i>	JF923716
50	445kondSMig-RO	São Miguel/RO	99%	Sallum <i>et al.</i> , (2008)	<i>A. konderi</i>	JF923716
51	447kondSMig-RO	São Miguel/RO	99%	Sallum <i>et al.</i> , (2008)	<i>A. konderi</i>	JF923716
52	448kondSMig-RO	São Miguel/RO	99%	Sallum <i>et al.</i> , (2008)	<i>A. konderi</i>	JF923716
53	449kondSMig-RO	São Miguel/RO	99%	Sallum <i>et al.</i> , (2008)	<i>A. konderi</i>	JF923716
54	450kondSMig-RO	São Miguel/RO	99%	Sallum <i>et al.</i> , (2008)	<i>A. konderi</i>	JF923716
55	451kondSMig-RO	São Miguel/RO	99%	Sallum <i>et al.</i> , (2008)	<i>A. konderi</i>	JF923716
56	452kondSMig-RO	São Miguel/RO	99%	Sallum <i>et al.</i> , (2008)	<i>A. konderi</i>	JF923716
57	497kondAut-AM	Autazes/AM	99%	Sallum <i>et al.</i> , (2008)	<i>A. konderi</i>	JF923716
58	498kondAut-AM	Autazes/AM	99%	Sallum <i>et al.</i> , (2008)	<i>A. konderi</i>	JF923716
59	367kondAut-AM	Autazes/AM	99%	Sallum <i>et al.</i> , (2008)	<i>A. konderi</i>	JF923716
60	368kondAut-AM	Autazes/AM	99%	Sallum <i>et al.</i> , (2008)	<i>A. konderi</i>	JF923716
61	597kondSant-AP	Ilha de Santana/AP	100%	Sallum <i>et al.</i> , (2008)	<i>A. konderi</i>	JF923716
62	598kondSant-AP	Ilha de Santana/AP	100%	Sallum <i>et al.</i> , (2008)	<i>A. konderi</i>	JF923716
63	599kondSant-AP	Ilha de Santana/AP	100%	Sallum <i>et al.</i> , (2008)	<i>A. konderi</i>	JF923716

64	584kondMatF-AP	Mata-fome/AP	100%	Sallum <i>et al.</i> , (2008)	<i>A. konderi</i>	JF923716
65	585kondMatF-AP	Mata-fome/AP	100%	Sallum <i>et al.</i> , (2008)	<i>A. konderi</i>	JF923716
66	586kondMatF-AP	Mata-fome/AP	100%	Sallum <i>et al.</i> , (2008)	<i>A. konderi</i>	JF923716
67	488kondPVel-RO	Porto Velho/RO	99%	Sallum <i>et al.</i> , (2008)	<i>A. konderi</i>	JF923716
68	499kondSMig-RO	São Miguel/RO	99%	Sallum <i>et al.</i> , (2008)	<i>A. konderi</i>	JF923716
69	500kondSMig-RO	São Miguel/RO	99%	Sallum <i>et al.</i> , (2008)	<i>A. konderi</i>	JF923716
70	501kondSMig-RO	São Miguel/RO	99%	Sallum <i>et al.</i> , (2008)	<i>A. konderi</i>	JF923716
71	502kondSMig-RO	São Miguel/RO	99%	Sallum <i>et al.</i> , (2008)	<i>A. konderi</i>	JF923716
72	514kondSCac-PA	Se.do cachorro/PA	99%	Sallum <i>et al.</i> , (2008)	<i>A. konderi</i>	JF923716
73	524kondSCac-PA	Se.do cachorro/PA	99%	Sallum <i>et al.</i> , (2008)	<i>A. konderi</i>	JF923716
74	530kondSCac-PA	Se.do cachorro/PA	99%	Sallum <i>et al.</i> , (2008)	<i>A. konderi</i>	JF923716
75	532kondSCac-PA	Se.do cachorro/PA	99%	Sallum <i>et al.</i> , (2008)	<i>A. konderi</i>	JF923716
76	462kondStB-AP	Sta. Barbara/AP	100%	Sallum <i>et al.</i> , (2008)	<i>A. konderi</i>	JF923716
77	424nr.kondNON-AM	Nova Olinda/AM	99%	Linton <i>et al.</i> , (2013)	<i>A. sp. nr. konderi</i>	KF809138
78	487nrkonderiPV-RO	Porto Velho/RO	99%	Linton <i>et al.</i> , (2013)	<i>A. sp. nr. konderi</i>	KF809137
79	477nrkondRBra-AC	Rio Branco/AC	99%	Linton <i>et al.</i> , (2013)	<i>A. sp. nr. konderi</i>	KF809137
80	479nrkondRBra-AC	Rio Branco/AC	99%	Linton <i>et al.</i> , (2013)	<i>A. sp. nr. konderi</i>	KF809137
81	481nrkondRBra-AC	Rio Branco/AC	100%	Linton <i>et al.</i> , (2013)	<i>A. sp. nr. konderi</i>	KF670997
82	471nrkondSMad-AC	Sena Madureira/AC	100%	Linton <i>et al.</i> , (2013)	<i>A. sp. nr. konderi</i>	KF670997
83	469nrkondTran-AC	Transacreeana/AC	99%	Linton <i>et al.</i> , (2013)	<i>A. sp. nr. konderi</i>	KF670998
84	Grupo Externo	Mata-Fome/AP	99%	Foster <i>et al.</i> , (2013)	<i>A. goeldii</i>	JF923704
85	Grupo Externo	Mata-Fome/AP	99%	Ruiz <i>et al.</i> , (2012)	<i>A. marajoara</i>	JQ615447

APÊNDICE D. Sítios variáveis e fixos (em destaque) entre espécies obtidas nas sequências de *ITS2*.

Genótipos	Espécie	Nº	1	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4																	
			9	4	9	1	2	2	5	7	8	9	9	3	4	4	4	5	5	6	7	7	9	4	6	7	9	5	9	1	6	9	3	7	2	0	6	1	3	2
HI	<i>A. oswaldoi s.s.</i>	1	A	C	T	C	-	A	C	A	C	C	A	T	C	C	C	G	G	-	-	-																		
HII	<i>A. oswaldoi s.s.</i>	2	A	C	T	C	-	A	C	A	C	C	A	T	C	G	T	G	G	A	C	-																		
HIII	<i>A. oswaldoi A</i>	9	G	C	T	C	-	A	C	A	C	A	A	C	C	A	T	G	G	G	A	-																		
HIV	<i>A. oswaldoi A</i>	1	G	C	T	A	-	A	C	A	C	A	A	C	C	A	T	G	G	G	A	-																		
HV	<i>A. oswaldoi B</i>	5	A	T	T	C	A	A	-	A	A	G	C	C	C	A	T	C	A	A	C	A																		
HVI	<i>A. konderi</i>	2	A	T	A	A	A	G	C	A	C	A	A	C	T	A	T	G	G	G	A	A																		
HVII	<i>A. konderi</i>	3	A	T	T	C	A	A	C	A	C	A	A	C	T	A	T	G	G	G	A	G																		
HVIII	<i>A. sp. nr. konderi</i>	1	A	T	T	A	G	G	C	A	C	A	A	C	C	A	T	G	G	G	A	-																		
HIX	<i>A. sp. nr. konderi</i>	2	A	T	A	A	G	G	C	A	C	A	A	C	C	A	T	G	G	A	C	A																		
HX	<i>A. sp. nr. konderi</i>	1	A	T	A	A	G	G	C	T	C	A	A	C	C	A	T	G	G	A	C	-																		