

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



"ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA DE LAS
POBLACIONES DE *Anopheles pseudopunctipennis*
THEOBALD DE LA ZONA IDENTIFICADA COMO
DE CONVERGENCIA POBLACIONAL ENTRE
MEXICO Y AMERICA CENTRAL."

T E S I S

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN ENTOMOLOGIA MEDICA

PRESENTA

BIOL. MAURICIO CASAS MARTINEZ

San Nicolás de los Garza, Nuevo León

Abril de 2004

TM

Z5320

FCB

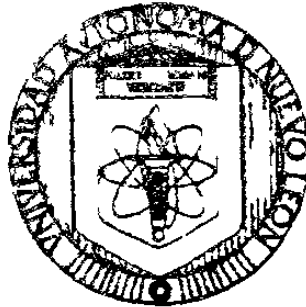
2004

.C3



1020112187

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA DE LAS
POBLACIONES DE *Anopheles pseudopunctipennis*
THEOBALD DE LA ZONA IDENTIFICADA COMO
DE CONVERGENCIA POBLACIONAL ENTRE
MÉXICO Y AMÉRICA CENTRAL

T E S I S

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN ENTOMOLOGÍA MÉDICA

PRESENTA

BI MAURICIO CASAS MARTINEZ

San Nicolás de los Garza, Nuevo León

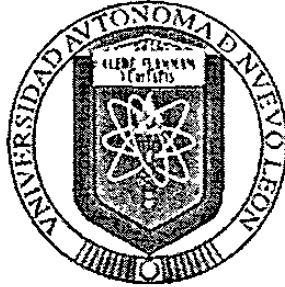
Abril de 2004

TH
Z
T
20
.



FONDO
TESIS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



“ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA DE LAS POBLACIONES
DE *Anopheles pseudopunctipennis* THEOBALD DE LA ZONA
IDENTIFICADA COMO DE CONVERGENCIA POBLACIONAL
ENTRE MÉXICO Y AMÉRICA CENTRAL”

TESIS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
ENTOMOLOGÍA MÉDICA

PRESENTA

BIOL. MAURICIO CASAS MARTINEZ

San Nicolás de los Garza, Nuevo León.

Abril de 2004.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

"ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA DE LAS POBLACIONES
DE *Anopheles pseudopunctipennis* THEOBALD DE LA ZONA
IDENTIFICADA COMO DE CONVERGENCIA POBLACIONAL
ENTRE MEXICO Y AMERICA CENTRAL"

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN ENTOMOLOGIA MEDICA

PRESENTA

BIOL. MAURICIO CASAS MARTINEZ

COMISION DE TESIS



DR. ILDEFONSO FERNANDEZ SALAS

PRESIDENTE



DRA. ADRIANA ELIZABETH FLORES SUAREZ

SECRETARIO



DR. ROBERTO MERCADO HERNANDEZ

VOCAL



DR. MARIO HENRY RODRIGUEZ LOPEZ

ASESOR EXTERNO

DEDICATORIA

A mis seres queridos:

*Genaro Casas Gutiérrez y
María Luisa Martínez de Casas,
mis adorados padres;*

*María del Pilar y
Laura Casas Martínez,
mis queridas hermanas;*

*Juana González Miguel,
mi comprensiva abuelita;*

*Abril Casas Díaz
mi pequeña hija;*

*Luz María Díaz Becerra y
Martín A. Rosales Díaz;
con sincero aprecio.*

Por el profundo significado sentimental que lleva cada uno de ustedes en las distintas etapas de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo financiero otorgado al proyecto de investigación CHIS-S-010 a través del Sistema de Investigación "Benito Juárez" (SIBEJ).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo financiero otorgado a través de la beca con número de registro 94340 para la realización de estudios de postgrado en la Universidad Autónoma de Nuevo León.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Mario H. Rodríguez López, por ser el principal asesor en mi formación profesional y guía en la investigación científica.

Al Dr. Ildefonso Fernández Salas, por la confianza y apoyo incondicional durante mi especialización como entomólogo médico y estancia en la UANL.

Al Dr. Américo D. Rodríguez Ramírez, por su invaluable colaboración y sugerencias a lo largo de pruebas de laboratorio y las críticas al manuscrito de tesis.

Al Dr. Fidel de la Cruz Hernández Hernández y colaboradores, por la capacitación y asesoría en la implementación de pruebas moleculares (RAPD-PCR), además de las facilidades brindadas para trabajar en el CINVESTAV-IPN.

Al Dr. Juan I. Arredondo Jiménez, por sus valiosos comentarios y apoyo logístico durante el trabajo de campo.

Al Ing. Salvador Partida Pérez, por su apoyo en la administración de los recursos de proyecto.

A los señores René Monzón Vera y Jorge Calderón Ralón por su apoyo técnico en los muestreos entomológicos en Centro América.

A los profesores titulares Dr. Humberto Quiroz M., Dr. Filiberto Reyes V., Dr. Mohammad Badii, Dra. Adriana E. Flores S., Dr. Roberto Mercado H., M. en C. Alfonso Flores L., Dr. Ricardo Fuentes P. y Dr. Rahim Foroughbakhch, por compartir sus conocimiento a las futuras generaciones de postgraduados.

A mis compañeros y camaradas de la maestría, Enrique Carmona N. (*in memoria*), Guillermo Bond Compeán, Martín Reyna N., Francisco Espinosa G., José G. Ordóñez G. y Marcelo Carvalho de R., por su amistad sincera, momentos compartidos y buenos recuerdos.

Al Dr. Armando Ulloa G., M. en C. Rogelio Danis L., Dr. José Luis Torres E., Dra. Patricia Penilla N., Dra. Lilia González C., Dr. David N. Bown, M en C. Arnoldo Orozco B., Dra. Teresa López O., Dr. Cuauhtémoc Villarreal T., Dra. Ma. del Carmen Rodríguez G. y M. en C. Jorge A. Torres M., por sus muestras de amistad y consejos profesionales.

A la comunidad de entomólogos médicos formados en la UANL, por su solidaridad y reconocimiento como integrante de este grupo privilegiado de especialistas.

A la familia Rodríguez Ramírez por su amable hospitalidad, afecto y consideraciones especiales durante mi permanencia en la Cd. de Monterrey, N. L.

A Gonzalo A. Olivar Vallejo, por su amistad y apoyo moral a pesar de la distancia.

A todas aquellas personas que en algún momento durante el desarrollo de mi tesis contribuyeron de manera directa o indirecta y activa o pasiva para concluir este trabajo.

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Sitios de colecta y relación de muestras poblacionales de *An. pseudopunctipennis* para los análisis moleculares.

Tabla 2. Iniciadores comerciales seleccionados para la amplificación por PCR de regiones aleatorias del DNA genómico de *An. pseudopunctipennis* silvestres.

Tabla 3. Matriz de distancias genéticas de Nei (1972) entre las poblaciones geográficas de *An. pseudopunctipennis* analizadas con marcadores RAPD-PCR.

Tabla 4. Variabilidad genética (F_{ST}) y tasa de migración efectiva (N_m) por locus para las poblaciones de *An. pseudopunctipennis* distribuidas en Belice, Guatemala y el sur de México.

Figura 1. Mapa físico del área de estudio comprendida por la zona de convergencia genotípica de *An. pseudopunctipennis*.

Figura 2. Localización geográfica de los sitios de muestreo poblacional de *An. pseudopunctipennis* en las temporadas secas de 1997 y 1998.

Figura 3. Diagrama del proceso y condiciones programadas para la amplificación aleatoria de regiones polimórficas del DNA por reacción en cadena de la polimerasa (RAPD-PCR).

Figura 4. Perfiles moleculares del DNA de *An. pseudopunctipennis* con diferentes iniciadores arbitrarios comerciales.

Figura 5. Dendrograma de las relaciones genéticas entre los diferentes grupos poblacionales de *An. pseudopunctipennis* analizados con marcadores RAPD-PCR.

Figura 6. Dendrograma del análisis múltiple de series de datos moleculares (bootstrapping). Los valores sobre la base de cada rama indican la consistencia (número de veces) con que fueron apoyadas las relaciones entre los grupos poblacionales de *An. pseudopunctipennis*, después del consenso de 100 repeticiones.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	3
ANTECEDENTES	8
JUSTIFICACION	14
OBJETIVOS	15
HIPOTESIS	16
MATERIALES Y METODOS	17
<i>a) Area de estudio</i>	17
<i>b) Muestreo de Anopheles pseudopunctipennis silvestres</i>	18
<i>c) Aislamiento del DNA genómico de los mosquitos de campo</i>	20
<i>d) Tamizaje de las secuencias arbitrarias para el análisis genético</i>	21
<i>e) Mezcla de reacciones y condiciones de amplificaciones por PCR</i>	22
<i>f) Electroforesis de los productos de PCR</i>	23
<i>g) Análisis de datos</i>	25
RESULTADOS	27
<i>Anopheles pseudopunctipennis de poblaciones naturales</i>	27
<i>Marcadores RAPD-PCR de diagnóstico</i>	27
<i>Análisis de múltiples locus con marcadores moleculares</i>	28
<i>Estructura geográfica y flujo de genes</i>	28

DISCUSION	30
CONCLUSIONES	35
LITERATURA CITADA	36

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue el análisis de la estructura genética de *Anopheles pseudopunctipennis* para comparar los perfiles moleculares y determinar su distribución en la zona de convergencia genotípica, localizada al norte de América Central y el sur de México. Durante las temporadas secas de 1997 y 1998, se realizaron colectas de mosquitos en diferentes sitios geográficos de Belice, Guatemala y el estado de Chiapas, utilizando métodos entomológicos convencionales de pesquisa larvaria, capturas sobre cebo humano y trampa Magoon y de mosquitos reposando en corrales. El número total de mosquitos colectados fue de 776, los cuales representaron a 15 poblaciones geográficas de 5 estados de 3 países. De estos mosquitos, se aislaron 139 muestras individuales de DNA genómico. La mezcla de reacción y las condiciones de amplificación de DNA por PCR se estandarizaron con DNA de *An. pseudopunctipennis* de una colonia previamente establecida en el insectario del CIP/INSP. Se tamizaron 60 iniciadores comerciales con 29 muestras de DNA de mosquitos de campo. Para llevar a cabo las reacciones de PCR, fueron seleccionados 5 iniciadores con secuencias arbitrarias que proporcionaron 64 marcadores moleculares de diagnóstico. El análisis molecular definitivo incluyó 139 muestras de DNA, organizadas en 5 grupos poblacionales: I) Belice (27 mosquitos de 2 sitios); II) Guatemala (68 mosquitos de 6 sitios); III) Chiapas Sur (31 mosquitos de 4 sitios); IV) Chiapas Selva (2 mosquitos de 1 sitio) y; V) Chiapas Norte (11 mosquitos de 2 sitios). Los productos de la amplificación por PCR fueron visualizados por medio de electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Los patrones electroforéticos obtenidos se codificaron con valores de 0 y 1 de acuerdo a la ausencia/presencia de las bandas en los geles. Para el análisis estadístico de los datos se aplicaron los programas computacionales: RAPDDIST para estimar la distancia genética (D) de Nei entre las poblaciones; NEIGHBOR para la

construcción de un dendrograma de las relaciones de parentesco; y RAPDFST para calcular los valores de la variabilidad genética (F_{ST}) y la tasa de migración efectiva (N_m) entre los grupos poblacionales en estudio. Desde el punto de vista macrogeográfico, los valores de D estuvieron dentro del intervalo de 0.0161-0.2221 entre las distintas poblaciones geográficas. Por otra parte, los promedios de F_{ST} y N_m fueron de 0.059 y 4.0, respectivamente. De acuerdo con estos resultados, se determinó que los grupos poblacionales de *An. pseudopunctipennis* presentaron genotipos homogéneos, indicando que el flujo de genes ocurre con intensidad moderada entre los mosquitos de Guatemala, Chiapas Sur y Selva, a diferencia de las poblaciones de Chiapas Norte y Belice que presentaron mayor diferenciación genética. Ésta fue significativa sólo en algunos loci, que indican la conformación de 2 grupos aparentemente segregados. Por lo anterior, se concluyó que la metapoblación de *An. pseudopunctipennis* estudiada pertenece a la misma especie, por presentar poca variabilidad interpoblacional, sin embargo, es posible que se esté iniciando un proceso de diferenciación genética en el grupo de mosquitos de Belice.

INTRODUCCION

La clase *Insecta* constituye el grupo de animales más exitoso y de mayor diversidad en todos los ecosistemas, con excepción del mar. Entre las características importantes a las que deben su éxito en la colonización de nuevos hábitats destacan: el ciclo de vida corto, la capacidad de evolucionar rápidamente para explotar nuevos nichos y la facultad de separar las fases de crecimiento y dispersión. De tal manera que son expertos en el aprovechamiento de los recursos agrícolas, así como de fuentes de proteína disponibles que incluyen a la sangre humana y la de los animales (Crampton *et al.*, 1997). Se estima que el número de especies existentes de insectos es de entre 1 y 10 millones. Aunque una proporción baja de ellas se alimenta de sangre de vertebrados, alrededor de 300-400 especies de insectos hematófagos son de importancia para la humanidad (Lehane, 1996). Sin embargo, estos grupos taxonómicos de interés biomédico representan una seria amenaza para la salud debido a que tienen la capacidad de inocular agentes infecciosos como protozoarios, helmintos, bacterias y virus (Harwood y James, 1993). Al conjuntarse, estos tres elementos, huésped, patógeno y vector, se establecen los ciclos de transmisión para una amplia variedad de enfermedades.

El hábito de la hematofagia ha evolucionado en diferentes líneas de especialización ecológica independientes. No obstante, los insectos así considerados se han unificado fisiológicamente por la necesidad de adquirir proteínas a partir de la sangre de otro animal, formando un agrupamiento diverso en términos taxonómicos (Crosskey, 1988). Por ejemplo, algunas especies de mosquitos son muy similares en base a su apariencia externa, por esta razón, son clasificados en grupos o complejos, dentro de los cuales todos los componentes están relacionados estrechamente y, en algunos casos, pueden llegar a ser indistinguibles morfológicamente (Barr, 1988).

En algunos grupos existen subpoblaciones que presentan diferencias en su biología, comportamiento e importancia médico-veterinaria, constituyendo especies crípticas o isomórficas (Wilkerson *et al.*, 1993a; Black y Munstermann, 1996). Los miembros de estos grupos de especies crípticas no pueden ser diferenciados fácilmente por medio de sus caracteres morfológicos. A pesar de la existencia de un catálogo de los mosquitos del mundo (Knight y Stone, 1977), de literatura disponible en donde se describen detalladamente los distintos estadios de desarrollo de los holotipos y de las claves taxonómicas ilustradas para la identificación de las diferentes especies de mosquitos anofelinos del continente americano, algunas veces las referencias bibliográficas sólo corresponden a especies de áreas geográficas limitadas, mientras que otras, no están actualizadas o no son adecuadas (Wilkerson *et al.*, 1993b). La demostración de los complejos de especies hermanas presentes en los grupos de insectos vectores de enfermedades, con especial énfasis en el suborden *Nematocera* del orden *Diptera*, reviste importancia para entender su participación en la epidemiología y transmisión de estas enfermedades. Para estas situaciones especiales, se requiere de nuevas herramientas de diagnóstico para llegar a una resolución taxonómica.

Los estudios conducidos para la investigación de la genética de poblaciones requieren del análisis de numerosos individuos, con múltiples marcadores de tipo molecular para determinar la variabilidad genética en las poblaciones naturales y los factores que afectan esta variación (Tabachnick y Black, 1996).

Actualmente, nuevos métodos y técnicas moleculares van a la vanguardia en la identificación y determinación de los componentes taxonómicos dentro de un complejo de especies (Mitton, 1994). Entre los procedimientos más usados para los estudios de taxonomía molecular y sistemática se encuentran los análisis de

amplificación aleatoria de DNA polimórfico por reacción en cadena de la polimerasa (RAPD-PCR), conformación polimórfica de cadena sencilla (SSCP), DNA ribosomal (rDNA), DNA mitocondrial (mDNA) y microsatélites de DNA, entre otros (Roderick, 1996; Crampton *et al.*, 1997; Munstermann y Conn, 1997).

La técnica de DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD) está basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), lo cual permite amplificar fragmentos anónimos de DNA en número ilimitado en cada uno de los individuos. La particularidad de esta amplificación es el uso de decanucleótidos con secuencias arbitrarias como iniciadores, para detectar diferencias entre poblaciones de los sitios del genoma donde se encuentran los fragmentos complementarios a los iniciadores. De tal manera que algunos de los productos de PCR pueden servir como marcadores moleculares. Esta técnica ha demostrado su utilidad en la detección e identificación de algunos complejos de especies crípticas o isomórficas de mosquitos (Black y DuTeau, 1997).

El análisis de la conformación polimórfica de cadena sencilla (SSCP) consiste en la detección de variantes en la estructura secundaria de cada cadena de DNA, que corresponden a cambios en la conformación de secuencias específicas amplificadas por PCR y marcas radioactivas o quimioluminiscentes observables por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida. Los fragmentos resultantes se someten a calentamiento para disociar la doble cadena e inmediatamente se colocan en hielo. El enfriamiento rápido provoca que la mayoría de las cadenas sencillas no se reasocien con su complemento, plegándose sobre si mismas (González, 1998).

El análisis de DNA mitocondrial (mDNA) se ha usado ampliamente en estudios poblacionales para la discriminación de los elementos constituyentes de

un número importante de complejos de especies de anofelinos, debido a que es heredado maternalmente como unidad de linaje, evoluciona rápidamente y pierde recombinación (Neigel, 1997). Además, cuenta con varias regiones conservadas, por lo tanto, los mismos iniciadores pueden ser usados con diferentes grupos taxonómicos. La variación de mDNA puede analizarse por comparación de secuencias o polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP). El DNA de las mitocondrias animales puede ser purificado fácilmente por ultracentrifugación, de esta manera, las secuencias pueden ser detectadas como patrones de fragmentos con longitud polimórfica (Roderick, 1996; Munstermann y Conn, 1997).

Los genes del DNA ribosomal (rDNA) codifican el rRNA, los cuales comprenden 3 de los principales componentes estructurales de los ribosomas. Debido a que el rDNA está provisto de porciones altamente conservadas, sus secuencias pueden ser usadas como iniciadores para la amplificación de otras regiones de la molécula (espaciadores intergénicos o IGS y espaciadores internos de transcripción o ITS). En general, los ITS son más cortos que los IGS, por esta razón, pueden ser clonados y secuenciados fácilmente por medio de estrategias basadas en PCR. El nivel de diferenciación en la variabilidad de las secuencias dentro y entre los grupos taxonómicos asociados con diferentes regiones del rDNA ofrece la oportunidad de utilizar secuencias de diseño específico para investigar problemas de interés filogenético (Paskewitz y Collins, 1997).

La variación de los microsatélites de DNA entre los individuos se detecta mediante la amplificación por PCR de regiones específicas con iniciadores construidos con secuencias cortas y repetidas de 1-6 bases de longitud (Queller *et al.*, 1993). El diseño de iniciadores específicos requiere de la clonación de múltiples fragmentos de DNA total de la especie de interés (biblioteca genómica), la

hibridización de los fragmentos con secuencias sintetizadas, la selección y secuenciación de las clonas positivas (Roderick, 1996). A pesar de que existen pruebas comerciales de microsatélites, es preferible diseñar los iniciadores para el grupo de organismos que se desea analizar, ya que, en ocasiones, cuando se usan los de otras especies los resultados no son confiables (Dowling *et al.*, 1996).

Dentro de este contexto, el objetivo principal del presente estudio fue la caracterización genética de las poblaciones silvestres de *Anopheles pseudopunctipennis* Theobald mediante la utilización de la técnica molecular de RAPD-PCR y determinar la distribución de los genotipos en la zona de convergencia poblacional localizada al sur de México y porción norte de América Central, con la finalidad de obtener nuevas evidencias sobre la existencia de un complejo de especies.

ANTECEDENTES

Al principio de los años 60's, Simpson (1961) definió a la sistemática como el estudio científico de las especies, la diversidad de los organismos y las relaciones entre ellos. Hoy en día, el término biosistemática remarca la necesidad de tomar en consideración, además del criterio morfológico, los aspectos ecológicos, etológicos, fisiológicos y genéticos para identificar y definir a las especies (Service, 1988). Desde el punto de vista biológico, el concepto de especie se entiende como el conjunto de poblaciones de organismos capaces de realizar entrecruzamientos bajo condiciones naturales y permanecer reproductivamente aislados de otras poblaciones (Mayr, 1942; Audesirk y Audesirk, 1993). Por otra parte, el enfoque alternativo de agrupamiento genotípico propone agregar al concepto biológico los descubrimientos de genética mendeliana, bioquímica y molecular con el propósito de formular una concepción más completa de especie (Mallet, 1995). Actualmente, esta definición es útil para designar a un grupo de individuos distinguible morfológicamente con la posibilidad de considerar algunas formas intermedias (politípicas) al interactuar con otros grupos de organismos, con patrones discretos de diferenciación genética mantenidos por la continuidad reproductiva y el flujo de genes entre las poblaciones (Mallet, 1995). Este nuevo concepto, se ha comenzado a usar en los estudios recientes de taxonomía, biodiversidad y evolución.

La mayoría de las especies de artrópodos de importancia médica y veterinaria presentan patrones de distribución espacial en grupos o conglomerados. Esta característica confiere a las poblaciones de vectores una mayor capacidad de intercambio genético entre los individuos. Por esta razón, las especies biológicas son consideradas como entidades evolutivas (Simpson, 1961), en donde los cambios de las frecuencias genotípicas se deben principalmente a

cinco factores que influyen significativamente sobre la estructura genética de las poblaciones silvestres: apareamiento aleatorio, tamaño de la población, migración, mutación y selección natural (Tabachnick y Black, 1996). Como una consecuencia de estos procesos naturales, algunos grupos de mosquitos transmisores de paludismo se han conformado como complejos de especies hermanas o crípticas. Por ejemplo, el complejo *Anopheles gambiae* s. l. está integrado por 6 especies isomórficas entre las que destaca *An. gambiae* s. s. como el miembro más antropofílico de este grupo con amplia distribución en África tropical, en donde constituyen el más eficiente sistema vectorial del mundo; el complejo *Anopheles dirus* s. l. incluye al menos 7 especies presentes en las áreas selváticas de Asia suroriental, que en conjunto son consideradas como un grupo de importancia epidemiológica comparable con las especies africanas. Asimismo, el complejo sudamericano *Anopheles albitarsis-marajoara* s. l. es considerado como una serie neotropical emergente compuesta por 4 especies de vectores potenciales de paludismo en el noreste de la región amazónica (Gale y Crampton, 1987; Panyim *et al.*, 1988; Wilkerson *et al.*, 1995; Mustermann, 1995).

Por lo anterior, los complejos de especies crípticas están constituidos por grupos de individuos que son indistinguibles morfológicamente lo que dificulta su identificación por medio de la observación directa de los especímenes (Crosskey, 1988; Wilkerson *et al.*, 1993a), no obstante, las especies constituyentes pueden presentar diferentes tipos de caracteres polimórficos particulares o genotipos, que se basan en los perfiles moleculares que describen los marcadores genéticos proporcionados por alguna técnica molecular para el análisis del DNA.

Anopheles pseudopunctipennis fue descrito por Theobald en 1901 a partir de ejemplares procedentes de la isla de Granada (Pequeñas Antillas). De acuerdo con el Sistema Integrado de Clasificación Taxonómica (SIIT^{mx}), los mosquitos de esta

especie pertenecen al reino *Animalia*, phylum *Arthropoda*, subphylum *Hexapoda*, clase *Insecta*, subclase *Pterygota*, superorden *Neoptera*, orden *Diptera*, suborden *Nematocera*, infraorden *Culicimorpha*, familia *Culicidae*, subfamilia *Anophelinae*, género *Anopheles* y subgénero *Anopheles*. El taxón está integrado por la variante *bifoliata* de Colombia y las subespecies *levicastilloi* y *rivadeneirai* de Ecuador, *neghmei* y *noei* de Chile y *patersoni* de Argentina, todas ellas descritas en el catálogo de los mosquitos del mundo (Knight y Stone, 1977, WRBU, 2001). La clasificación anterior se basó principalmente en caracteres morfológicos particulares de los huevos, larvas, adultos y diferencias estructurales del aparato genital masculino, así como, en aspectos ecológicos significativos entre los grupos poblacionales de las diferentes áreas biogeográficas en donde se encuentran distribuidos (Levi-Castillo, 1944; Levi-Castillo, 1945). Recientemente, se han incluido nuevas características relacionadas con la forma, distribución y número de cerdas en las larvas de IV estadio y pupas (quetotaxía), además de los patrones de escamas sobre las alas, la coloración de las extremidades posteriores de las hembras en las claves taxonómicas (Wilkerson *et al.*, 1993b; Ibáñez-Bernal y Martínez-Campos, 1994).

Anopheles pseudopunctipennis es una de las cinco especies más importantes de mosquitos transmisores de paludismo en la región tropical del continente Americano, ocupando un amplio rango de distribución geográfica y encontrándose principalmente en las áreas montañosas de México, Guatemala, Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú, Chile, Bolivia y Argentina, donde se ha incriminado como vector primario. Además de su presencia en Estados Unidos, Belice, Honduras, Nicaragua, El Salvador, Costa Rica, Panamá, Trinidad y Tobago y las Pequeñas Antillas (Fleming, 1986). En nuestro país, *An. pseudopunctipennis* ha sido incriminado como el principal vector de *Plasmodium vivax* en la porción de pie de monte y se encuentra presente en varias entidades federativas, principalmente en algunos estados de la costa del Océano Pacífico, Chiapas, Oaxaca, Guerrero y

Sinaloa (Rodríguez y Loyola, 1989; Loyola *et al.*, 1990; Fernández-Salas *et al.*, 1994) donde se han concentrado la mayoría de casos de paludismo en los últimos años, llegando a constituir focos endémicos de transmisión (Rodríguez *et al.*, 1998; SSA, 2001).

La idea de que *An. pseudopunctipennis sensu lato* está conformado por un complejo de especies crípticas surgió como resultado de la asociación de dos aspectos relevantes y característicos, en primer lugar, la distribución geográfica extensa y, por otra parte, el alto nivel de variabilidad fenotípica de los individuos de este grupo taxonómico (Bruce-Chwatt, 1985). El primer estudio sobre la caracterización genética de las poblaciones de *An. pseudopunctipennis* s. l. se realizó mediante el análisis electroforético de aloenzimas y DNA ribosomal (Estrada-Franco *et al.*, 1993a), los resultados obtenidos con respecto a la distancia genética derivada del análisis electroforéticos y al polimorfismo del DNA ribosomal observado entre las poblaciones mexicanas y sudamericanas demostraron dos agrupamientos distintivos, uno en el centro de México (grupo A) y el otro en los valles y pendientes de la región andina de Perú y Bolivia (grupo B). Complementariamente, Estrada-Franco y colaboradores (1993b) llevaron a cabo experimentos de entrecruzamiento de colonias iniciadas a partir de poblaciones nativas de esta especie en México, Bolivia y Perú. Los resultados revelaron esterilidad híbrida unidireccional macho/hembra en las cruzas de hembras mexicanas con machos sudamericanos. Con la información proporcionada por ambos trabajos se concluyó que la existencia de un patrón de diferenciación genética consistente sugería la presencia de por lo menos dos especies hermanas alopátricas.

Posteriormente, Manguin y colaboradores (1995) analizaron comparativamente la estructura y la variabilidad genética, por medio de

electroforesis de isoenzimas, de 42 poblaciones de *An. pseudopunctipennis*, incluyendo a la variante (*bifoliata*) y las cinco subespecies (*levicastilloi*, *rivadeneirai*, *neghmei*, *noei* y *patersoni*). En este estudio, los rangos de la distancia de Nei mostraron poca divergencia genética y las poblaciones se congregaron en tres grupos definidos geográficamente: 1) Norte América (Estados Unidos, México y Guatemala); 2) Belice-Sudamérica (Colombia, Ecuador, Perú, Chile y Argentina); y 3) Isla de Granada (localidad tipo). Además, se identificó una zona de convergencia genotípica entre las poblaciones de tierra firme (Norte América y Centro-Sur de América), donde se encontró la mayor variabilidad entre las distintas poblaciones de mosquitos nativos de esta especie. La "zona de sutura" fue localizada en el sur de México, el este de Guatemala y el sur de Belice. Los investigadores interpretaron las diferencias genéticas como variación clinal, es decir, variabilidad genotípica debida al distanciamiento geográfico entre los grupos poblacionales sin ser un indicativo de especies hermanas. En términos biológicos, argumentaron que en la zona de convergencia genotípica se lleva a cabo el flujo de genes con mayor intensidad entre los grupos poblacionales de la parte norte y sur de América, después de un periodo de separación prolongado (Munstermann, 1995).

Históricamente, el estado taxonómico de *An. pseudopunctipennis* se ha caracterizado por ser polémico y controvertido. En la actualidad, la necesidad de resolver este problema biosistemático se debe a que esta especie de mosquito presenta inconsistencia en el nivel de participación en la transmisión biológica del agente causal del paludismo humano en el continente Americano, ya que sólo en 9 países ha sido incriminado como vector primario, mientras que en otros 10 países se ha considerado como vector secundario de esta enfermedad (Fleming, 1986). Por esta razón, se planteó como objetivo principal del presente trabajo la identificación de los caracteres genéticos de diagnóstico, mediante el empleo de la

técnica de DNA polimórfico amplificado al azar (RAPD-PCR), con mosquitos de poblaciones silvestres de esta especie distribuidas en México y a lo largo de la región norte de América Central comprendida por Guatemala y Belice, con la finalidad de contribuir con nuevos elementos para esclarecer la situación taxonómica de *An. pseudopunctipennis*.

JUSTIFICACION

Gran parte de las investigaciones en el campo de la entomología a nivel mundial, se han enfocado principalmente a buscar estrategias alternativas y proponer soluciones para los problemas relacionados con el control de los distintos órdenes de insectos de importancia agrícola, médica y veterinaria. La variabilidad de la capacidad vectorial entre los componentes de los complejos de especies crípticas involucradas en la transmisión de enfermedades tropicales, como el paludismo, se ha mantenido como una cuestión aún sin resolver dentro del contexto epidemiológico. Desde este punto de vista, los estudios taxonómicos actuales emplean nuevas técnicas y procedimientos que sirven como herramientas para la descripción de la identidad genética de los individuos y composición específica de las comunidades de mosquitos, a través de métodos moleculares rápidos y confiables.

A pesar de los múltiples trabajos de taxonomía clásica, los estudios genéticos macrogeográficos y los intentos de hibridación entre grupos geográficos diferentes de *An. pseudopunctipennis*, la existencia de un complejo de especies crípticas es controversial. Sin embargo, existe consenso en que la conformación de la "zona híbrida", en donde al parecer se separan las 2 formas geográficas de esta especie merece ser investigada para aclarar la composición específica de este taxón con un enfoque molecular. La finalidad de este estudio fue la caracterización molecular de la metapoblación de *An. pseudopunctipennis* distribuida en la zona de sutura, para proporcionar información sobre la estructura genética a nivel microgeográfico y discernir sobre la posible existencia de un complejo de especies crípticas en esa región de América.

OBJETIVOS

General

- Analizar la estructura genética de distintos grupos poblacionales de *An. pseudopunctipennis* procedentes de Belice, Guatemala y el sur de México, mediante el empleo de la técnica molecular de RAPD-PCR.

Específicos

- Identificar marcadores moleculares de secuencias aleatorias de DNA de poblaciones simpátricas y alopátricas de *An. pseudopunctipennis* de la denominada "zona de sutura" en la región norte de América Central;
- Determinar la distribución geográfica de los perfiles moleculares identificados entre las poblaciones silvestres de *An. pseudopunctipennis* del área de estudio;
- Estimar las relaciones genéticas y el flujo de genes entre las poblaciones de *An. pseudopunctipennis* estudiadas.

12187

HIPOTESIS

- La probable existencia de un complejo de especies crípticas dentro de la metapoblación de *An. pseudopunctipennis* distribuida sobre la región geográfica comprendida entre la porción sur de México, Guatemala y Belice en Centro América, puede ser aclarada, al menos en parte, por las evidencias derivadas del estudio de la estructura genética, las relaciones de parentesco y el flujo de genes entre las distintas poblaciones de mosquitos a nivel microgeográfico, por medio del análisis molecular con marcadores RAPD-PCR.

MATERIALES Y METODOS

a) Area de estudio

El estudio fue delimitado geográficamente a la región comprendida entre el estado de Chiapas en México y la parte norte de América Central en donde se encuentra la denominada "zona sutura" o de convergencia genotípica de *An. pseudopunctipennis*. De acuerdo con Manguin y colaboradores (1995), la zona de encuentro poblacional está localizada sobre la superficie territorial que se extiende a lo largo de la frontera sur de México, la porción central de Guatemala y el extremo occidental de Belice (Figura, 1).

Belice, único país de la región centroamericana sin costa sobre el Océano Pacífico, está bordeado por el mar del Caribe al este y limitado por Guatemala al oeste y México al norte. Entre las características geográficas de su territorio resaltan su planicie costera, la llanura pantanosa y las montañas bajas del sur, localizadas dentro del rango de 0-1160 m de altitud. En este país predomina el clima tropical, muy cálido y húmedo con temporada lluviosa de mayo a febrero. Las poblaciones de *An. pseudopunctipennis* de este país para el análisis genético fueron colectados en las localidades de Central Farm y San Ignacio y conformaron el grupo I Belice (Tabla 1).

Guatemala está situada en la región norte de América Central limitando al norte y oeste con México y al este con Belice, Honduras y el Salvador. Aproximadamente, dos terceras partes de la superficie total de este país corresponden a las zonas montañosas, que en su mayor parte son de origen volcánico. La cordillera de la Sierra Madre se extiende paralelamente a la costa del Pacífico en dirección este-oeste dividiendo a esta nación en dos importantes

regiones de proporciones similares con diferentes climas y variada vegetación típica de montañas y planicies, selvas con alta precipitación pluvial y sitios secos, tierras con ríos, lagos y cascadas, además de una considerable extensión de costa. El clima es tropical, cálido y húmedo en las regiones costeras y de baja altitud con temperaturas $<28.3^{\circ}\text{C}$ y climas más fríos en las zonas altas entre los 900 y 2440 msnm donde la temperatura puede llegar a ser inferior a 20°C . En este país se colectaron mosquitos en las localidades de El Jícaro, Guastatoya, Morazán, Rabinal, Salamá y Usumatlán (Fig. 1) que conformaron el grupo II) Guatemala, (Tabla 1).

El estado de Chiapas se localiza en la parte sur de la República Mexicana. Territorialmente está limitado por los estados de Tabasco, Veracruz y Oaxaca, además de formar parte de la frontera con Guatemala. La geografía de Chiapas esta dividida en 3 regiones principales a lo largo del estado en dirección noroeste-sureste: la costa del Soconusco a lo largo del Océano Pacífico, las cadenas montañas centrales, y las tierras bajas del este. En general, el clima es húmedo y sub-húmedo, aunque existe una notable variedad de condiciones de temperatura y precipitación pluvial de acuerdo con la altitud. Las localidades situadas en las tierras bajas tienen climas cálidos y en los lugares situados en altitudes cercanas a los 1000 m predominan los climas templados, mientras que la zona montañosa presenta condiciones frías y húmedas con abundantes lluvias en verano. Tres grupos poblacionales de *An. pseudopunctipennis* fueron representativos de este estado de la República Mexicana: III) Chiapas Sur, compuesto por mosquitos colectados en las localidades de Cosalapa, Tapachula y Unión Roja; IV) Chiapas Selva, con mosquitos colectados en la localidad Adolfo López Mateos; y V) Chiapas Norte, con muestras de Palenque y Toniná (Tabla 1).

b) Muestreo de Anopheles pseudopunctipennis silvestres

Durante las temporadas secas de los años 1997 y 1998 (diciembre-abril), se llevaron a cabo las actividades de colecta de *An. pseudopunctipennis* silvestres, tanto de estados inmaduros como de adultos. Las localidades visitadas fueron 14: Central Farm y San Ignacio en Belice; El Jícaro, Guastatoya, Morazán, Rabinal, Salamá y Usumatlán en Guatemala; Cosalapa, Tapachula, Unión Roja, A. López Mateos, Palenque y Toniná en el estado de Chiapas, México (Figura 2). Además se incluyó un grupo de mosquitos de la colonia establecida en el insectario del CIP/INSP (Villarreal *et al.*, 1998). La colonia fue iniciada con larvas y pupas colectadas en la porción montañosa del sur de Chiapas, bajo condiciones controladas de temperatura, humedad relativa y fotoperiodo, logrando su éxito reproducción mediante la inducción de cópula con estímulo luminoso.

En cada una de las localidades, se realizaron inspecciones y pesquisas larvarias en criaderos aledaños, utilizando caladores metálicos de borde plano con capacidad de 750 ml y goteros de plástico (Danis-Lozano *et al.*, 1997). Todas las larvas de IV estadio y las pupas fueron depositadas dentro de un termo para ser transportadas al laboratorio. Posteriormente, se concentraron en recipientes de plástico transparente, herméticos y de forma cilíndrica (cámaras de emergencia), en donde fueron alimentadas con comida comprimida para ratones (Lab Diet the Richmond Standard®, MPI Nutrition Internacional, St. Louis, MO), previamente molida hasta polvo fino, y mantenidas a temperatura ambiente, 29°C durante el día y 24°C durante la noche, de 1-3 días hasta la emergencia de los adultos. Las colectas nocturnas de mosquitos se realizaron en horario de 18:00-24:00 h, debido a que en este periodo el comportamiento de búsqueda de hospederos y la actividad de alimentación de los mosquitos ocurren con mayor intensidad (Casas *et al.*, 1994). Los adultos se colectaron mediante las técnicas convencionales de captura sobre cebo humano (intra y/o peridomiciliar) y sobre cebo animal (trampa Magoon y/o

corral) con ayuda de aspiradores manuales y lámparas de mano (WHO, 1975; Service, 1976). Los mosquitos capturados se colocaron en viales de polipropileno y fueron transportados dentro de un termo con nitrógeno líquido hasta el Centro de Investigación de Paludismo en la ciudad de Tapachula, Chiapas. Previamente a las pruebas moleculares, todos los ejemplares se identificaron taxonómicamente con ayuda de un microscopio estereoscópico, siguiendo las claves ilustradas para las hembras de anofelinos de México y Centro América (Wilkerson *et al.*, 1993b). Los *An. pseudopunctipennis* fueron seleccionados y almacenados en condiciones de ultrarefrigeración a -70°C hasta el momento de la extracción del DNA en el laboratorio, para evitar la degradación enzimática del material genético.

c) Aislamiento del DNA genómico de los mosquitos de campo

Los mosquitos fueron procesados de manera individual según el método descrito por Coen y colaboradores (1982) con las modificaciones convenientes para la extracción del material genómico en artrópodos (Black y Munstermann, 1996). Inicialmente, los especímenes se colocaron dentro de tubos de polipropileno de forma cónica, fondo redondo y capacidad de 1.5 ml, adicionados previamente con 25 μl de solución amortiguadora de molido (NaCl 0.1 M, Sacarosa 0.2 M, Tris-HCl 0.1 M pH 9.1, EDTA 0.05 M, SDS 0.05%). Los mosquitos fueron triturados con maceradores de vidrio con punta esmerilada. Los maceradores se enjuagaron con 25 μl de la misma solución amortiguadora para recuperar el material adherido a la punta. A continuación, los tubos fueron centrifugados a 14,000 rpm por 30 seg para obtener un homogenado en el fondo de cada uno. El sobrenadante se incubó a 65°C por 30 min para desnaturalizar las proteínas. Se adicionaron 7 μl de acetato de potasio 8 M y se mezclaron con movimientos ligeros. Los tubos se colocaron en hielo durante un mínimo de 30 min para precipitar el SDS. Al término de este

tiempo, los tubos fueron centrifugados a 14,000 rpm durante 15 min y los sobrenadantes se transfirieron a tubos de polipropileno nuevos de 0.5 ml, cuidando de no llevar precipitados de SDS. Inmediatamente después, los sobrenadantes fueron adicionados con 100 µl de etanol al 100% antes de la siguiente incubación en hielo durante 5 min, con la finalidad de que los ácidos nucleicos se precipitaran. A continuación, los tubos se centrifugaron a 14,000 rpm por 15 min. La extracción del etanol fue realizada cuidadosamente evitando sustraer residuos del fondo del tubo. Además, se adicionaron 100 µl de etanol al 70% antes de dar paso a la siguiente centrifugación a 14,000 rpm durante 5 min. Nuevamente, sólo se retiró el etanol de los tubos (en algunas ocasiones la pastilla de DNA apareció como una mancha sobre la pared del tubo y otras veces fue imposible distinguirla) para adicionarlos con 100 µl de etanol al 100% y centrifugarlos a 14,000 rpm por 5 min. Se eliminó el etanol y los tubos fueron colocados en un termoblock a 40°C para secar las pastillas de material genético. Finalmente, se adicionaron 200 µl de solución amortiguadora TE (Tris-HCl 0.05 M, EDTA 0.05 M pH 8.0) a cada tubo para resuspender el DNA obtenido. Las muestras de fueron almacenadas a 4°C (Crampton *et al.*, 1997).

d) Tamizaje de las secuencias arbitrarias para el análisis genético

Inicialmente, se realizaron pruebas de amplificación por PCR del DNA de 29 mosquitos procedentes de los distintos sitios de colecta (Tabla 1) con los 20 iniciadores contenidos en cada uno de los 3 kits comerciales probados (A, B y C de Operon Technologies, Inc. Alameda, CA). Todos los iniciadores presentaron secuencias de 10 bases de longitud en sentido 5'-3' constituidas por 60% de G-C. Las muestras individuales de material genómico fueron aisladas de los mosquitos colectados en campo. Los patrones individuales de bandas resultantes con cada

uno de los iniciadores probados, fueron comparados entre los mosquitos analizados, de acuerdo con la reproducibilidad y consistencia del número, peso molecular y definición de los marcadores RAPD-PCR (Black, 1993). Una vez definidos los perfiles polimórficos producidos por las amplificaciones aleatorias de DNA, se procedió a la selección de los iniciadores que integraron la serie para el diagnóstico.

e) Mezcla de reacciones y condiciones de amplificación por PCR

La mezcla para cada reacción estuvo compuesta por 37.3 μl de H_2O tridestilada estéril, 5.0 μl de solución amortiguadora de reacción 10 X (KCl 0.5 M, Tris-HCl 0.1 M, gelatina 1 mg/ml) sugerida por Innis *et al.* (1990) 5.0 μl de MgCl_2 100 mM, 0.5 μl de la mezcla de desoxinucleótidos trifosfatos (dATP+dCTP+dGTP+dTTP) 20 mM, 1 μl de oligonucleótido (iniciador aleatorio de 10 bases de longitud) en concentración de 50 pmol/ μl , 0.2 μl de enzima AmpliTaq DNA polimerasa 1U (Perkin Elmer™, Branchburg, NJ) y 1 μl de DNA genómico 40-50 ng/ μl , acumulando un volumen final de 50 μl por tubo de prueba. Se utilizó un termociclador (Perkin Elmer™, modelo GeneAmp PCR System 9600) programado con las siguientes condiciones de amplificación (temperaturas y tiempos) para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR): 1) incubación pre-PCR a 95°C por 1 min; 2) desnaturalización a 92°C por 1 min; 3) hibridación a 35°C por 1 min; 4) extensión gradual con rampa de temperatura que consistió en el incremento de 5°C cada 40 seg a partir de los 35°C hasta los 72°C; 5) extensión completa a 72°C por 2 min; 6) extensión final de 72°C por 7 min y; 7) último paso en donde la temperatura descendió a 4°C y se mantuvo hasta el momento de correr los productos en geles de agarosa (Black y Munstermann, 1996). Los pasos del 2-4

constituyeron un ciclo de reacción y fueron repetidos 45 veces en cada programa de rutina (Figura 3).

f) Electroforesis de los productos de PCR

Los productos de la amplificación se resolvieron por medio de la electroforesis en geles de agarosa al 1.5%, a los cuales se les aplicó una corriente de 40 V durante 8 h, de esta manera, los fragmentos polimórficos de DNA fueron visualizados por tinción con bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) sobre un transiluminador de luz ultravioleta (UV).

Para la preparación de un gel de 9 x 11 cm fue necesario pesar 1.275 g de agarosa en una balanza analítica (Sartorius™, modelo Basic), así como la medición de 85.0 ml de solución amortiguadora TBE 1 X (Trisma-base 1 M, ácido bórico 1 M y EDTA 0.5 M pH 8.0). La agarosa y la solución amortiguadora fueron depositadas en un matraz para llevar a cabo la fusión por calentamiento durante 3.5 min en el horno de microondas y obtener una solución homogénea, enseguida se adicionaron 4.0 μl de bromuro de etidio 10.0 mg/ml. Posteriormente, se dejó enfriar la solución de agarosa (60°C) antes de proceder a formar el gel. Durante este tiempo de espera el molde de la cámara de electroforesis horizontal (Easy-Cast™, modelo B1) fue nivelado, a continuación, se procedió con el vaciado de la agarosa fundida en el molde y la colocación del peine de acrílico en uno de los extremos para formar los pozos, esperando el tiempo necesario hasta que la agarosa gelificó (\pm 40 min) antes de retirar el peine definitivamente. El gel fue orientado hacía el polo positivo (ánodo), debido a la naturaleza electronegativa de las moléculas de DNA, y colocado en el fondo del tanque de la cámara para efectuar la electromigración de las muestras de material genético amplificado. El

depósito de la cámara de electroforesis se llenó con 615.0 ml de la misma solución amortiguadora de electrodo TBE 1X utilizada anteriormente, procurando cubrir el gel en su totalidad y sumergirlo a 0.5 cm.

El paso final consistió en la carga de los productos de PCR en el gel de agarosa. Cada muestra de DNA amplificado, en cantidades de 23 μ l, fue combinada con 3 μ l de la solución amortiguadora de carga tipo III 6 X (azul de bromofenol 0.25%, xileno cianol FF 0.25% y glicerol en agua 30%). Las mezclas formadas individualmente fueron depositadas lentamente en cada uno de los pozos con ayuda de una pipeta automática de volumen variable. De la misma manera, se mezclaron 1 μ l de marcador molecular de 1 Kb DNA ladder y 3 μ l de la solución amortiguadora de carga, los cuales fueron depositados en los pozos laterales del gel con el objeto de determinar el peso molecular de los segmentos amplificados. Listo el dispositivo, se aplicó una corriente eléctrica constante de 40 V generada por una fuente de poder (ECTM, modelo 105) durante 7-8 h, después de este tiempo se observó la separación electroforética de los fragmentos de DNA a través de un transiluminador de luz UV con longitud de onda de 312 nm (HoeferTM, modelo Mighty Bright), para obtener una exposición del gel en película blanco y negro la cual fue tomada con un equipo para fotografía instantánea (PolaroidTM, modelo DS-34) con la finalidad de facilitar la medición de las distancias de migración de cada uno de los segmentos amplificados.

Todas las soluciones estándares utilizadas para la separación e identificación de los fragmentos de DNA por medio de electroforesis en gel de agarosa se prepararon de acuerdo a las formulaciones estandarizadas por Sambrook *et al.* (1989a; 1989b).

g) *Análisis de datos*

El primer análisis consistió en la inspección visual de la movilidad de las bandas de los productos de PCR, considerando la distancia de desplazamiento de las bandas, mediante el empleo de una regla para la medición directa sobre el gel. Posteriormente, se realizó la conversión de la distancia de migración de los fragmentos amplificados a pares de bases con respecto al patrón de peso molecular de 1 Kb (Schaeffer y Sederoff, 1981). Los fragmentos que presentaron polimorfismo, consistencia y reproducibilidad para cada iniciador en particular fueron identificados y seleccionados para describir los perfiles de diagnóstico, definidos por las bandas únicas y conservadas entre todos los individuos de un grupo poblacional determinado, con la analogía a los datos de una clave taxonómica morfológica o bioquímica (Khambhampati *et al.*, 1992; Wilkerson *et al.*, 1993a). La codificación de los datos moleculares consistió en la asignación de los números 0 ó 1 que determinaron la ausencia/presencia de las bandas correspondientes a los segmentos polimórficos. El análisis estadístico de los datos derivados de las pruebas moleculares se realizó mediante la aplicación de los siguientes programas computacionales en lenguaje Fortran, proporcionados por W. C. Black IV (1997): RAPDPLOT escrito por J. Felsenstein (1995) para calcular los índices de similitudes entre los individuos de los grupos poblacionales de *An. pseudopunctipennis*; RAPDDIST para calcular las distancias genéticas (D) entre las diferentes poblaciones basándose en el modelo propuesto por Nei (1972). Posteriormente, los valores presentados en la matriz de similitud fueron usados en el programa NEIGHBOR escrito por Saitou y Jin, (1987), con el cual se construyeron los dendrogramas que agruparon a los individuos de los diferentes sitios de muestreo, de acuerdo con el procedimiento de análisis discriminante del vecino más cercano. Después, se llevó a cabo el análisis de agrupación ("cluster") con el método de grupos pares no ponderado (UPGMA), para lo cual se requirió

de una matriz de distancias genéticas pareadas, para construir los dendrogramas y establecer las separaciones entre los grupos poblacionales. Para validar la consistencia de los agrupamientos y relaciones de parentesco entre las poblacionales de mosquitos descritas por el dendrograma se ejecutó la opción “bootstrapping” del programa RAPDDIST, que consistió en el remuestreo aleatorio y automático de la base de datos para generar 100 series de datos o pseudo-réplicas. Como resultado se obtuvo el mismo número de matrices como series analizadas. Simultáneamente, cada una de las matrices derivadas del análisis bootstrap fue colapsada y presentada en su correspondiente dendrograma, una vez seleccionada la opción para el procesamiento de múltiples series de datos (100) del programa NEIGHBOR. Al final, se llevó a cabo un consenso con todos los dendrogramas construidos anteriormente con el programa CONSENSE, lo que permitió encontrar el nivel de soporte que confieren los datos moleculares a la relación estimada entre las poblaciones representado en un dendrograma final de aprobación. Las consistencias marcadas con valores <90% sugieren fuerte soporte para un agrupamiento determinado, mientras que las marcadas con valores más bajos sugieren la necesidad de adicionar más datos a la base para apoyar una asociación particular.

Por último, con el programa RAPDFST se realizaron los cálculos correspondientes para determinar el grado de variabilidad expresado con los valores de F_{ST} obtenidos por medio del método descrito por Lynch y Milligan (1994) y la tasa de migración efectiva entre las poblaciones, conocida como N_m , estimada a partir de los resultados de F_{ST} que supone un sistema aislado de migración entre las poblaciones incluidas en el estudio (Apostol *et al.*, 1996; Tabachnick y Black, 1996) a nivel micro y macrogeográfico (Kamau *et al.*, 1998), es decir, por localidades, por estados y por países.

RESULTADOS

Anopheles pseudopunctipennis de poblaciones naturales

El total, se obtuvieron 776 mosquitos a partir de las colectas de estados inmaduros (larvas y pupas mantenidos hasta la emergencia como adultos) y las capturas de hembras sobre cebo humano y con la trampa Magoon, los cuales representaron a 15 sitios geográficos ubicados dentro del rango altitudinal de 10 a 1043 m (Figura 1). Los 33 mosquitos procedentes de Belice representaron a las poblaciones naturales de Central Farm y San Ignacio. Por otra parte, 334 mosquitos silvestres fueron colectados en las localidades de El Jícaro, Guastatoya, Morazán, Rabinal, Salamá y Usumatlán en Guatemala. Finalmente, 409 mosquitos se colectaron en el sur de México, de los cuales 384 pertenecieron a las poblaciones geográficas de Cosalapa, Tapachula, Unión Roja, A. López Mateos, Palenque, Toniná y 25 mosquitos fueron obtenidos del insectario del CIP/INSP (Tabla 1).

Marcadores RAPD-PCR de diagnóstico

Se aislaron 150 muestras individuales de material genético de los *An. pseudopunctipennis* colectados en campo. Simultáneamente, se realizó el tamizaje de 60 iniciadores comerciales (20 del kit A, 20 del kit B y 20 del kit C de la marca Operon Technologies, Inc. Alameda, CA) con 29 muestras de DNA genómico de mosquitos silvestres, 4 de Belice, 12 de Guatemala y 13 de México (Tabla 1). Al final, fueron seleccionados 5 decanucleótidos con secuencias arbitrarias (5'-3'), CAATCGCCGT (primer OPA-11), CAGCACCCAC (primer OPA-13), GAACGGACTC (primer OPC-06), TGCGTGCTTG (primer OPC-14) y CCACTCCAG (primer OPC-16), que proporcionaron 13, 14, 15, 11 y 11

fragmentos polimórficos de diagnóstico, respectivamente (Tabla 2 y Figura 4), con los cuales se llevó a cabo la caracterización genética de los mosquitos silvestres de las distintas poblaciones geográficas con enfoque regional.

Análisis de múltiples locus con marcadores moleculares

El análisis molecular definitivo incluyó 139 muestras de mosquitos adultos organizados en 5 grupos poblacionales (Tabla 1), determinados por la distribución geográfica y el distanciamiento territorial de los sitios de muestreo dentro de la zona de estudio (Figura 2): I) Belice con 27 mosquitos (14 de Central Farm y 13 de San Ignacio); II) Guatemala con 68 mosquitos (10 de El Júcaro, 10 de Guastatoya, 10 de Morazán, 12 de Rabinal, 15 de Salamá y 11 de Usumatlán), III) Chiapas Sur con 31 mosquitos (2 de Cosalapa, 11 del Insectario del CIP, 10 de Tapachula y 8 de Unión Roja), IV) Chiapas Selva con 2 mosquitos (de A. López Mateos) y; V) Chiapas Norte con 11 mosquitos (10 de Palenque y 1 de Toniná). Como resultado de las pruebas de electroforesis con los fragmentos amplificados por PCR fue posible la identificación de 64 marcadores genéticos (loci), a partir de los cuales se integró la base de datos moleculares, que sirvió para la comparación de los genotipos entre los individuos y los grupos poblacionales a través de los análisis estadísticos correspondientes.

Estructura geográfica y flujo de genes

Desde el punto de vista macrogeográfico, las distancias genéticas estuvieron dentro del intervalo de 0.0161-0.2221 entre las distintas poblaciones de *An. pseudopunctipennis* analizadas con los marcadores RAP-PCR (Tabla 3). Cuando se

colapsaron estos valores, el resultado fue la representación gráfica de las relaciones de parentesco entre los grupos poblacionales de mosquitos de los diferentes sitios de muestreo a través del dendrograma en donde se demostró que 2 poblaciones del estado de Chiapas (Sur y Selva) junto con la de Guatemala conformaron el principal agrupamiento de mosquitos dentro de la denominada zona de sutura, mientras que las poblaciones de Chiapas Norte y Belice fueron representadas como grupos secundarios e independientes, aparentemente segregadas del primer grupo de mosquitos (Figura 5). La variabilidad genotípica se manifestó en 16 de los 64 loci con valores significativos ($P < 0.01$) de F_{ST} (0.069-0.703) y N_m (0.1-3.4), por otra parte, los indicadores numéricos del flujo genético entre los 5 grupos poblacionales, resultaron con valores promedio de $F_{ST} = 0.059$ y $N_m = 4.0$, respectivamente (Tabla 3). De acuerdo con la representación esquemática de las relaciones genéticas entre las poblaciones geográficas incluidas en el estudio, se describió la estructura de la metapoblación de *An. pseudopunctipennis* conformada por un conglomerado poblacional principal integrado por los grupos de Chiapas Sur, Guatemala y Chiapas Norte, además de 2 conglomerados secundarios independientes que correspondieron a las poblaciones de Belice y Chiapas Selva. Finalmente, se confirmó la consistencia de las líneas de relación genética entre las poblaciones de Chiapas Sur, Selva y Guatemala a través del análisis múltiple de series de datos (bootstrapping), el cual fue integrado por 100 series de datos, construidas aleatoriamente con pseudo-réplicas, a partir de la base de datos moleculares original. Los valores registrados para cada una de las ramas representadas en el diagrama de árbol fueron de 99% entre la población de Chiapas Sur contra Guatemala, 94% entre el grupo anterior contra la población de Chiapas Norte, y por último, 100% entre el grupo integrado por las 3 poblaciones mencionadas y la de Belice contra la población de Chiapas Selva, como resultado del análisis de consenso (Figura 6).

DISCUSION

La identificación de los elementos constituyentes de un complejo de especies crípticas de mosquitos, así como la relación genética entre las poblaciones geográficas han permitido identificar con mayor precisión a los grupos taxonómicos responsables de la transmisión de los agentes etiológicos de varias enfermedades tropicales importantes, como el paludismo. Este estudio fue conducido para investigar la divergencia genética entre los grupos poblacionales de *An. pseudopunctipennis* distribuidos dentro del área geográfica denominada por Manguin *et al.* (1995) como la "zona de sutura", por medio de marcadores RAPD-PCR, técnica molecular que se encuentra clasificada dentro de la categoría de técnicas de múltiples perfiles arbitrarios de amplificación (MPAA).

Desde el punto de vista metodológico, los 5 oligonucleótidos comerciales seleccionados para las pruebas moleculares de PCR, proporcionaron suficientes fragmentos de DNA (64) que cumplieron con las características recomendadas por Black IV (1993) y Weising y colaboradores (1995) para la determinación de marcadores RAPD-PCR: ser polimórficos (ausencia/presencia), consistentes y reproducibles. Durante la etapa inicial, fue necesario hacer ajustes a los procedimientos de laboratorio, a pesar de que las técnicas para la extracción de material genómico, de amplificación *in vitro* del DNA y la electroforesis de los productos de PCR ya se habían implementado con anterioridad para algunas especies crípticas del género *Anopheles* de África y sur de América (Gale y Crampton, 1987; Panyim *et al.*, 1988; Wilkerson *et al.* 1995; Mustermann, 1995). En general, los resultados obtenidos en estos estudios con especies de vectores de paludismo confirmaron nuevamente la utilidad y aplicación de los marcadores RAPD-PCR, así como la alta confiabilidad en el uso de iniciadores con secuencias arbitrarias

para estudios genéticos con distintos grupos taxonómicos de insectos (Haymer, 1994).

En el contexto regional, las poblaciones de mosquitos estrechamente emparentadas fueron las de Guatemala y Chiapas Sur, mientras que las poblaciones con mayor divergencia genética correspondieron a los grupos de Belice y Chiapas Selva, de acuerdo con el distanciamiento genético entre las 5 conjuntos poblacionales y la alta consistencia entre los agrupamientos resultante del análisis de pseudo-réplicas (bootstrapping) y el dendrograma de consenso estricto (Felsenstein, 1995).

Para definir la divergencia genética entre los grupos poblacionales estudiados se consideró la comparación realizada por Manguin y colaboradores (1995) entre dos especies íntimamente relacionadas, *An. pseudopunctipennis* y *An. franciscanus*, donde la distancia genética fue de 0.335, mientras que los valores para las poblaciones de *An. pseudopunctipennis* distribuidas continentalmente fueron >0.08 . De acuerdo con este antecedente, los valores de distancias genéticas reportados en esta ocasión fueron considerados como intermedios. Por lo anterior, fue posible considerar que la metapoblación de *An. pseudopunctipennis* estudiada pertenece a una sola especie, por presentar poca variabilidad interpoblacional, sin embargo, es posible que en el grupo de mosquitos de Belice se esté iniciando un proceso de diferenciación genética. Asimismo, se determinó que el grado de variación encontrada entre los grupos poblacionales comparados puede deberse a barreras geográficas o ecológicas que afectan el encuentro de algunas poblaciones dentro del área de estudio.

La variabilidad genética (diversidad) se puede definir como “la habilidad genética de variar”, y por ende, la capacidad de responder tanto a cambios de

índole ambiental como a cambios en términos de selección (Aranguren-Méndez y Jordana, 2001). Entre los individuos la variabilidad puede deberse a cambios fisiológicos durante la ontogenia hasta la madurez sexual, entre las clases de edades o sexos e inclusive como respuesta a cambios durante distintas estaciones del año (Mayr, 1969; Smith, 1990). Al respecto, se puede argumentar que el encuentro de las poblaciones silvestres de *An. pseudopunctipennis*, dentro de la extensión territorial comprendida por la "zona de sutura", está limitada en la porción norte a causa de la topografía accidentada predominante en Chiapas y Guatemala hacia donde se encuentran las cordilleras más importantes del sur de México como son la Sierra Madre de Chiapas, las Montañas del Norte (poniente-oriente) y las Montañas del Oriente (noroeste-sureste), razón por la cual la dispersión de los genotipos presenta patrones de subpoblaciones aisladas con los mosquitos de Chiapas Norte y Belice, en donde la parte norte de este país se compone de tierras bajas donde predomina el clima subtropical, con grandes zonas pantanosas, mientras que la porción sur está dominada por las montañas Mayas (Figura 1). Ante estas diferencias ecogeográficas que directamente influyen sobre la biodiversidad y la dinámica poblacional de las distintas especies de mosquitos *Anopheles*, el éxito del intercambio genético entre las poblaciones más emparentadas dentro de la región muestreada, podría deberse a la capacidad de dispersión de las hembras para colonizar los criaderos temporales disponibles a lo largo de los ríos y arroyos localizados sobre diferentes altitudes en el rango biogeográfico de distribución vertical de esta especie, para garantizar el desarrollo de la progenie y el flujo de genes.

Dado que la variación al nivel de poblaciones se debe a diferencias en los hábitats, a transformaciones climáticas temporales, así como a las respuestas en los cambios de la densidad y estructura demográfica (Mayr, 1969; Wright, 1978), no se puede aceptar terminantemente la idea de considerar como grupo taxonómico

diferente a los mosquitos de Belice por encontrarse en el límite inferior del intervalo de distancia genética de Nei (0.2-0.3), según el criterio de Service (1988), para separar los componentes de un complejo de especies crípticas en los insectos hematófagos, al interpretar el significado biológico de los resultados derivados del análisis múltiple de locus, hasta comprobar contundentemente el aislamiento reproductivo entre las subpoblaciones.

En conclusión, los grupos poblacionales de *An. pseudopunctipennis* presentaron genotipos homogéneos indicando que la intensidad del flujo de genes es moderada entre los mosquitos de Guatemala, Chiapas Sur y Selva, a diferencia de las poblaciones geográficas de la parte norte de Chiapas y Belice que presentaron mayor diferenciación genética, significativa solo en algunos loci, al grado de conformar grupos segregados aparentemente. La comparación genética entre los grupos de Belice y Chiapas Selva se destacó por presentar el más alto valor de distancia genética, encontrándose dentro del rango crítico para la separación de especies, por lo tanto, es posible la existencia de un insipiente complejo de especies morfológicamente indistinguibles integrado al menos por 2 componentes dentro del área de estudio. La confirmación estadística de la afinidad demostrada por el agrupamiento genotípico y la relación genética cercana entre las poblaciones de Guatemala y del sur de México, así como la divergencia y separación con el grupo de Belice, podrían ser consideradas como punto de partida para proponer estudios sobre la asociación de los perfiles moleculares y la eficiencia biológica de los mosquitos a la infección e inoculación de plasmodios, debido a que esta especie de montaña está incriminada entomológicamente como vector primario de paludismo en Guatemala y México y como vector secundarios en Belice (Fleming, 1986). De esta manera, se podría determinar la existen de diferencias en cuanto a la competencia y capacidad vectorial de las poblaciones

geográficas de *An. pseudopunctipennis* con sus correspondientes perfiles de diagnóstico molecular.

Por último, los resultados del presenta estudio indican nuevas líneas y perspectivas de investigación. Al respecto, se sugiere validar el concepto biológico de especie con *An. pseudopunctipennis* por medio de entrecruzamientos experimentales empleando la técnica de cópula inducida con luz (Villarreal *et al.*, 1998) entre mosquitos silvestres de las diferentes poblaciones distribuidas en la zona de convergencia genotípica. Así como estudios sobre la susceptibilidad diferencial de las poblaciones naturales de *An. pseudopunctipennis* a las variantes antigénicas de *P. vivax* VK210 y VK247 (González-Cerón *et al.*, 1999) en relación con la distribución temporal y espacial de los perfiles genéticos. Estos estudios permitirían identificar y delimitar la extensión territorial de las subpoblaciones de mosquitos para redirigir las medidas de control antivectorial (Cornel *et al.*, 1996), particularmente en las áreas de mayor riesgo entomológico dentro de la región norte de América Central y el sur de México.

CONCLUSIONES

- Los mosquitos colectados en Chiapas (Sur y Selva) y Guatemala constituyeron el principal agrupamiento poblacional de *An. pseudopunctipennis* dentro de la denominada zona de sutura, mientras que los ejemplares procedentes de los sitios de muestreo de Chiapas Norte y Belice representaron a dos poblaciones secundarias e independientes, aparentemente segregadas del primer grupo de mosquitos.
- Debido a que los grupos poblacionales de *An. pseudopunctipennis* representativos de Chiapas Selva y Belice presentaron diferencias con respecto a los indicadores de divergencia genética y flujo de genes. No obstante, la metapoblación de *An. pseudopunctipennis* estudiada pertenece a la misma especie, de acuerdo con su variabilidad interpoblacional, sin embargo, es posible que se esté iniciando un proceso de diferenciación genética en el grupo de mosquitos de Belice.
- Se debe continuar con estudios complementarios para validar el concepto de especie biológica con *An. pseudopunctipennis* involucrando a los supuestos componentes del complejo con base a las relaciones genéticas derivadas de este trabajo.

LITERATURA CITADA

- Apostol, B. L., W. C. Black IV, P. Reiter and B. R. Miller. 1996. Populations genetics with RAPD-PCR markers: the breeding structure of *Aedes aegypti* in Puerto Rico. *Heredity* 76:325-334.
- Aranguren-Méndez, J. A. y J. Jordana. 2001. Utilización de marcadores de ADN (microsatélites) en poblaciones de animales domésticos en peligro de extinción.
http://www.cecalc.ula.ve/AVPA/articulos_libres/AVPAconservacion.pdf
(fecha de consulta 15/12/2003).
- Audesirk, G. and T. Audesirk. 1993. Principles of evolution. *In* *Biology: life on earth*, pp 332-356. Third edition. Macmillan Publishing Company.
- Barr, A. R. 1988. The *Anopheles maculipennis* complex (Diptera:Culicidae) in western North America. *In* *Biosystematic of haematophagous insects*. M. W. Service (Ed.). Systematics Association Special Volume No. 37. Clarendon Press, New York, U. S. A.
- Black IV, W. C. 1993. PCR with arbitrary primers: approach with care. *Insect Molec. Biol.* 2(1):1-6.
- Black IV, W. C. and N. M. Du Teau 1997. RAPD-PCR and SSCP analysis for insect population genetics studies. *In* *The molecular biology of insect disease vectors, a methods manual*. First edition. J. M. Crampton, C. B. Beard, and C. Louis (Eds.) Chapman & Hall, London, U. K.

- Black IV, W. C. and Munstermann, L. E. 1996. Molecular taxonomy and systematics of arthropod vectors. *In* The biology of disease vectors. B. Beaty and W. Marquardt (Eds.). University Press of Colorado, USA.
- Bruce-Chwatt, L. J. 1985. Essential malariology. Second edition. John Wiley and Sons. New York, USA.
- Casas, M., M. H. Rodríguez and D. N. Bown. 1994. Peri-/intradomicillary behavior in relation to host-seeking of *Anopheles pseudopunctipennis* in the southern México. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 10 (3):355-362.
- Coen, E. S., T. Strachan and G. Dover. 1982. Dynamics of concerted evolution of ribosomal DNA and histone gene families in the *melanogaster* species subgroup of *Drosophila*. *J. Mol. Biol.* 158:17-35.
- Cornel, A. J., C. H. Porter and F. H. Collins. 1996. Polymerase chain reaction species diagnostic assay for *Anopheles quadrimaculatus* cryptic species (Diptera:Culicidae) based on ribosomal DNA ITS2 sequences. *J. Med. Entomol.* 33(1):109-116.
- Crampton, J. M., C. B. Beard, and C. Louis. 1997. The molecular biology of insect disease vectors: a methods manual. First edition. Chapman & Hall, London, U. K.
- Crosskey, R. W. 1988. Old tools and new taxonomic problems in bloodsucking insects. *In* Biosystematic of haematophagous insects. M. W. Service (Ed.). Systematics Association Special Volume No. 37. Clarendon Press, New York, USA.

- Danis-Lozano, R., M. H. Rodríguez, J. I. Arredondo-Jimenez, M. Hernandez-Avila, and C. Mallorca. 1997. Aquatic insects associated with *Anopheles albimanus* (Diptera:Culicidae) breeding sites in southern Mexico. *Environ. Entomol.* 26:828-838.
- Dowling, T. E., C. Moritz, D. Plamer and L. H. Rieseberg. 1996. Nucleic acids III: Analysis of fragments and restriction sites. *In* Hillis, D. M., C. Moritz and B. K. Mable (eds.), *Molecular Systematics*. Sinauer, Sunderland, pp. 249-320.
- Estrada-Franco, J. G., G. C. Lanzaro, M. C. Ma, A. Walker-Abbey, P. Romans, C. Galvan-Sanchez, J. L. Cespedes, R. Vargas-Sagarnaga, A. Laughinghouse, I. Columbus and R. W. Gwadz. 1993a. Characterization of *Anopheles pseudopunctipennis* sensu lato from three countries of neotropical America from variation in allozymes and ribosomal DNA. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 49(6):735-745.
- Estrada-Franco, J. G., M. C. Ma, R. W. Gwadz, R. Sakai, G. C. Lanzaro, A. Laughinghouse, C. Galvan-Sanchez, J. L. Cespedes and R. Vargas-Sagarnaga. 1993b. Evidence through crossmating experiments of a species complex in *Anopheles pseudopunctipennis* sensu lato: a primary malaria vector of the American continent. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 49(6):746-755.
- Fernández-Salas, I., M. H. Rodríguez, D. R. Roberts, M. C. Rodríguez and R. A. Wirtz. 1994. Bionomics of adult *Anopheles pseudopunctipennis* (Diptera:Culicidae) in the Tapachula foothills area of southern Mexico. *J. Med. Entomol.* 31(5):663-670.

- Felsenstein, J. 1995. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Version 3.57c. Department of Genetics, University of Washington. Seattle, WA, USA.
- Fleming, G. 1986. Biology and ecology of malaria vectors in the Americas. Pan American Health Organization. Ref. PNSP/86-72.
- Gale, K. R. and J. M. Crampton. 1987. DNA probes for species identification of mosquitoes in the *Anopheles gambiae* complex. Med. Vet. Entomol. 1:127-136.
- González-Cerón, L., M. H. Rodríguez, J. A. Nettel, C. Villarreal, C. C. Kain and J. E. Hernández. 1999. Differential susceptibilities of *Anopheles alimanus* and *Anopheles pseudopunctipennis* to infections with coindigenous *Plasmodium vivax* variants VK210 and VK247 in southern Mexico. Infect. and Immun. 67:410-412.
- González, D. 1998. Marcadores moleculares para los estudios comparativos de la variación en ecología y sistemática. Revista Mexicana de Micología 14:1-21.
- Harwood, R. F. y M. T. James. 1993. Entomología médica y veterinaria. Noriega Editores, México, D. F.
- Haymer, D. S. 1994. Arbitrary (RAPD) primer sequences used in insect studies. Insect. Molec. Biol. 3(3):191-194.
- Ibáñez-Bernal, S. y C. Martínez-Campos. 1994. Clave para la identificación de larvas de mosquitos comunes en las áreas urbanas y suburbanas de la Republica Mexicana (Diptera:Culicidae). Folia Entomol. Mex. 92:43-73.

- Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White. 1990. PCR protocols: a guide to methods and applications. Academy Press, New York, USA.
- Kamau, L., T. Lehmann, W. A. Hawley, A. S. Orago and F. H. Collins. 1998. Microgeographic genetic differentiation of *Anopheles gambiae* mosquitoes from Asembo bay, western Kenya: a comparison with Kilifi in coastal Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58(1):64-69.
- Khambhampati, S., C. William, I. V. Black, S. R. Karamjit. 1992. Random amplified polymorphic DNA of mosquito species and populations (Diptera: Culicidae): techniques, statistical analysis, and applications. *J. Med. Entomol.* 29:939-945.
- Knight, K. L. and A. Stone. 1977. A catalog of the mosquitoes of the world (Diptera:Culicidae). Second edition. Volume 6. M. D. Lanham: Entomol. Soc. Am., The Thomas Say Foundation.
- Lehane, M. J. 1996. Biology of the blood-sucking insects. First edition. Chapman & Hall. London, U. K.
- Levi-Castillo, R. 1944. El complejo "pseudopunctipennis" en el Ecuador (Diptera-Culicidae). Imprenta de la Universidad de Guayaquil, pp 1-7.
- Levi-Castillo, R. 1945. Los anofelinos de la República del Ecuador. Vol. 1, 30-47 pp.,illus.
- Loyola, E. G., M. H. Rodríguez, L. González, J. I. Arredondo, D. N. Bown and M. A. Vaca. 1990. Effect of indoor residual spraying of DDT and bendiocarb

on the feeding patterns of *Anopheles pseudopunctipennis* in México. J. Am. Mosq. Control Assoc. 6:635-640.

Lynch, M. and B. G. Milligan. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. Mol. Ecol. 3:91-99.

Mallet, J. 1995. A species definition for the modern synthesis. Trends Ecol. Evol. 10(7):294-299.

Manguin, S., D. R. Roberts, E. L. Payton, I. Fernandez-Salas, M. Barreto, R. F. Loayza, R. E. Spinola, R. M. Granaou and M. H. Rodriguez. 1995. Biochemical systematics and population genetic structure of *Anopheles pseudopunctipennis*, vector of malaria in Central and South America. Am. J. Trop. Med. Hyg. 53(4):362-377.

Mayr, E. 1942. The systematic categories and the new species concept. In Systematics and the origin of species from the viewpoint of a zoologist. Chapter V, pp.102-122. Harvard University Press, London, England.

Mayr, E. 1969. Principles of systematic zoology. McGraw-Hill, New York, USA.

Mitton, J. 1994. Molecular approaches to population biology. Annu. Rev. Ecol. Syst. 25:45-69.

Munstermann, L. E. 1995. Mosquito systematics: current status, new trends, associated complications. J. Vector Ecol. 20(2):129-138.

- Munstermann, L. E. and Conn, J. E. 1997. Systematics of mosquito disease vectors (Diptera, Culicidae): impact of molecular biology and cladistic analysis. *Annu. Rev. Entomol.* 42:351-369.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *Am. Natur.* 106:283-292.
- Neigel J. E. 1997. A comparison of alternative strategies for estimating gene flow from genetic markers. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 28:105-128.
- Panyim, S. , S. Yasothornsrikul and V. Baimai. 1988. Species-specific DNA sequence from the *Anopheles dirus* complex - a potential for efficient identification of isomorphic species. *In Biosystematics of haematophagous insects*, pp. 193-202. M. W. Service (Ed.). Systematics Association Special Volume No. 37. Clarendon Press, New York, USA.
- Paskewitz, S. M. and F. H. Collins. 1997. PCR amplification of insect ribosomal DNA. *In The biology of disease vectors*. B. Beaty and W. Marquardt (Eds.). UP of Colorado, USA.
- Queller, D. C., J. E. Strassmann and C. R. Hughes. 1993. Microsatellites and kinship. *Trends Ecol. Evol.* 8(8):285-288.
- Rodríguez, M. H. y E. G. Loyola. 1989. Situación epidemiológica actual y perspectivas de la investigación entomológica en México. *Memorias del IV Simposio Nacional de Entomología Médica y Veterinaria*, pp. 15-40. Oaxtepec, Morelos, México. Sociedad Mexicana de Entomología.

- Rodríguez, M. H., F. C. Hernández, L. D. Posan y M. E. Zurita. 1998. Nuevas estrategias para la manipulación genética de vectores de paludismo. *In* A cien años del descubrimiento de Ross; el paludismo en México. J. Kumate y A. Martínez P. (coordinadores). El Colegio Nacional, México.
- Roderick, G. K. 1996. Geographic structure of insect populations: gene flow, phylogeography, and their uses. *Annu. Rev. Entomol.* 41:325-352.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch y T. Maniatis. 1989a. *Molecular cloning, a laboratory manual*. Book 1. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch y T. Maniatis. 1989b. *Molecular cloning, a laboratory manual*. Book 3. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA.
- Schaeffer, H. E., R. R. Sederoff. 1981 Improved estimation of DNA fragment lengths from agarose gels. *Anal. Biochem.* 115:113-122.
- Secretaría de Salud (SSA). 2001. Programa de acción: enfermedades transmitidas por vector. Secretaría de Salud, México, D. F.
- Service, M. W. 1976. *Mosquito ecology, field sampling methods*. Second edition. Applied Science Publishers LTD. London, Great Britain.
- Service, M. W. 1988. *Biosystematic of haematophagous insects*. M. W. Service (Ed.). Systematics Association Special Volume No. 37. Clarendon Press, New York, USA.

Sistema Integrado de Información Taxonómica (SIIT^{mx}) México
<http://siit.conabio.gob.mx/> (fecha de consulta 01/10/01).

Simpson, G. G. 1961. Principles of animal taxonomy. University Press, New York, Columbia, USA.

Smith, T. B. 1990. Patterns of morphological and geographic variation in trophic bill morph of the African finch *Pyrenestes*. Biol. J. Linn. Soc. 41:381-414.

Tabachnick, W. J. and W. C. Black IV. 1996. Population genetics in vector biology. In The biology of disease vectors. B. Beaty and W. Marquardt (Eds.). University Press of Colorado, USA.

Villarreal, C., J. I. Arredondo-Jimenez, A. Ulloa and M. H. Rodriguez. 1998. Colonization of *Anopheles pseudopunctipennis* from Mexico. J. Am. Mosq. Control Assoc. 14:369-373.

Walter Reed Biosystematics Unit (WRBU). 2001 Systematic Catalog of Culicidae. <http://wrbu.si.edu/www/culicidae/anophelinae/catalogMF.html>.
Catalog of *Anopheles*, *Bironella* y *Chagasia*. Draft copy (date 31/01/02).

Weising, K., H. Nybom, K. Wolff and W. Meter. 1995. DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

Wilkerson, R. C., T. J. Parsons, D. G. Albright, T. A. Klein and M. J. Braun. 1993a. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers readily distinguish

cryptic mosquito species (Diptera:Culicidae:*Anopheles*). *Insect Molec. Biol.* 1(4):205-211.

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

Wilkerson, R. C., T. J. Parsons, T. A. Klein, T. V. Gaffigan, E. Berigo and Consolim. 1995. Diagnosis by RAPD-PCR of four cryptic species related to *Anopheles albitarsis* from Paraguay, Argentina and Brazil (Diptera:Culicidae). *J. Med. Entomol.* (Submitted for publication).

World Health Organization (WHO). 1975. Manual on practical entomology in malaria. Part II, methods and techniques. WHO offset publication No. 13. World Health Organization, Geneva.

Wright, S. 1978. Variability within and among natural populations. The University of Chicago Press, Chicago, USA.

Tabla 1. Sitios de colecta y relación de muestras poblacionales de *An. pseudopunctipennis* para los análisis moleculares.

Grupo	Localidad	Georeferenciación			Estado	No. mosquitos		
		Latitud N	Longitud W	Altitud m		Colecta	Tamizaje	Análisis
I) Belice	Central Farm	17° 11' --"	89° 00' --"	90	El Cayo	19	2	14
	San Ignacio	17° 09' 22"	89° 04' 17"	126	El Cayo	14	2	13
II) Guatemala	El Júcaro	15° 01' --"	90° 12' --"	1,024	El Progreso	127	2	10
	Guastatoya	14° 51' 14"	90° 04' 07"	632	El Progreso	14	2	10
	Morazán	15° 55' --"	90° 09' --"	386	El Progreso	81	2	10
	Rabinal	15° 05' --"	90° 27' --"	1,423	Baja Verapaz	84	2	12
	Salamá	15° 05' --"	90° 16' --"	1,157	Baja Verapaz	15	2	15
	Usumatlán	15° 56' --"	89° 46' --"	246	Zacapa	13	2	11
III) Chiapas Sur	Cosalapa	14° 38' 16"	92° 15' 58"	10	Chiapas	2	2	2
	Tapachula	14° 54' 29"	92° 15' 38"	170	Chiapas	61	2	10
	Unión Roja	15° 02' 43'	92° 13' 01"	520	Chiapas	195	2	8
	CIP/INSP*				Chiapas	25	2	11
IV) Chiapas Selva	A. López M.	16° 12' 26"	90° 52' 26"	231	Chiapas	2	1	2
V) Chiapas Norte	Palenque	17° 30' 33'	91° 58' 56"	60	Chiapas	123	2	10
	Toniná	16° 53' 56"	92° 03' 13"	1,000	Chiapas	1	1	1
3 Países	15 Sitios				5 Estados	776	29	139

* *An. pseudopunctipennis* de la colonia establecida en el insectario del Centro de Investigación de Paludismo en Tapachula, Chiapas.

Tabla 2. Iniciadores comerciales seleccionados para la amplificación por PCR de regiones aleatorias del DNA genómico de *An. pseudopunctipennis* silvestres.

Iniciador	Secuencia 5' - 3'	No. segmentos analizados
OPA-11	GTGATCGCAG	13
OPA-13	CAGCACCCAC	14
OPC-06	GAACGGACTC	15
OPC-14	TGCGTGCTTG	11
OPC-16	CACACTCCAG	11
5	Primers	64 bandas

* Operon Technologies, Inc.

Tabla 3. Matriz de distancias genéticas de Nei (1972) entre las poblaciones geográficas de *An. pseudopunctipennis* analizadas con marcadores RAPD-PCR.

Grupo	I	II	III	IV	V
Belice (I)	0.0000				
Guatemala (II)	0.0443	0.0000			
Chiapas Sur (III)	0.0475	0.0161	0.0000		
Chiapas Selva (IV)	0.2221	0.1640	0.1632	0.0000	
Chiapas Norte (V)	0.0629	0.0333	0.0321	0.2112	0.0000

Tabla 4. Variabilidad genética (F_{ST}) y tasa de migración efectiva (N_m) por locus para las poblaciones de *An. pseudopunctipennis* distribuidas en Belice, Guatemala y el sur de México.

LOCUS	F_{ST}	N_m	Prob.	Theta	$N_m(Theta)$	$F_{ST}(Lynch)$	$N_m(Lynch)$
11-01	.020	12.5	.3591	.002	101.8	-.105	-2.6
11-02	.031	7.9	.1450	.020	12.3	-.175	-1.7
11-03	.028	8.7	.1822	.016	15.7	.149	1.4
11-04	.014	17.4	.5348	-.006	-40.2	.113	2.0
11-05	.102	2.2	.0002	.126	1.7	.733	.1
11-06	.703	.1	.0000	.782	.1	.735	.1
11-07	.031	7.9	.1482	.019	12.6	.096	2.4
11-08	.052	4.5	.0203	.053	4.5	.132	1.6
11-09	.021	11.4	.3134	.005	47.6	.205	1.0
11-10	.014	17.9	.5470	-.007	-37.1	-.230	-1.3
11-11	.050	4.7	.0248	.050	4.8	.216	.9
11-12	.122	1.8	.0000	.155	1.4	.723	.1
11-13	.080	2.9	.0014	.094	2.4	.583	.2
13-01	.069	3.4	.0055	.075	3.1	5.565	-.2
13-02	.023	10.6	.2986	.006	39.3	-.269	-1.2
13-03	.024	10.3	.2851	.007	34.2	.207	1.0
13-04	.038	6.3	.0888	.029	8.3	.256	.7
13-05	.034	7.0	.1203	.024	10.3	.034	7.1
13-06	.045	5.3	.0503	.039	6.1	.153	1.4
13-07	.028	8.6	.1988	.014	17.2	.232	.8
13-08	.024	10.0	.2698	.008	29.6	.284	.6
13-09	.047	5.0	.0395	.043	5.5	.512	.2
13-10	.049	4.9	.0345	.045	5.2	.228	.8
13-11	.073	3.2	.0039	.081	2.9	.395	.4
13-12	.054	4.4	.0216	.053	4.4	.473	.3
13-13	.049	4.9	.0347	.045	5.3	.446	.3
13-14	.014	17.4	.5574	-.007	-34.0	-.314	-1.0
06-01	.008	31.4	.8121	-.019	-13.3	-.017	-15.2
06-02	.118	1.9	.0001	.145	1.5	-.001	-234.3
06-03	.033	7.3	.1598	.020	12.4	.117	1.9
06-04	.031	7.8	.1835	.017	14.4	.148	1.4
06-05	.110	2.0	.0002	.133	1.6	.291	.6
06-06	.133	1.6	.0000	.166	1.3	.341	.5
06-07	.092	2.5	.0010	.109	2.1	.330	.5
06-08	.055	4.3	.0257	.054	4.4	.251	.7
06-09	.052	4.6	.0354	.048	4.9	.214	.9
06-10	.038	6.2	.1034	.028	8.6	-.132	-2.1
06-11	.058	4.0	.0203	.058	4.0	.231	.8
06-12	.021	11.4	.3691	.002	122.0	.091	2.5
06-13	.016	15.2	.5207	-.006	-40.6	-.361	-.9
06-14	.012	20.2	.6545	-.012	-20.5	-.400	-.9
06-15	.027	9.0	.2502	.011	23.4	.025	9.9
14-01	.023	10.7	.2628	.008	29.9	-.263	-1.2
14-02	.042	5.7	.0471	.037	6.4	-.162	-1.8
14-03	.079	2.9	.0012	.092	2.5	.292	.6
14-04	.216	.9	.0000	.280	.6	.430	.3
14-05	.035	6.9	.0914	.027	9.1	.054	4.4
14-06	.028	8.5	.1618	.017	14.5	-.275	-1.2
14-07	.119	1.8	.0000	.150	1.4	.373	.4
14-08	.149	1.4	.0000	.191	1.1	.390	.4
14-09	.028	8.6	.1648	.017	14.7	-.213	-1.4
14-10	.009	26.1	.7024	-.012	-20.3	.022	11.1
14-11	.038	6.4	.0689	.031	7.7	.212	.9
16-01	.002	112.7	.9815	-.029	-8.8	-.032	-7.9
16-02	.012	19.8	.6780	-.014	-18.3	-.010	-25.9
16-03	.006	44.4	.9033	-.024	-10.6	-.032	-8.1
16-04	.039	6.1	.1211	.026	9.3	.083	2.7
16-05	.008	29.3	.8139	-.020	-12.8	-.016	-15.4
16-06	.117	1.9	.0002	.137	1.6	.449	.3
16-07	.079	2.9	.0056	.083	2.8	.610	.2
16-08	.020	12.0	.4349	-.002	-135.1	.107	2.1
16-09	.009	26.9	.7890	-.019	-13.6	.007	33.8
16-10	.068	3.4	.0127	.069	3.4	.614	.2
16-11	.017	14.5	.5313	-.007	-36.2	.022	10.9
Avg	.059	4.0	.0000	.054 (.054)	4.4	.202	1.0
St.Dv.	.092			.110 (.009)		.729	



Figura 1. Mapa físico del área de estudio comprendida por la zona de convergencia genotípica de *An. pseudopunctipennis*: 1) Chiapas, sur de México, 2) Guatemala y 3) Belice, Centro América.

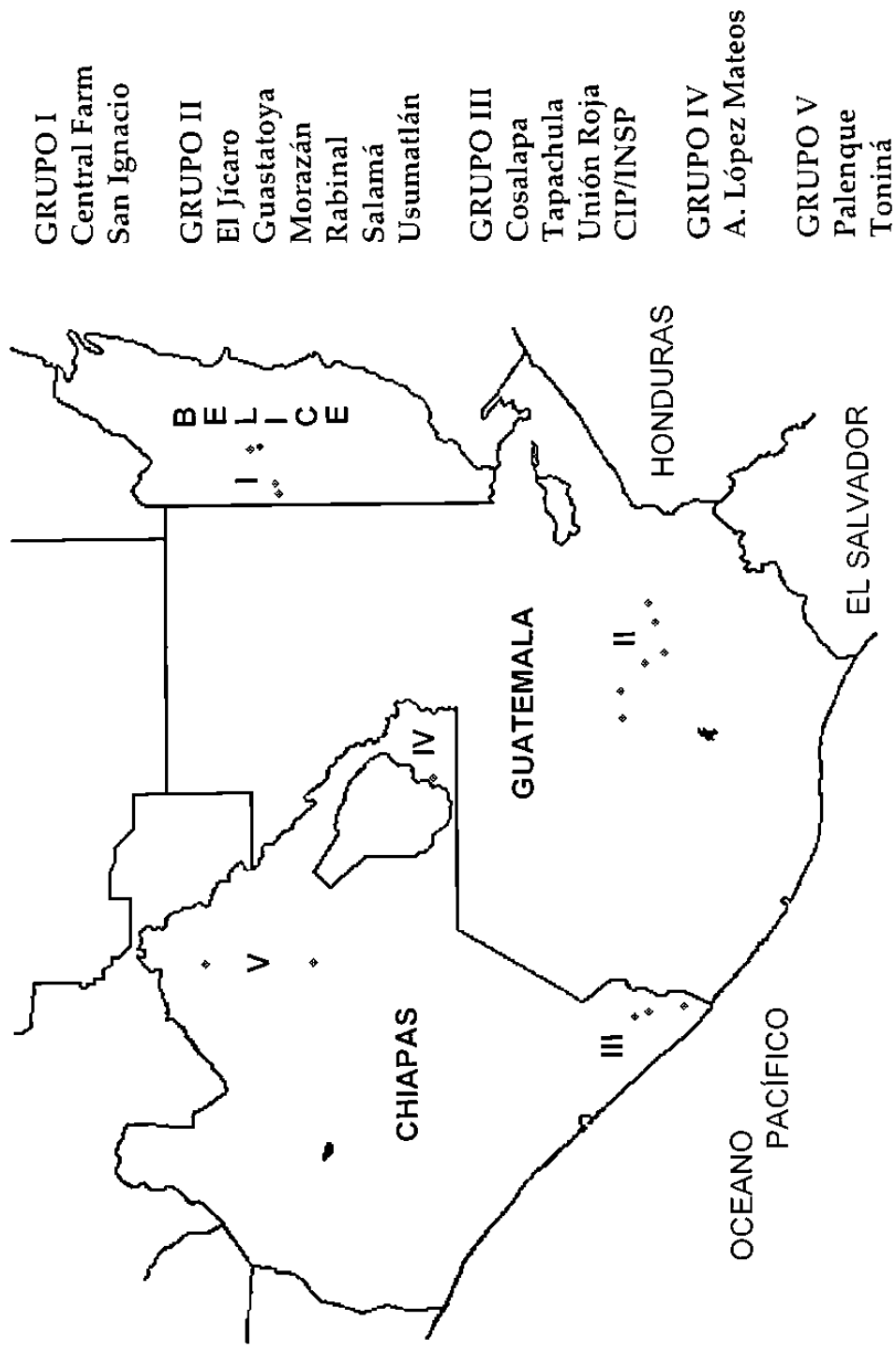


Figura 2. Área de estudio y distribución geográfica de las poblaciones silvestres de *An. pseudopunctipennis* durante las épocas de muestreo de 1997 y 1998.

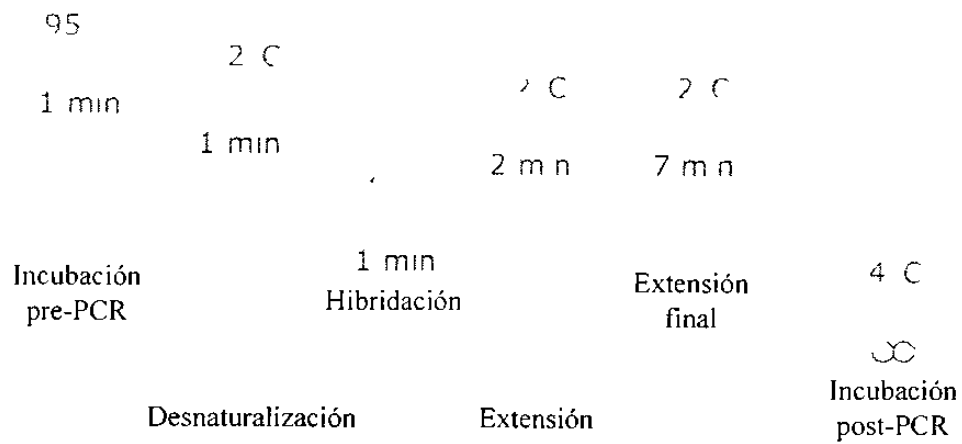


Figura 3. Diagrama del proceso y condiciones programadas para la amplificación aleatoria de regiones polimórficas del DNA por reacción en cadena de la polimerasa (RAPD-PCR).

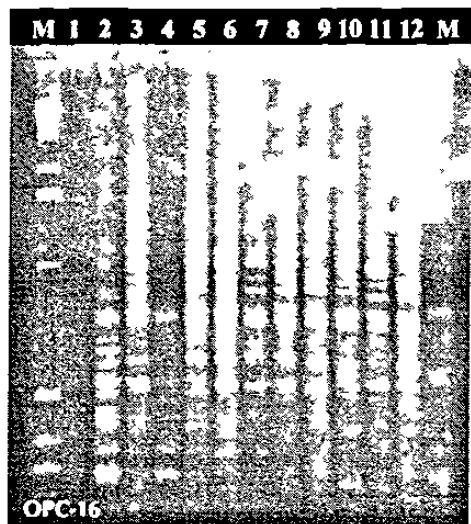
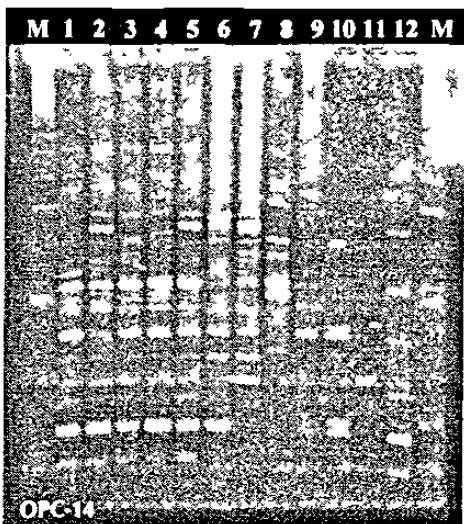
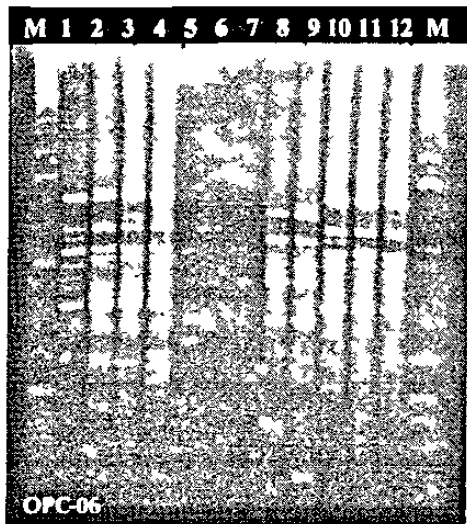
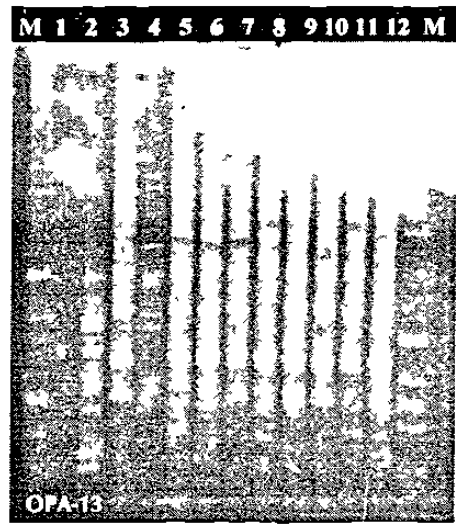
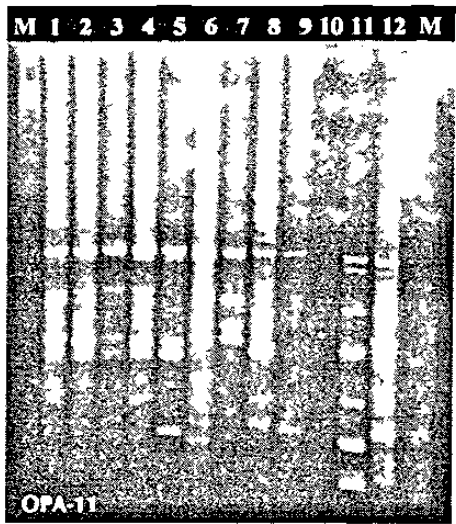


Figura 4. Perfiles moleculares del DNA de *An. pseudopunctipennis* con diferentes iniciadores arbitrarios comerciales.

```

      +GUATEMALA (GRUPO II)
+---2
!  !  +CHIAPAS SUR (GRUPO III)
!  +---1
!      +-----CHIAPAS SELVA (GRUPO IV)
!
--3--CHIAPAS NORTE (GRUPO V)
!
+-BELICE (GRUPO I)

```

	Sección de enlace entre las ramas	Distancia
3	2	0.00704
2	Guatemala	0 00031
2	1	0.00814
1	Chiapas Sur	-0.00200
1	Chiapas Selva	0.16520
3	Chiapas Norte	0.02541
3	Belice	0.03749

Figura 5. Dendrograma de las relaciones genéticas entre los diferentes grupos poblacionales de *An. pseudopunctipennis* analizados con marcadores RAPD-PCR.

```

+----- BELICE (GRUPO I)
!
+100.0      +---- CHIAPAS SUR (GRUPO III)
!   !      +-99.0
!   +-94.0   +---- GUATEMALA (GRUPO II)
!           !
!           +----- CHIAPAS NORTE (GRUPO V)
!
+----- CHIAPAS SELVA (GRUPO IV)

```

Figura 6. Dendrograma del análisis múltiple de series de datos moleculares (bootstrapping). Los valores sobre la base de cada rama indican la consistencia (número de veces) con que fueron apoyadas las relaciones entre los grupos poblacionales de *An. pseudopunctipennis*, después del consenso de 100 repeticiones.

