

insecticida, que en algunos casos se presenta en combinación con otros factores. En este caso se habla del gen *Pen* (penetración) (Plapp, 1976). La superficie del cuerpo de los insectos consiste de un exoesqueleto duro conocido como cutícula. Los insecticidas modernos son polares y de esta forma penetran fácilmente la cutícula del insecto. La mayoría de los insecticidas penetran por la cutícula, aunque algunos otros insecticidas entran por el aparato bucal, sistema respiratorio y otras partes vulnerables como las antenas, ojos y tarsos (Matsumura, 1985).

Manejo de Resistencia

El manejo de la resistencia abarca todas las medidas para retrasar o prevenir grados de resistencia que superen aquellos que obligan a abandonar el plaguicida, manteniendo al mismo tiempo el control eficaz de la enfermedad. Esto implica aplicar conocimientos técnicos y los medios disponibles para prolongar el uso eficaz de plaguicidas en la forma más prudente y eficaz en relación con el costo. El manejo eficaz de la resistencia exige un sistema confiable de vigilancia, detección temprana y vigilancia precisa. El primer paso es tomar todas las precauciones necesarias para prevenir la aparición de resistencia y preparar por adelantado un plan para contrarrestarla en las etapas tempranas de su desarrollo. Es importante reconocer que sólo se dispone de una cantidad limitada de plaguicidas para el empleo en programas de salud pública. Esos plaguicidas deben tratarse como recursos valiosos y, por consiguiente, conservarse, en especial porque la resistencia cruzada (la aparición de resistencia a un plaguicida al cual tal vez nunca haya estado expuesto el vector, mediante la exposición a otro compuesto que comparte con el primero ya sea una vía metabólica o el lugar de acción) puede agotar con rapidez los recursos de plaguicidas (Hemingway et al., 2000).

El control de la resistencia se puede lograr con uno o más de los siguientes

métodos:

-limitación de los plaguicidas a zonas con altos grados de transmisión de las enfermedades.

-limitación del empleo del plaguicida a las estaciones en las que se produce la máxima transmisión de la enfermedad.

-empleando métodos no químicos de lucha ya sean solos o como medidas complementarias en las estaciones o zonas en que son aplicables y eficaces en relación con su costo.

-sustitución de los plaguicidas residuales por otros no residuales aplicados sólo cuando son esenciales para combatir adecuadamente el vector, y

-utilización de métodos que maten sólo a las hembras adultas en vez de a los ejemplares de ambos sexos o a todos los estadios del ciclo biológico (OMS, 1986; WHO, 1992; Hemingway et al., 2000).

Detección de la resistencia

Pruebas de Susceptibilidad

Las pruebas de susceptibilidad estándares de la OMS, fueron desarrolladas con el propósito de determinar lo más pronto posible los niveles de susceptibilidad de los vectores de enfermedades. La técnica consiste en exponer los mosquitos a papeletas impregnadas con insecticida a una dosis diagnóstico estandarizada (OMS, 1975). Las papeletas consisten de papel Whatman #1 de 12 x 15 cm, las que se impregnan con una solución preparada con aceite de oliva como solvente y alcohol n-butílico como co-solvente. Esta

solución se distribuye uniformemente en la papeleta. El equipo para realizar las pruebas consiste de dos tubos cilíndricos interconectados por medio de una base con roscas a ambos lados, el cual tiene una placa deslizante interconectándolos a cada uno de ellos por esta base, en los extremos de cada tubo tiene una tapadera de rosca con malla que sirve para que los mosquitos no escapen. Cada equipo de tubos presenta un punto verde y rojo respectivamente. El tubo verde de observación lleva en su interior una papeleta de papel blanco de 12 x 15 cm sostenido al tubo por medio de un aro plateado. El tubo de punto rojo es de exposición, el cual lleva el papel impregnado de insecticida, sostenido por un aro de cobre. El criterio para definir la presencia de resistencia ha sido la supervivencia del 20% ó más de los individuos sometidos a ensayo con las concentraciones de diagnósticos de insecticidas actualmente conocidas (OMS, 1986). Sin embargo, esta técnica presenta inconvenientes: se necesitan cantidades grandes de mosquitos, únicamente se puede probar un insecticida por ensayo, su eficacia puede ser baja debido al constante uso de las papeletas impregnadas con insecticida, se requiere de temperatura adecuada $\approx 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, alta humedad relativa (80 %) y además no proporcionan la información sobre el tipo de mecanismo bioquímico que está confiriendo la resistencia. No obstante son una medición estándar (WHO, 1992).

Pruebas Bioquímicas

-Los resultados de los pruebas bioquímicas son más definidos que los bioensayos ya que un insecto que posea un mecanismo confirmado de resistencia sólo puede ser resistente. Por el contrario, en los bioensayos con dosis diagnósticas algunos insectos pueden haber sobrevivido como resultado de una dosificación inexacta, papeletas viejas o muy usadas, de

- Bisset, J., M.M Rodríguez, C. Díaz, A. Soca. 1998. Resistance in a strain of *Culex quinquefasciatus* coming from Medellín, Colombia. *Rev. Cubana Med. Trop.* 50(2): 133-7.
- Bloomquist, J.R. 1996. Ion channel as targets for insecticides. *Annu. Rev. Entomol.* 41: 163-190.
- Brogdon, W.G., A.M. Barber. 1990. Microplate assay of glutathione s-transferase activity for resistance detection in single-mosquito triturates. *Comp Biochem Physiol B.* 96(2):339-42.
- Brogdon, W.G., J.C. McAllister, J. Vulule. 1997. Heme peroxidase activity measured in single mosquitoes identifies individuals expressing the elevated oxidase mechanism for insecticide resistance. *J Am Mosq Control Assoc.* Sep;13(3):233-237.
- Brogdon, W.G., J.C. McAllister. 1998.
- Brown, A.W.A. 1986. Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. *J. Am. Mosq. Assoc.* 2: 123-140.
- Casida, J.E. y G.B. Quisad. 1998. Golden age of insecticide research: Past. Present, or Future?. *Annu. Rev. Entomol.* 43: 1-16.

- Chandre, F., F. Darriet, M. Darder, A. Cuany, J. M. Doannio, N. Pasteur, P. Gillet. 1998. Pyrethroid resistance in *Culex quinquefasciatus* from west Africa. *Med. Vet. Entomol.* 12:359-66.
- Devonshire, A.I., L. M. Field, M.S. Williamson. 1991. Molecular Biology of Insecticide Resistance. in *Insect Molecular Science*. (J. M. Crampton and P. Eggleston, eds), 16th Symposium of the Royal Entomological Society of London. Imperial Collage. Academic Press. pp173- 182.
- Ecobichon, D.J. 1996. Toxic effects of pesticides. Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons. Curtis D. Klassen (Ed). fifth edition. McGraw-Hill, New York, 643-669 pp.
- Frederickson, E.C. 1993. Bionomics and control of *Anopheles albimanus*. Washington, D. C. P.A.H.O. Tech. Pap. 33-44.
- Fuentes, M.G. 1992. Niveles de susceptibilidad en adultos de *Anopheles albimanus* Wiedemann y *An. pseudopunctipennis* Theobald (Diptera: Culicidae) a diferentes grupos toxicológicos de insecticidas en cuatro áreas agroecológicas del sur de Chiapas, México. Tesis para obtener el título de Químico Agrícola. Universidad Nacional Autónoma de Chiapas.
- Georghiou, G.P. 1973. Seasonal escalation of organophosphorus and carbamate resistance in *Anopheles albimanus* by agricultural sprays. *Env. Entomol.* 2(3): 369-374.

- Gerberg, E.J., D.R. Barnard, R. A. Ward. 1994. Manual for mosquito rearing and experimental techniques. Am. Mosq. Control Assoc. Bulletin No. 5. Louisiana.98 p.
- Hemingway, J., G.I. Jayawardena. 1987. The use of biochemical tests to identify multiple insecticide resistance mechanisms in field selected populations of *Anopheles subpictus* Grassi (Diptera: Culicidae). Bull. Ent. Res. 77, 57-66.
- Hemingway, J., G.J. Small, A. Monro, B.V. Sawyer, H. Kasap. 1992. Insecticide resistance gene frequencies in *Anopheles sacharovi* populations of the Cukurova plain, Adana Province, Turkey. Med. Vet. Entomol 6: 342-8.
- Hemingway, J., R.P. Penilla, A.D. Rodriguez, B.M. James, W. Edge, M.H. Rodriguez. 1997. Resistance management strategies in malaria vector mosquito control. A large scale field trial in southern Mexico. Pesticide Science. 51: 375-382.
- Hemingway, J., N. Hawkes, L. Prapanthadara, K.G. Jayawardena, H. Ranson. 1998. The role of gene splicing, gene amplification and regulation in mosquito insecticide resistance. Philos Trans R. Soc Lond B Biol Sci. 29; 353 (1376): 1695-9.
- Hemingway J. Ranson H. 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. Annu Rev Entomol. 45:371-91.

- Henao H. Samuel, G. Corey. 1991. Plaguicidas inhibidores de la colinesterasas. Serie Vigilancia 11. Centro Panamericano de Ecología Humana y salud. Programa de Salud Ambiental. Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud.
- Lagunes Tejeda A., M.J. Rodriguez. 1989. Grupos Toxicológicos de Insecticidas y Acaricidas. Los mecanismos de resistencia como base para el manejo de insecticidas y acaricidas agrícolas 226 pa.
- Loyola, E. G., M.A. Vaca, D. N. Bown, E. Pérez, M.H. Rodríguez. 1991. Comparative use of bendiocarb and DDT to control *An. pseudopunctipennis* in a malarious area of México. Medical and Vet. Entomol. 5: 233-242.
- Malo-García, I. 2000. Variabilidad geográfica en la susceptibilidad a insecticidas y genética de poblaciones vecinas de *Anopheles albimanus* Wiedemann (Diptera: Culicidae). Tesis para obtener el título de Químico Fármaco Biólogo. Universidad Nacional Autónoma de Chiapas.
- Martínez- Torres D., Chandre F., M.S. Williamson, F. Darriet, J.B. Berge, A.L. Devoshier, P. Gullet, N. Pasteur, D. Pauron. 1998. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (Kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. Insect. Mol. Biol. 7(2): 179-184.

Matsumura, Fumio. 1985. Toxicology of insecticides, 2da.ed. Plenum Press, New York 598 p.

Mazzarri M.B., G.P. Georghiou. 1995. Characterization of resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. J. Am. Mosq. Control Assoc. 11:315-22.

Miller, R.J., R.B. Davey, J.E. George. 1999. Characterization of pyrethroid resistance and susceptibility to coumaphos in Mexican *Boophilus microplus*. J. Med. Entomol. 36: 533-8.

Ocampo, B.C., W.G. Brogdon, C.M.Orrego, G. Toro, J.M. Lerma. 2000. Insecticide susceptibility in *Anopheles pseudopunctipennis* from Colombia: comparison between bioassay and biochemical assay.

Organización Mundial de la Salud. 1980. Resistencia de los vectores de enfermedades a los plaguicidas. Serie de informes técnicos N0 655. Quinto informe del comité de expertos de la OMS en Biología de los vectores y Lucha anti Vectorial. Ginebra.

Organización Mundial de la Salud. 1986. Resistencia de vectores y reservorio de enfermedades a los plaguicidas. Serie de Informes Técnicos No. 737.

- Pant, C. P. 1988. Malaria vector control : imagociding. In Wensdorfer, W. H. Mc Gregor (eds) in *Malaria: Principles and Practice of malarology*, Churchill-Livingstone, Edinburg, London, Melbourne and New York. Vol. 2: 1173-1212 pp
- Pasteur N., M. Raymond. 1996. Insecticide resistance genes in mosquitoes: their mutations, migration, and selection in field populations. *J. Hered.* 87(6):444-9.
- Penilla, R.P., A.D. Rodriguez, J. Hemingway, J.L. Torres, J.I. Arredondo-Jimenez, M.H. Rodríguez. 1998. Resistance management strategies in malaria vector mosquito control. Baseline data for a large-scale field trial against *Anopheles albimanus* in Mexico. *Med Vet Entomol.* 12:217-233.
- Pittendrigh B., R. Reenan, R.H. Ffrench-Constant, B. Ganetzky 1997. Point mutations in the *Drosophila* sodium channel gene para associated with resistance to DDT and pyrethroid insecticides. *Mol. Gen. Genet.* 256: 602-610.
- Plapp, F. W. 1976. Biochemical genetics of insecticide resistance. *Annu. Rev. Entomol.* 21: 179-197.
- Prapanthadara La-aied, J. Hemingway, A.J. Ketterman. 1993. Partial purification and characterization of glutathione S-transferases involved in DDT resistance from the mosquito *Anopheles gambiae*. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* 47: 119-133.

- Prapantadara La-aied, J. Hemingway, A.J. Ketterman. 1995. DDT- resistance in *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) fro Zanzibar, Tanzania, based on increased DDT-dehydrochlorinase activity of glutathione S-transferase. Bull. Entomol. Res. 85: 267- 274.
- Ramsey, J. M., E. Salinas, I. R. López, G.E. Angel, L. Martínez and D.N.Bown. 1988. Laboratory oviposition, fecundity and egg hatching ability of colonized *Anopheles albimanus* from Southern México. Mosq. News, 509 – 515.
- Ramsey, L. L. 1970. A twilight for persistent pesticides. FDA Papers 4: 14-18.
- Raymond, M., C. Chevillon, T. Guillemaud, T. Lenormand, N. Pasteur 1998. An overview of the evolution of overproduced esterases in the mosquito *Culex pipiens*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 353 (1376): 1707-11.
- Roderick, G.K. 1996. Geographic structure of insect populations: Gene Flow, Phylogeography, and their uses. Annu. Rev. Entomol. 41: 325-352.
- Rodriguez A.D. 2000. Large scale field evaluation of rotations and mosaic spraying as resistance management strategies in the coastal plain of Chiapas, México. Tesis Ph D. University of Wales,Cardiff.

- Rozendaal, J. A., J. P. M. Van Hoof, J. Voorham, B.F.J. Oostburg. 1989. Behavioral studies of *Anopheles darlingi* in Suriname to DDT residues on house walls. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 5: 339 – 350.
- Schoof, H. F., R. T. Taylor. 1972. Recent Advances in insecticides for Malaria Programs. *Am. J. Trop. Med. and Hyg.* 21 (5): 807- 812.
- Service, M.W. 1993. Mosquito ecology: Field sampling methods, 2nd ed. New York: Elsevier Applied Science. 988 pp.
- Suárez, M. F. 1990. First record of DDT resistance in *Anopheles darlingi*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 6: 72- 74.
- Villarreal T. C., M.H. Rodriguez, D.N. Bown, J.I. Arredondo-Jiménez. 1995. Low volume application by mist-blower compared with conventional compression sprayer treatment of houses with residual pyrethroid to control the malaria vector *Anopheles albimanus* in México. *Med. Vet. Entomol.* 9: 187-194.
- World Health Organization. 1975. Manual on practical entomology in malaria. Vol 2. World Health Organization, Geneva.
- World Health Organization. Vector resistance to insecticides. 1992. 15th Report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control. World Health Organ. Tech. Rep. Ser. 818, 818: 1 – 62.

Williamson MS, I. Denholm, C.A. Bell, A.L. Devonshire. 1993. Knockdown resistance (kdr) to DDT and pyrethroid insecticides maps to a sodium channel gene locus in the housefly (*Musca domestica*). *Mol. Gen. Genet.* 240(1): 17-22.

Williamson M.S., D. Martinez-Torrez, C.A. Hick, A.I. Devonshire. 1996. Identification of mutations in the housefly *para*-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. *Mol Gen Genet.* 252: 51-60.

Zar, H.J. 1984. Biostatistical analysis. 2nd Edition. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey 718 pp.

Cuadro 1.1. Localidades de colecta de *Anopheles albimanus* por agroecosistemas y sus coordenadas.

Localidad	Área	Latitud Norte	Longitud Oeste
Brisas del Mar	Banano	14° 37'	92° 18'
Cosalapa	Banano	14° 40'	92° 14'
Mareas del Suchiate	Banano	14° 32'	92° 13'
Herradero	Banano	14° 37'	92° 19'
Nueva Independencia	Banano	14° 37'	92° 14'
Álvaro Obregón	Cultivos Mixtos	14° 54'	92° 23'
Marte R. Gómez	Cultivos Mixtos	14° 55'	92° 26'
Cabildo	Cultivos Mixtos	14° 45'	92° 27'
Emiliano Zapata	Cultivos Mixtos	14° 50'	92° 32'
Confeti	Cultivos Mixtos	14° 54'	92° 17'
Altamira	Región azucarera	15° 07'	92° 35'
Castaño	Región azucarera	15° 11'	92° 45'
Río Arriba	Región azucarera	15° 08'	92° 43'
Xochicalco	Región azucarera	15° 04'	92° 36'
Lázaro Cárdenas	Región azucarera	15° 07'	92° 29'
Escobo	Reserva Ecológica	15° 06'	92° 40'
Aztlán	Reserva Ecológica	14° 57'	92° 39'
Barra San José	Reserva Ecológica	14° 54'	92° 37'
Barra Zacapulco	Reserva Ecológica	15° 12'	92° 52'
Las Palmas	Reserva Ecológica	15° 09'	92° 50'
Cuachas	Ganando	15° 26'	93° 07'
Mapastepec	Ganando	15° 25'	92° 54'
El Fortín	Ganando	15° 38'	93° 23'
Nuevo Progreso	Ganado	15° 33'	93° 07'
Zapotál	Ganado	15° 26'	93° 10'

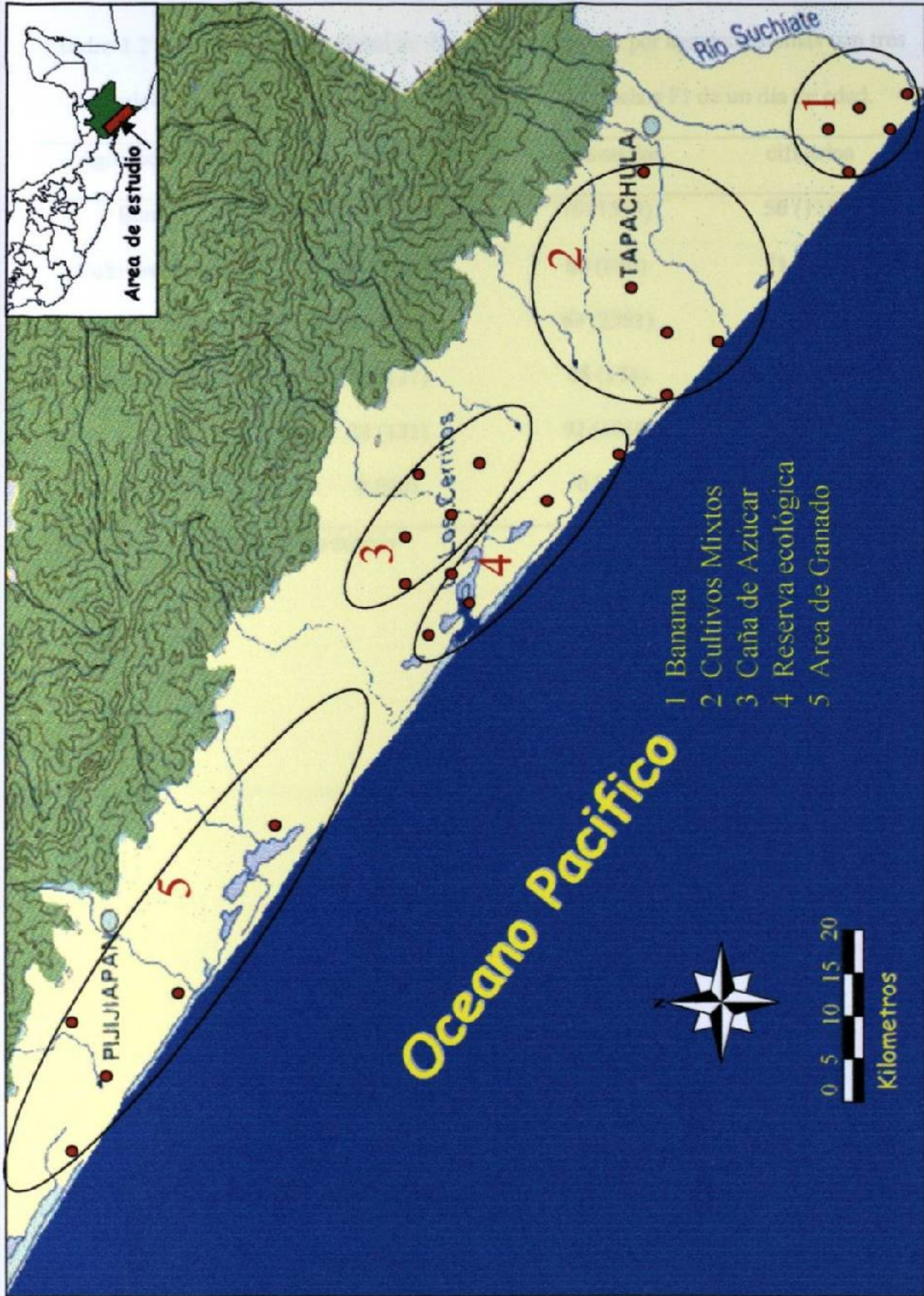


Fig 1.1 Área de colecta de *Anopheles albimanus* y distribución de las cinco áreas agroecológicas en el sur de Chiapas, México.

Cuadro 1.2 Porcentaje de mortalidad de *Anopheles albimanus* por agroecosistemas con tres insecticidas en el sur de Chiapas, México. Hembras + machos F1 de un día de edad.

Agroecosistema	DDT	deltametrina	ciflutrina
Banano	21 (1181) ¹	75 (1519)	50 (1308)
Cultivos Mixtos	50 (1931)	85 (640)	71 (1381)
Caña de Azúcar	31 (1490)	89 (2581)	69 (1043)
Reserva Ecológica	31 (137)	85 (374)	69 (291)
Ganado	24 (131)	92 (1058)	84 (330)
Valor de P	0.0001	0.0001	0.0001

¹Tamaño de muestra entre paréntesis

Cuadro 1.3. Susceptibilidad de *Anopheles albimanus* (machos + hembras) F1 de 1 día de edad, a los insecticidas DDT, deltametrina y ciflutrina por tipo de captura, en el sur de Chiapas, México.

Captura	DDT	Deltametrina	Ciflutrina
Trampa Animal	27.4 a (157) ¹	87.5 (800)	67.2 (333)
Corral	31.3 a (1883)	85.4 (3349)	64.7 (2079)
C.H. intra	36.8 b (1272)	87.5 (1004)	65.3 (908)
C.H. peri	43.5 b (1312)	81.4 (898)	67.4 (952)
Valor de <i>P</i>	0.0001	0.2524	0.7385

¹ Tamaño de muestra entre paréntesis

Cuadro 1.4. Susceptibilidad de *Anopheles albimanus* al DDT, deltametrina y ciflutrina, por sexo y agroecosistemas en Chiapas, México.

Zona	DDT		Deltametrina		Ciflutrina	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Banano	23.4 a (487) ¹	18.3 a (694)	79.6 a (697)	70.3 a (822)	52.2 a (594)	48.3 a (714)
Cultivos mixtos	54.3 b (870)	46.2 c (1061)	85.1 bc (289)	83.5 b (351)	75.1 b (631)	68.0 b (750)
Caña de Azúcar	31.5 a (676)	30.5 b (814)	92.4 bd (1168)	86.3 b (1413)	75.8 b (443)	64.2 b (600)
Reserva Ecológica	30.2 a (53)	32.1 b (84)	89.1 bc (184)	81.6 b (190)	75.5 b (135)	62.8 b (156)
Ganado	32.7 a (58)	16.4 a (73)	94.6 bd (469)	89.4 b (589)	84.1 b (157)	83.8 c (173)
Valor de P	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

¹ Tamaño de muestra entre paréntesis

Cuadro 1.5. Títulos de enzimas responsables de la resistencia a insecticidas en *Anopheles albimanus* entre cuatro agro-ecosistemas del sur de Chiapas, México.

Area	AchE ¹	α -NA ²	β -NA ²	PNPA ²	GST ²	C P450 ³
Banano	96.3 a	0.000929 a	0.000703 a	0.058364 a	0.177742 a	0.000256 a
Caña	92.4 bc	0.000641 bc	0.000465 bc	0.034797 b	0.109906 bc	0.000173 bc
Reserva	82.8 bd	0.000763 ade	0.000544 bde	0.041208 b	0.106615 bce	0.000131 bce
Ganado	92.7 bc	0.000563 bcf	0.000412 bcf	0.035254 b	0.138122 bde	0.000125 bde
<i>P</i>	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

El tamaño de muestra por área agroecológica fue 145-150 mosquitos.

¹ Media del porcentaje de inhibición de acetilcolinesterasa,

² Media nmol de producto /min/mg de proteína.

³ Media nmol unidades equivalentes de citocromo P⁴⁵⁰ mg de proteína.

^{abcde} Prueba de diferencia mínima significativa de Fisher.

Cuadro 1.6. Inhibición de la actividad del AchE por propoxur en *Anopheles albimanus* de 1 día de edad por tipo de captura en las diferentes agro-ecosistemas en el sur de Chiapas. (media \pm dvSt).

ZONA	Trampa Animal	Corral	Cebo humano intradomiciliar	Cebo humano peridomiciliar
Banano	95.3 \pm 5.6 (41) ¹	97.7 \pm 5.1 (151)	91.9 \pm 8.2 (49)	98.2 \pm 7.9 (31)
Cultivos		86.0 \pm 18.5 (9)	93.9 \pm 7.9 (135)	92.5 \pm 7.8 (45)
Mixtos		89.4 \pm 9.5 (26)	84.7 \pm 12.9 (115)	82.8 \pm 10.5 (30)
Reserva Ecológica		93.7 \pm 9.2 (162)	91.9 \pm 15.7 (19)	
Ganado	90.2 \pm 9.9 (18)			
Valor de P	0.0157	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

¹ Tamaño de muestra entre paréntesis

Cuadro 1.7. Actividad de esterasa en *Anopheles albimanus* de 1 día de edad: μmol de α esterases por cuatro tipos de captura, en diferentes agroecosistemas del sur de Chiapas.

Media \pm Desv. estándar nmol de producto/min/mg/proteína.

ZONA	Trampa Animal	Corral	Cebo humano intradomiciliar	Cebo humano peridomiciliar
Banano	0.00057 \pm 0.00025 (41) ¹	0.00086 \pm 0.00074 (157)	0.00169 \pm 0.00186 (52)	0.00048 \pm 0.00020 (31)
Cultivos		0.00052 \pm 0.00021 (11)	0.00072 \pm 0.00051 (144)	0.00075 \pm 0.00028 (57)
Mixtos		0.00043 \pm 0.00016 (29)	0.00072 \pm 0.00037 (126)	0.00053 \pm 0.00021 (32)
Reserva Ecológica		0.00060 \pm 0.00026 (167)	0.00046 \pm 0.00026 (20)	
Ganado				
Valor de P	0.0009	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

¹ Tamaño de muestra entre paréntesis

Cuadro 1.8. Actividad de esterasa en *Anopheles albimanus* de 1 día de edad: μmol de β esterases por cuatro tipos de captura, en diferentes agroecosistemas del sur de Chiapas. Media \pm Desv. estándar nmol de producto/min/mg/proteína.

ZONA	Trampa Animal	Corral	Cebo humano intradomiciliar	Cebo humano peridomiciliar
Banano	0.00043 \pm 0.00024 (41) ¹	0.00060 \pm 0.00054 (157)	0.00147 \pm 0.00162 (52)	0.00030 \pm 0.00016 (31)
Cultivos		0.00037 \pm 0.00015 (11)	0.00053 \pm 0.00060 (144)	0.00054 \pm 0.00023 (57)
Mixtos		0.0003 \pm 0.00012 (29)	0.00052 \pm 0.00030 (125)	0.00038 \pm 0.00019 (29)
Reserva Ecológica		0.00044 \pm 0.00019 (164)	0.00037 \pm 0.00018 (17)	
Ganado	0.00030 \pm 0.00008 (16)			
Valor de P	0.0423	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

¹ Tamaño de muestra entre paréntesis

Cuadro 1.9. Actividad de esterasa en *Anopheles albimanus* de 1 día de edad, actividad del sustrato pNPA por cuatro tipos de captura, en diferentes agroecosistemas del sur de Chiapas. Media \pm Desv. estándar $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}/\text{proteína}$.

ZONA	Trampa Animal	Corral	Cebo humano intradomiciliar	Cebo humano peridomiciliar
Banano	0.03198 \pm 0.02312 (41) ¹	0.05015 \pm 0.05596 (157)	0.11356 \pm 0.12274 (52)	0.04116 \pm 0.03913 (29)
Cultivos		0.02924 \pm 0.01248 (11)	0.03862 \pm 0.05134 (144)	0.03697 \pm 0.02166 (56)
Mixtos		0.03109 \pm 0.01790 (29)	0.03730 \pm 0.02360 (126)	0.03773 \pm 0.02331 (32)
Reserva Ecológica		0.03424 \pm 0.02069 (164)	0.02148 \pm 0.01180 (20)	
Ganado	0.02069 \pm 0.01494 (20)			
Valor de P	0.0516	0.0015	< 0.0001	0.7948

¹ Tamaño de muestra entre paréntesis

Cuadro 1.10. Actividad de GST en *Anopheles albimanus* de 1 día de edad, en cuatro tipos de captura, en diferentes agroecosistemas del sur de Chiapas. Media \pm Desv. estándar nmol de producto/min/mg/proteína.

ZONA	Trampa Animal	Corral	Cebo humano intradomiciliar	Cebo humano peridomiciliar
Banano	0.10612 \pm 0.05300 (41) ¹	0.15614 \pm 0.11844 (156)	0.36045 \pm 0.44521 (52)	0.08041 \pm 0.04574 (31)
Cultivos	.	0.08885 \pm 0.02199 (11)	0.12542 \pm 0.12892 (142)	0.09289 \pm 0.03842 (57)
Mixtos		0.09519 \pm 0.03520 (29)	0.10249 \pm 0.04942 (126)	0.12654 \pm 0.04772 (32)
Reserva Ecológica		0.15095 \pm 0.07897 (168)	0.12587 \pm 0.0844 (20)	
Ganado	0.10262 \pm 0.04379 (21)	0.15095 \pm 0.07897 (168)	0.12587 \pm 0.0844 (20)	
Valor de P	0.7955	0.0027	< 0.0001	< 0.0001

¹ Tamaño de muestra entre paréntesis

Cuadro 1.11. Monooxigenasas dependientes de citocromo P450 en *Anopheles albimanus* de 1 día de edad, por cuatro tipos de captura, en diferentes agroecosistemas del sur de Chiapas. Media \pm Desv. estándar nmol unidades equivalentes de citocromo P450/mg/proteína.

ZONA	Trampa Animal	Corral	Cebo humano intradomiciliar	Cebo humano peridomiciliar
Banano	0.00017 \pm 0.00012 (41) ¹	0.00019 \pm 0.00033 (151)	0.00061 \pm 0.00068 (52)	0.00007 \pm 0.00005 (31)
Cultivos		0.00016 \pm 0.00010 (11)	0.00020 \pm 0.00033 (144)	0.00012 \pm 0.00009 (57)
Reserva		0.0003 \pm 0.00012 (29)	0.00052 \pm 0.00030 (125)	0.00038 \pm 0.00019 (29)
Ecológica				
Ganado	0.00014 \pm 0.00009 (21)	0.00013 \pm 0.00009 (168)	0.00012 \pm 0.00007 (20)	
Valor de P	0.3994	0.1110	< 0.0001	0.0075

¹ Tamaño de muestra entre paréntesis

Porcentaje de Inhibición de AChE por Propoxur

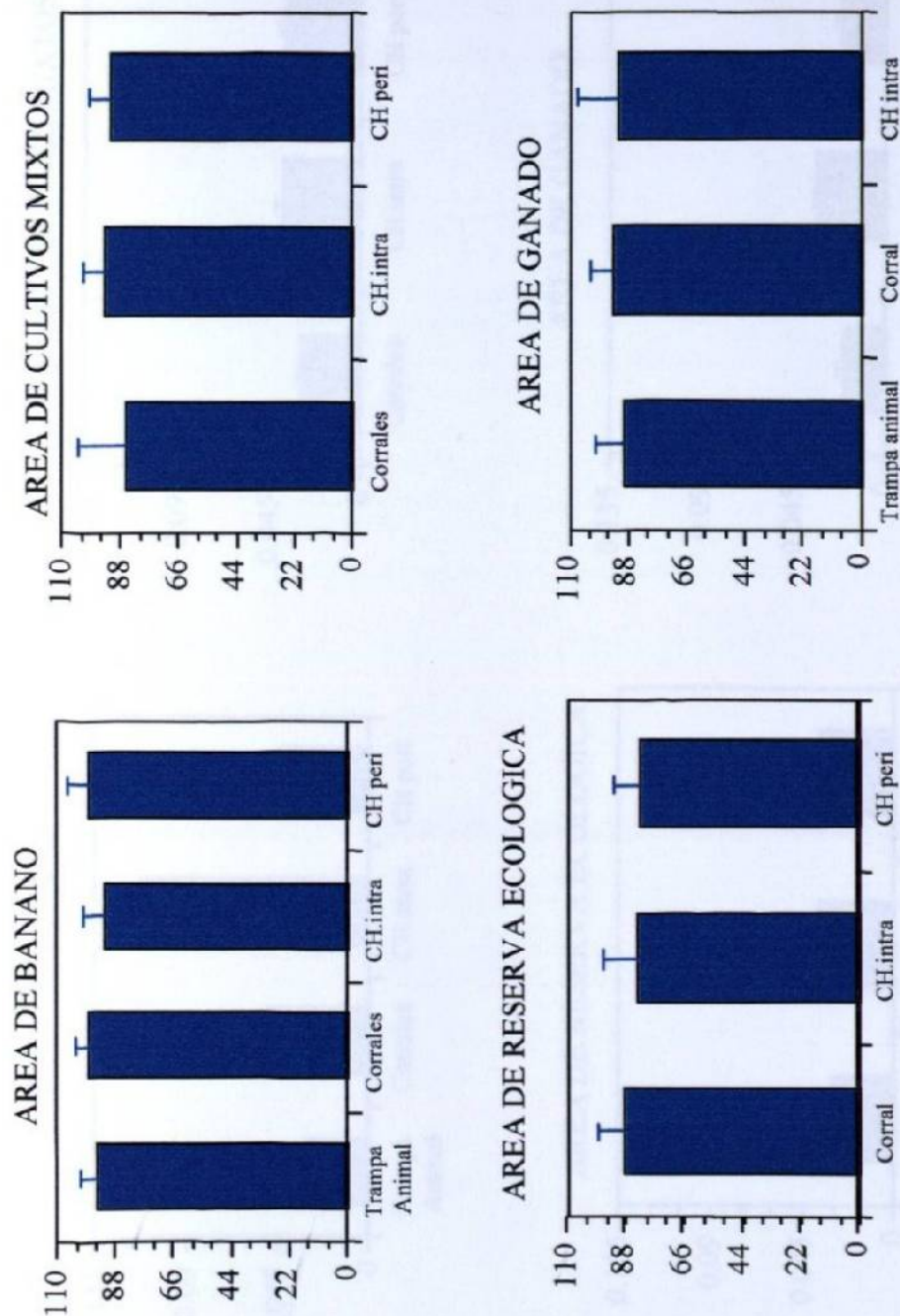


Fig 1.2. Porcentaje de Inhibición de la acetilcolinesterasa en *An.albimanus* (F1 machos + hembras, de 1 día de edad) por tipo de captura, pertenecientes a cuatro áreas agroecológicas del sur de Chiapas, México.

Actividad de pNPA

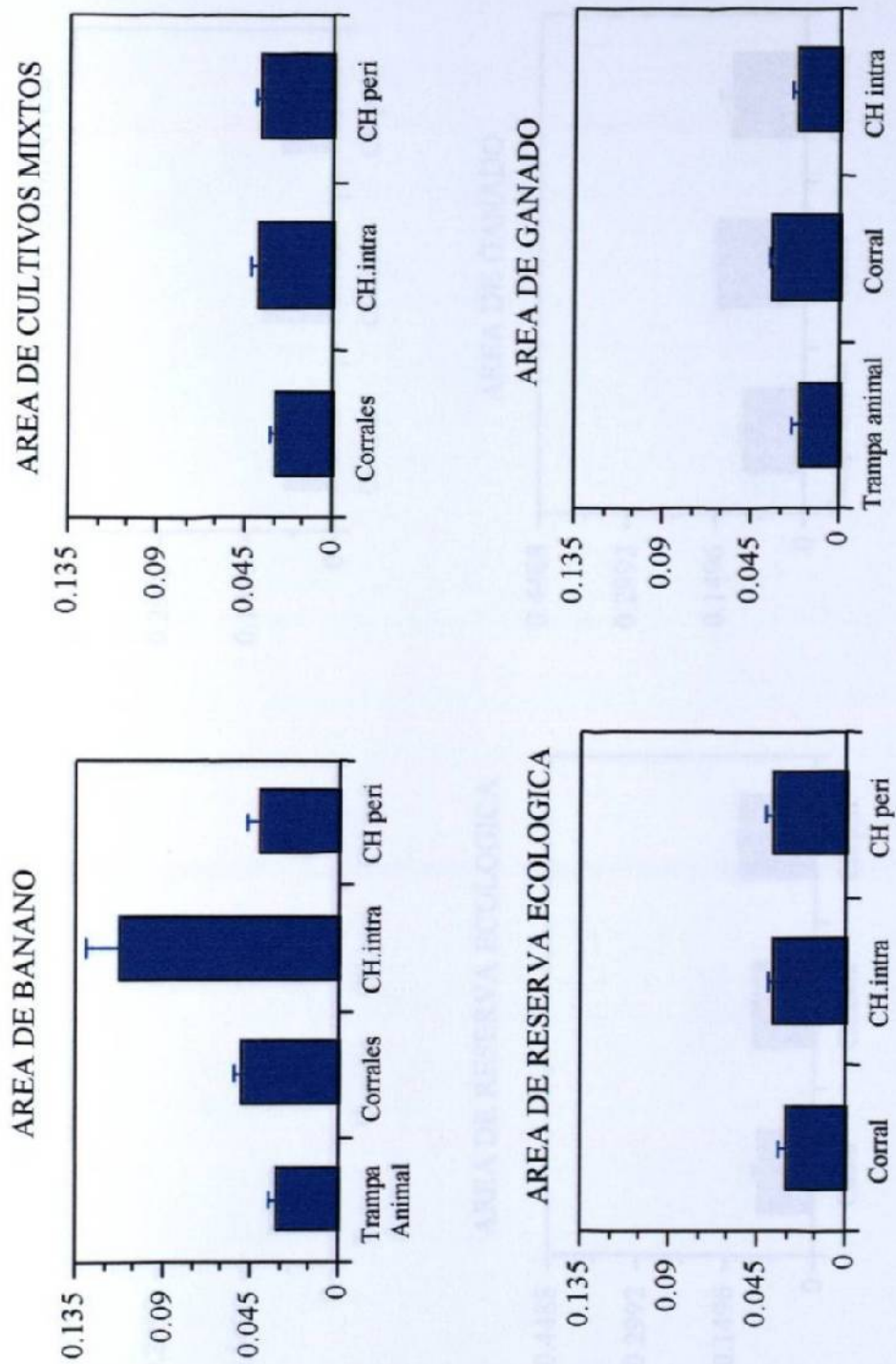


Fig 1.3. Actividad enzimática con el sustrato pNPA de *Anopheles albimanus* (F1 machos + hembras, de 1 día de edad) por tipo de captura en cuatro áreas agroecológicas en el sur de Chiapas, México.

Actividad de GsT

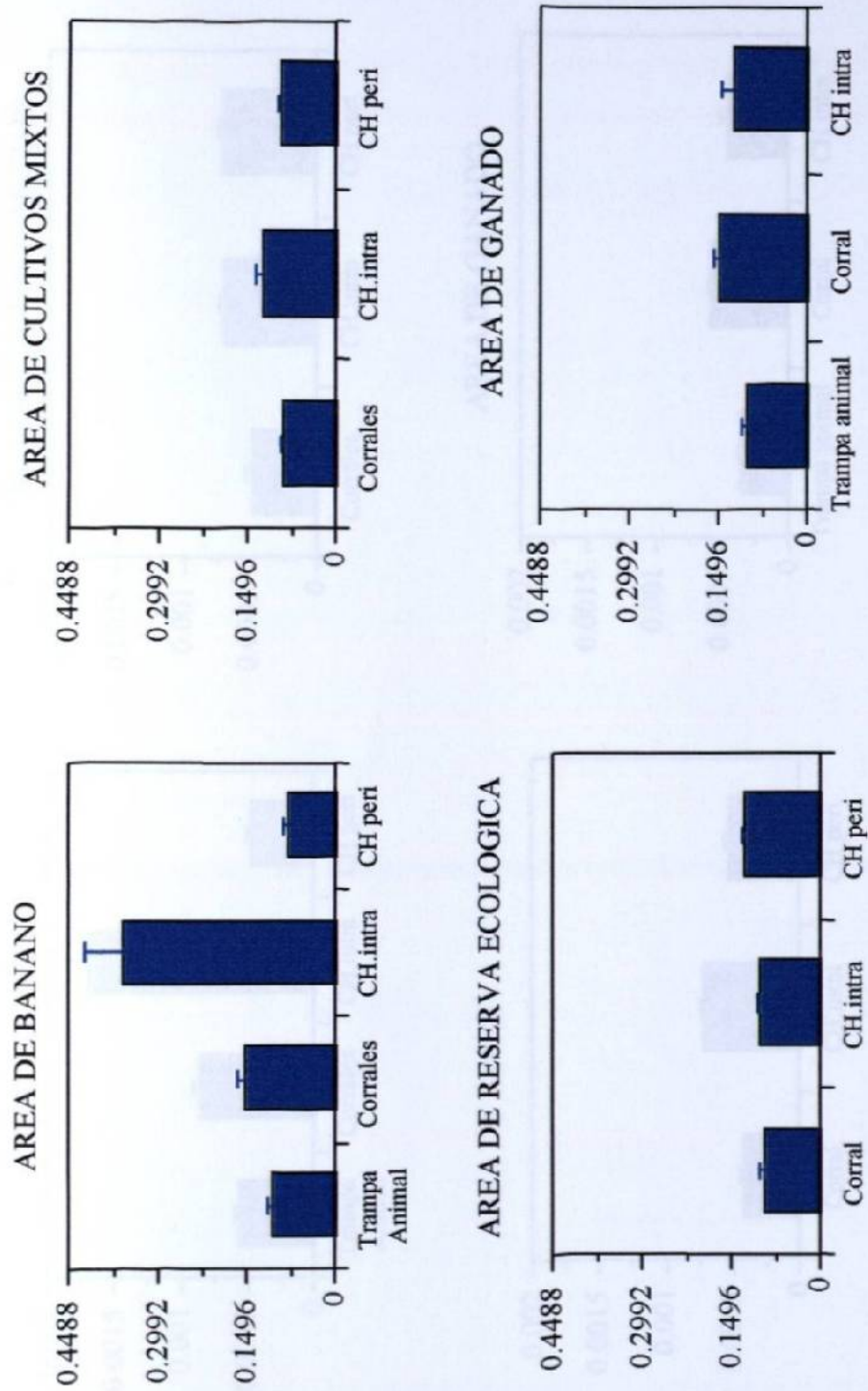


Fig 1.4. Actividad de glutatión s- transferasa (GsT) con el substrato dicloronitrobenzeno *Anopheles albimanus* (F1 machos + hembras, de 1 día de edad) por tipo de captura en cuatro áreas agroecológicas en el sur de Chiapas, México.

μ Moles de α -Naftol producido /min/mg de proteína

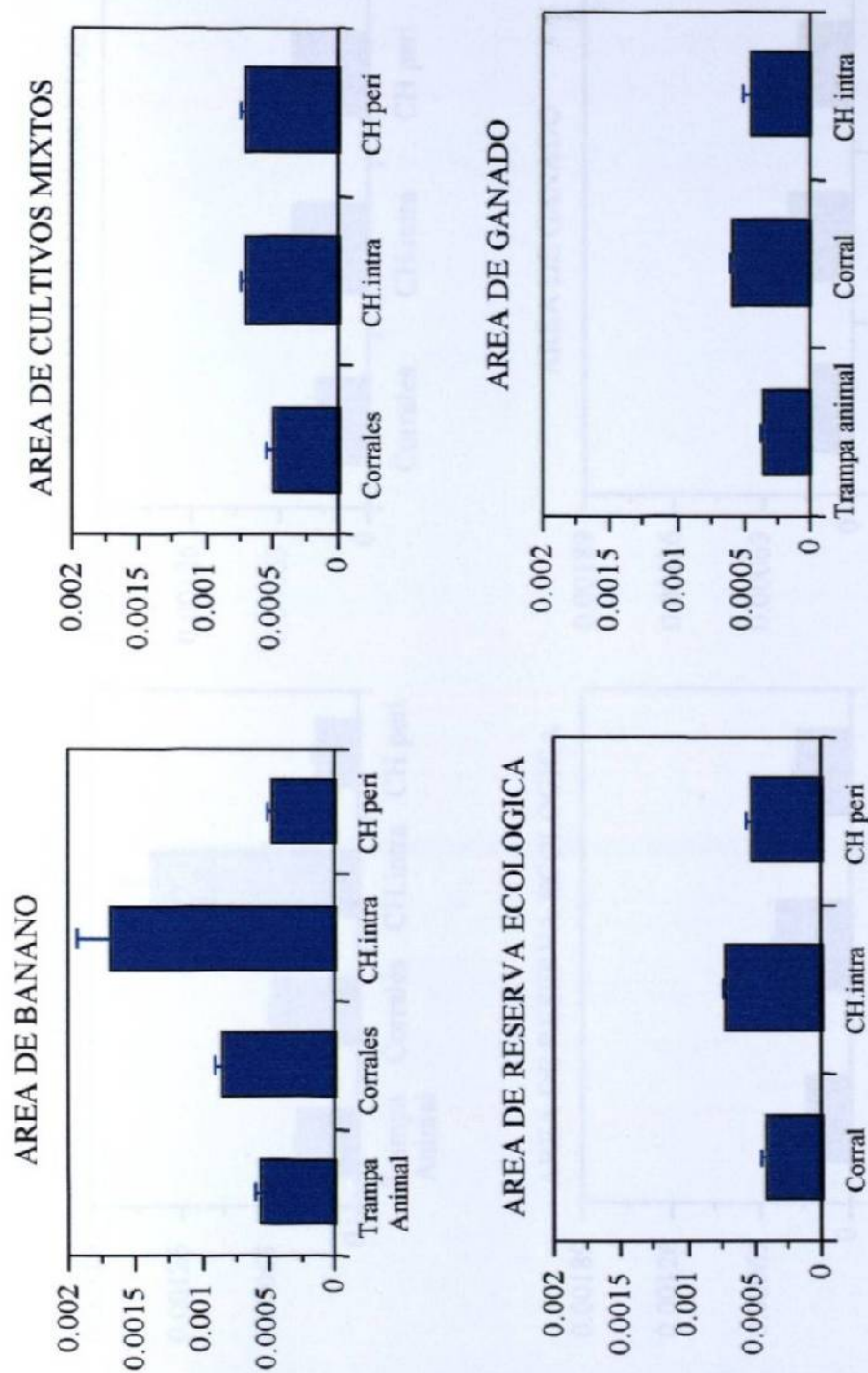


Fig 1.5. Actividad de esterazas con el substrato α -naftil acetato en *Anopheles albimanus* (F1 machos + hembras, de 1 día de edad) de diferentes localidades pertenecientes a cuatro áreas agroecológicas en el sur de Chiapas, México.

μ Moles de β -Naftol producido /min/mg de proteína

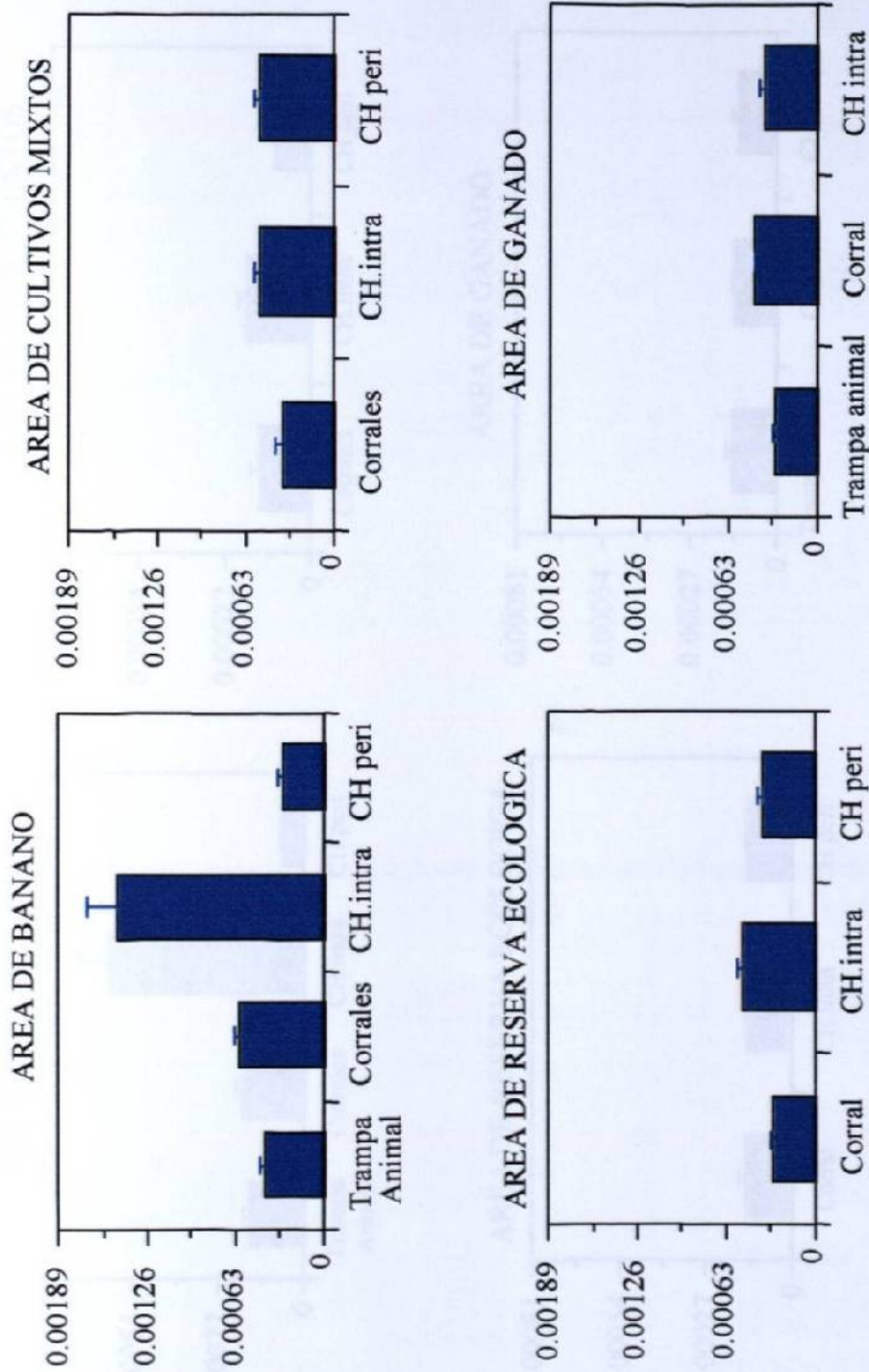


Fig 1.6. Actividad de esterasas con el sustrato β -naftil acetato en *Anopheles albimanus* (F1 machos + hembras, de 1 día de edad) de diferentes localidades pertenecientes a cuatro áreas agroecológicas en el sur de Chiapas, México.

Unidades equivalentes de citocromo P 450

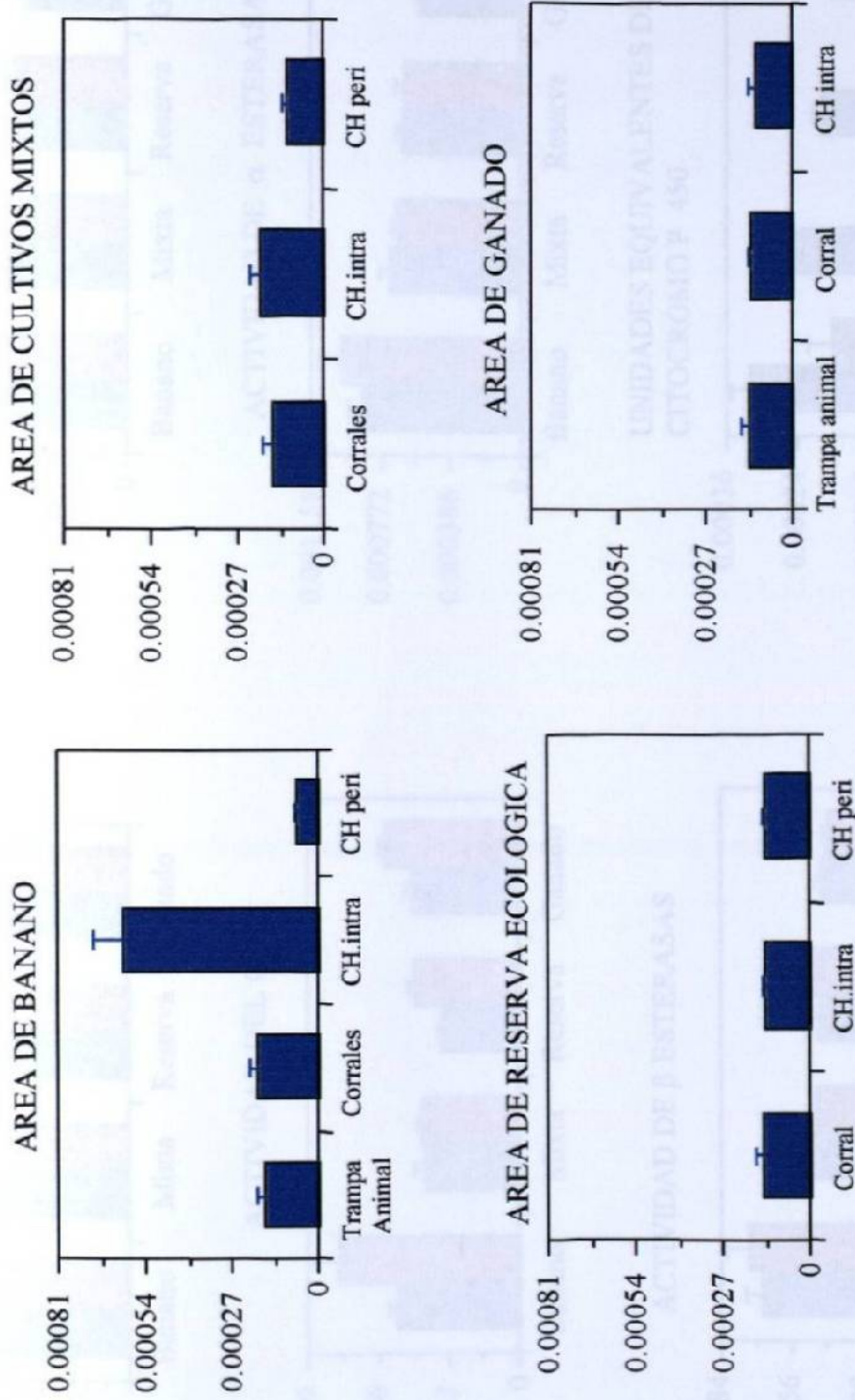
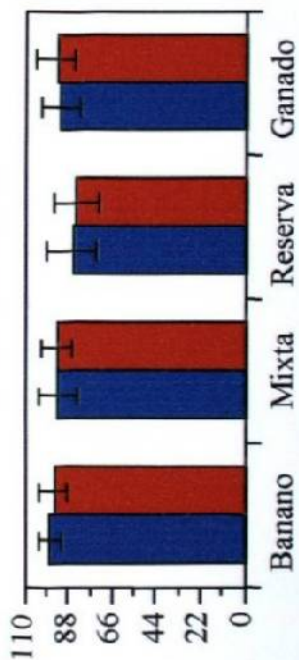
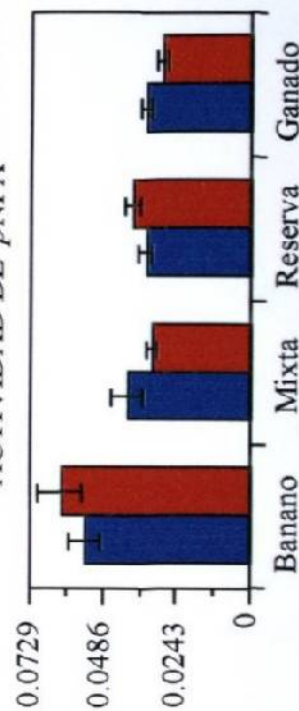


Fig 1.7. Promedio de citocromo P 450 que representa la actividad de monooxigenasas en *Anopheles albimanus* (F1 machos + hembras, de 1 día de edad) de diferentes localidades pertenecientes a cuatro áreas agroecológicas en el sur de Chiapas, México.

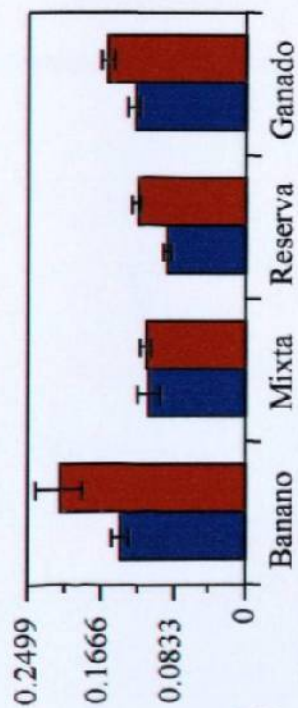
% DE INHIBICIÓN



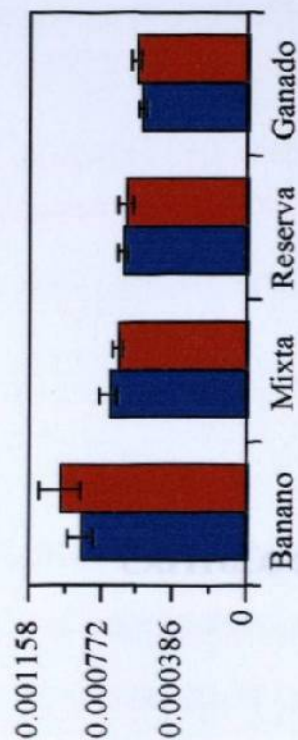
ACTIVIDAD DE pNPA



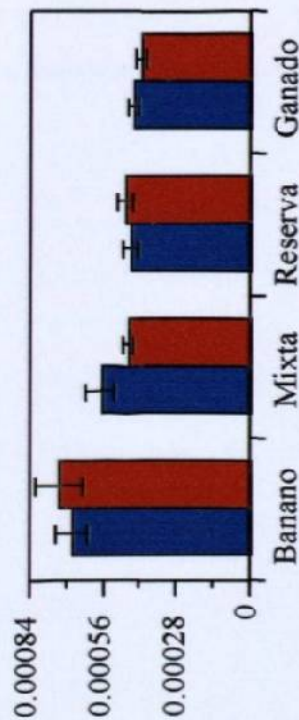
ACTIVIDAD DEL GsT



ACTIVIDAD DE α ESTERASAS



ACTIVIDAD DE β ESTERASAS



UNIDADES EQUIVALENTES DEL CITOCROMO P 450

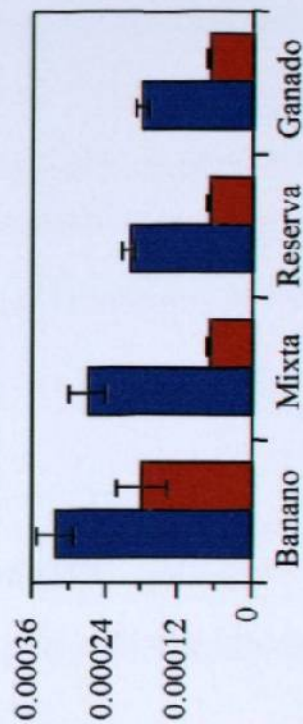


Fig 1.8. Pruebas bioquímicas por sexo de *Anopheles albimanus* en las cuatro áreas agroecológicas del sur de Chiapas, México. Mosquito F1 de 1 día de edad.

CAPITULO 2

**FLUJO DE GENES DE *ANOPHELES ALBIMANUS* EN EL AMBITO
MICROGEOGRÁFICO EN EL SUR DE CHIAPAS Y MACROGEOGRÁFICO: EN
MÉXICO UTILIZANDO RAPD-PCR.**

RESUMEN

Se determinó la frecuencia de marcadores genéticos mediante la amplificación de regiones aleatorias del DNA genómico con iniciadores de 10 pares de bases utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (RAPD-PCR) en *Anopheles albimanus* en un estudio microgeográfico en la costa sur de Chiapas, y en un estudio macrogeográfico en la República mexicana. En un tamizado inicial de 60 iniciadores, se escogieron cinco (A05, A20, B04, B11, B18) que produjeron 46 marcadores genéticos en Chiapas y siete (A05, A08, A12, A19, A20, B04 y B11) que produjeron 51 marcadores moleculares en México.

Las distancias genéticas de Nei (1972) entre las localidades de Chiapas presentaron un rango de a 0.109. Las localidades con menor distancia genética fueron entre La Barra San José y Las Palmas (0.011). La mayor distancia genética se presentó entre las localidades de El Fortín y El Zapotal (0.109).

La distancia genética de Nei (1972) entre agroecosistemas presentó un rango 0.0078 a 0.0212. La menor distancia genética entre las cinco áreas se observó entre el banano y caña de azúcar (0.0078), mientras que la mayor distancia genética fue entre banano y reserva ecológica (0.0212).

Al comparar las distancias genéticas entre los estados de la República, se encontró que la mayor fue entre el estado de Jalisco comparado con Chiapas (0.1975), Tabasco (0.2079) y Guatemala (0.1499), mientras que las menores distancias genéticas se presentaron entre los estados de Guerrero y Colima (0.0203), Chiapas y Tabasco (0.0254).

Los valores de Nm fluctuó entre 1.8 a 3.3 (Método de Wright), en el área de ganado y área de reserva ecológica respectivamente. El valor promedio de F_{ST} , por los tres métodos propuestos (Wright; Weir y Cockerham; Lynch y Milligan) entre las 20 localidades en Chiapas fueron: $F_{ST} = 0.117 (\pm 0.073)$; $0.088 (\pm 0.080)$ y $0.109 (\pm 0.153)$ y el valor de Nm a partir de F_{ST} calculado fueron 1.9, 2.6 y 2.0 respectivamente. El flujo génico entre los cinco agroecosistemas fue $Nm = 1.8$ a 2.4 (calculado a partir de los valores de F_{ST} de Wright).

Los valores promedios de F_{ST} entre estados de la República mexicana fueron 0.169 (± 0.122), 0.149 (± 0.136) y 0.186 (± 0.194) por los métodos de Wright, Weir y Cockerham; y Lynch y Milligan, respectivamente. Los valores de Nm por los tres métodos fue: 1.2, 1.4 y 1.1 respectivamente.

El dendrograma con las 20 localidades mostró una incipiente agrupación de localidades por agroecosistemas. El mayor valor de análisis Bootstrap (87%) se presentó entre dos localidades de la zona de reserva ecológica Las Palmas y La Barra San José. Las localidades de Álvaro Obregón y Cabildo presentaron un 54 % de consistencia, ambas pertenecientes a la zona de cultivos mixtos. Mientras que Brisas del Mar y Mareas del Suchiate presentaron 55 % ambas localidades pertenecientes a la zona de banano.

El dendrograma por agroecosistemas unió la zona de Caña de Azúcar con la zona de Banano, con un 87% de consistencia en el análisis de Bootstrap.

El dendrograma en el ámbito nacional mostró dos ramas principales, una agrupa los estados del norte de México y otra los estados del sur. El estado de Jalisco fue colocado como aparte de estas dos ramas de similitud genética. El análisis Bootstrap indicó una alta consistencia (100 %) entre el estado de Chiapas y Tabasco, y agrupó con 86 % de consistencia a los estados de Nayarit, Sinaloa, Colima y Guerrero.

En un programa hipotético de control genético utilizando mosquitos transgénicos refractarios a la malaria será necesario conducir liberaciones separadas de mosquitos modificados genéticamente en cada uno de los agroecosistemas.

INTRODUCCION

Anopheles albimanus es el principal vector de paludismo ocasionado por *Plasmodium vivax* fenotipo VK210 en la planicie costera de Chiapas (Rodríguez et al., 2000). Las poblaciones de este importante vector son muy abundantes en la temporada de lluvias (mayo a octubre) y disminuyen durante la temporada de secas. Ocurren en una diversidad de hábitat y presentan alta variación fenotípica pupal (Faran, 1980). En un estudio sobre la posible existencia de sub-poblaciones o subespecies con preferencia por alimentarse de humanos, *An. albimanus* presentó un comportamiento oportunista en la búsqueda de hospederos (Arredondo et al., 1992). Estudios previos han demostrado variaciones en las poblaciones de campo por ejemplo: morfología de huevos (Rodríguez et al., 1992), fenotipos larvales con susceptibilidad diferencial a *Plasmodium vivax* (Chan et al., 1994) y variabilidad en la resistencia a insecticidas en mosquitos capturados por diferentes métodos (Penilla et al., 1998).

Con el incremento en la resistencia a insecticidas es necesario implementar una nueva estrategia para el control de vectores, mediante la utilización de mosquitos alterados genéticamente refractarios a la infección con *P. vivax*, pero antes de liberar los mosquitos alterados genéticamente es necesario determinar el flujo de genes en poblaciones de campo y la situación ecológica de los focos endémicos.

Williams et al. (1990) desarrolló una técnica para determinar polimorfismo en el DNA utilizando iniciadores únicos de 10 pares de bases de secuencia arbitraria. Esta técnica se le denominó: DNA polimórfico amplificado aleatoriamente y se basa en la reacción en cadena de la polimerasa (siglas en inglés RAPD-PCR). Esta técnica es una

herramienta útil para estudiar la estructura genética de poblaciones de diversos organismos incluyendo los insectos. Esta técnica es rápida, fácil de realizar en casi cualquier laboratorio y no utiliza productos radioactivos. La técnica de RAPD requiere pequeñas cantidades de DNA, no se necesita información posterior de secuenciación y revela gran cantidad de polimorfismo. Marcadores RAPD han sido probados en una gran variedad de insectos como áfidos, coleópteros y mosquita blanca (Black, et al., 1992; Gawel, et al., 1993; Brown, et al., 1997). Algunos grupos de la familia culicidae han estado sujetos a estudio mediante el patrón de bandas de RAPD-PCR para diferenciar especies y poblaciones de *Aedes (Stegomia) scutellaris* (Kambhampati, et al., 1992), y también fue utilizada esta técnica para distinguir poblaciones geográficas de especies del grupo *Stegomia Aedes aegypti aegypti* versus *Ae. aegypti formosus* (Ballinger-Crabtree et al., 1992). Mediante esta técnica molecular se logró diferenciar exitosamente a las dos principales especies transmisoras de malaria en África: *An. gambiae* y *An. urabiensis*, pertenecientes al complejo *An. gambiae*. Para este estudio se tamizaron 57 primers de los cuales solo se seleccionaron 13 (Wilkerson, et al., 1993). También se usó la técnica de RAPD-PCR para determinar la estructura genética poblacional de *Ae. albifasciatus* en Argentina (De Sousa, et al., 1999).

IMPORTANCIA DEL ESTUDIO

Anopheles albimanus es una especie neotropical considerada como el vector primario de paludismo en bajas elevaciones, especialmente en las costas de ambos océanos en México, Centroamérica, el norte de Sur América y el Caribe (Rodríguez y Loyola, 1989; Frederickson, 1993). Las poblaciones de *An. albimanus* localizadas en esta extensa área muestran diferencias en su ecología larvaria, comportamiento de picadura, tasas de infección con *P. vivax*, resistencia a insecticidas, pero se desconoce si la población de esta especie manifiesta flujo de genes continuo a lo largo de su distribución geográfica o si existe algún tipo de restricción y dónde se presenta. El conocimiento del flujo de genes, una indicación del intercambio de individuos entre poblaciones, es importante para entender los patrones de dispersión del paludismo, es decir, la dinámica de transmisión del mismo. Con el conocimiento del flujo de genes se podrá determinar la velocidad de dispersión de genes por ejemplo genes de resistencia a insecticidas y susceptibilidad a *P. vivax*.

La rápida diseminación de cepas multi-resistentes a los medicamentos de parásitos de paludismo humano (Schapira et al., 1993) y resistencia a insecticidas de los vectores de paludismo (Raymond et al., 1991), resalta la necesidad de desarrollar nuevos métodos de control más eficientes. Una estrategia podría ser reemplazar las poblaciones de mosquitos de campo, con poblaciones de la misma especie alterados genéticamente incapaces de transmitir el parásito *Plasmodium*, utilizando para este propósito la manipulación genética de los vectores. Sin embargo, antes de la ejecución de una estrategia de este tipo, es necesario determinar el flujo génico entre poblaciones de campo y, se debe determinar si

existen barreras geográficas que impidan el libre movimiento de mosquitos (Slatkin, 1987). La estimación del flujo de genes se realiza por métodos directos e indirectos. Dentro de los métodos indirectos se encuentra la técnica molecular DNA polimórfico amplificado arbitrariamente (RAPD).

El propósito de este estudio fue determinar la magnitud del flujo de genes en poblaciones vecinas en el estado de Chiapas bajo diferentes condiciones de habitat larvario, uso del suelo, aplicación de insecticidas y disponibilidad de hospedero. También se determinó el flujo génico entre diferentes estados de la República los cuales comprende desde el estado de Chiapas hasta Sinaloa por la vertiente del pacífico, mientras que la vertiente del atlántico comprende una localidad de la Selva Lacandona y de Tabasco utilizando marcadores genotípicos obtenidos por medio de la técnica RAPD-PCR.

ANTECEDENTES

Genética de Poblaciones.

Todos los organismos viven, se reproducen y mueren. Sin embargo, no son los individuos los que evolucionan sino las poblaciones. La evolución es el cambio en la frecuencia de genes que ocurren en un grupo de genes en una población con el tiempo. Por lo tanto, la herencia es la relación entre la vida de los organismos y la evolución de las poblaciones (Audesirk y Audesirk, 1993).

Todas las células de los organismos contienen un depósito de información genética, codificada en el DNA. Un gen es un segmento de DNA ubicado en un lugar específico de un cromosoma. Su secuencia de nucleótidos codifica la secuencia de aminoácidos de una proteína que por lo general, es una enzima que cataliza una reacción específica en la célula. Secuencias de nucleótidos ligeramente diferentes en un sitio determinado del gen, denominados alelos, generan diferentes formas de la misma enzima. Por lo regular, hay dos o más alelos de un sólo gen. El individuo que tiene alelos del mismo tipo es homocigoto y el que los posee de diferente tipo es heterocigoto. Los alelos específicos que tienen los cromosomas de un organismo (su genotipo) establecen sus características físicas y conductuales (su fenotipo) al interactuar con el ambiente (Klug y Cummings, 1996).

La genética de poblaciones, es el estudio de la variación genética en poblaciones naturales y los factores que influyen esta variación. Entendiendo la variación genética en poblaciones de vectores, se puede entender el papel del vector sobre la epidemiología de la enfermedad. Los factores que provocan la variación genética en especies vectoras también influyen en la variación de la capacidad vectorial y características de la competencia

vectorial (Tabachnick y Black, 1994). La rama de la genética llamada genética de poblaciones, tiene que ver con la frecuencia, distribución y herencia de alelos en las poblaciones (Klug y Cummings, 1996). Una población es un grupo de individuos que se cruzan entre sí libremente en un área restringida (Winchester, 1985). Las poblaciones son dinámicas, ellas pueden crecer y extenderse, o contraerse y desaparecer por medio de cambios en las tasas de nacimientos o muertes. Ellas pueden también cambiar por migración o por unirse con otras poblaciones. Cambios en la organización, localización y tamaño de la población pueden llevar a cambios en la estructura genética de la población (Klug y Cummings, 1996). El grupo de información genética que contienen todos los miembros de la población que se entrecruzan se conoce como grupo de genes (gene pool).

Una práctica utilizada para el estudio de la estructura genética poblacional es la medición de la frecuencia de un alelo determinado que controla una característica conocida. Esto es posible una vez que se establece el modo de herencia y el número de diferentes alelos presentes en la población. La frecuencia de alelos no puede ser siempre medida directamente debido a que en muchos casos, se pueden observar sólo los fenotipos, pero no los genotipos. En el caso de que los alelos son expresados como codominantes, los fenotipos son equivalentes a los genotipos, y las frecuencias alélicas pueden ser medidas directamente. Tal es el caso de la herencia autosomal de los grupos sanguíneos MN en humanos. Si uno de los alelos fuera recesivo, los heterocigotes no serían fenotípicamente idénticos a los individuos dominantes homocigotos, y la frecuencia de los alelos no podría ser directamente determinada. En tales casos los genetistas de poblaciones utilizan métodos matemáticos para determinar la frecuencia alélica y predecir la aparición de caracteres específicos en una población. Uno de los instrumentos matemáticos más útiles

es conocido como el principio de Hardy-Weinberg. Este principio fue desarrollado en 1908 por un matemático inglés Godfrey H. Hardy y un médico alemán, Wilhelm Weinberg. Básicamente, sostiene que: "En una población larga con apareamiento aleatorio la frecuencia de genes y genotipos permanecerán constantes de una generación a otra generación, en la ausencia de selección, migración y mutación,". La ley de Hardy-Weinberg es uno de los conceptos fundamentales en genética de población. Las frecuencias de alelos en una población permanecerán constantes durante muchas generaciones sólo si se cumplen las siguientes condiciones: (1) no debe haber mutación; (2) no debe haber flujo de genes, no debe haber migración neta de alelos hacia adentro o fuera de la población, y la deriva génica debe ser aleatoria. (3) La población debe ser infinitamente larga, (4) el apareamiento debe ser al azar, (5) todos los genotipos son igualmente viables y fértiles, deben reproducirse, sin selección natural. Tales condiciones rara vez, si no es que nunca, se cumplen en la naturaleza. Entender por qué no se cumplen nos lleva a comprender los mecanismos de la evolución (Klug y Cummings, 1996).

Mecanismos de micro evolución.

Las cinco causas principales para el cambio evolutivo dentro de una población son: mutación, flujo de genes (migración), deriva génica, apareamiento no aleatorio y selección natural.

Mutación: Es la fuente fundamental de la variabilidad genética. Las células tienen mecanismos eficientes que protegen la integridad de sus genes. Existen enzimas que examinan al DNA constantemente reparando los defectos causados por la radiación, el daño químico o los errores en el copiado. No obstante pueden suceder cambios en la secuencia

nucleotídica. Estos cambios son las mutaciones. Algunos cambios en el DNA casi no tienen efecto en el organismo, pero es probable que la mayor parte, son dañinos y unos cuantos pueden ser benéficos o ayudar al organismo a enfrentar ambientes nuevos o diferentes. Las mutaciones actúan para crear nuevos alelos.

Flujo de genes (migración): Frecuentemente las especies de plantas o animales se dividen en subpoblaciones que en cierta medida están geográficamente aisladas. Diferencias en la tasa de mutación y presión de selección pueden establecer diferentes frecuencias alélicas en las subpoblaciones. La migración ocurre cuando los individuos se mueven entre estas poblaciones. La migración puede ser registrada como el flujo de genes entre dos poblaciones que estuvieron aisladas, pero ahora están en contacto (Slatkin, 1987; Klug y Cummings, 1996).

Los movimientos migratorios de ciertos individuos de una población a otra y que dejan descendencia fértil producen flujo de genes entre poblaciones. En biología la palabra migración tiene dos significados diferentes. En el contexto más conocido la palabra migración se refiere al movimiento estacional de muchas especies entre los terrenos veraniegos de reproducción y los refugios invernales. Sin embargo en biología evolutiva, la migración es el flujo de genes entre poblaciones.

El flujo de genes disemina alelos provechosos a la especie. Si suponemos que surge un alelo nuevo en una población y que éste beneficia a los organismos que lo poseen. La migración puede llevar este alelo nuevo a otras poblaciones de la especie. El flujo de genes ayuda a mantener a todos los organismos en una región extensa como una especie. Si los

migrantes llevan constantemente genes de una población a otra entonces las poblaciones nunca podrán desarrollar diferencias significativas en las frecuencias de alelos. El flujo de genes se define como el número promedio de migrantes entre poblaciones por cada generación (Slatkin, 1987).

Cuando dos poblaciones difieren en la frecuencia de genes e intercambian migrantes, la frecuencia génica en cada población cambiará dependiendo de la proporción de individuos migrantes. Si una población de individuos *AA* recibe inmigrantes de una población de individuos *BB*, la frecuencia de *A* declinará dependiendo en el número de inmigrantes *BB*. Si las dos poblaciones intercambian migrantes continuamente, la migración causará que las dos poblaciones tengan similar frecuencia génica (Tabachnick y Black, 1994).

La proporción de migrantes relativo al total de la población es llamada tasa de migración (*m*). La tasa de migración determina que tan rápido la migración causará que la población llegue a ser genéticamente similar. El parámetro *m* es importante, para artrópodos vectores de enfermedades debido a que éste estima el potencial para la diseminación de un patógeno por un artrópodo de una población a otra (Tabachnick y Black, 1994).

La relación entre el valor de Nm y F_{st} es como sigue (Sork et al., 1998).

Relación entre F_{ST} y N_m .

N_m	F_{ST}	Explicación
0.025	0.50	Extremadamente alta diferenciación entre subpoblaciones
0.5	0.33	Muy alta diferenciación entre subpoblaciones
1	0.2	Gran diferenciación entre subpoblaciones
2	0.11	Moderada diferenciación entre subpoblaciones
4	0.06	Baja o moderada diferenciación entre subpoblaciones

Deriva génica: Una de las suposiciones de la ley de Hardy-Weinberg es el tamaño infinito de la población. Las poblaciones pequeñas están sujetas a cambios aleatorios en la frecuencia de alelos. Es mucho más probable que los sucesos fortuitos cambien la frecuencia de alelos en una población pequeña que en una grande, debido a un proceso llamado deriva génica. Dos casos especiales de deriva génica llamados población con efecto de cuello de botella y efecto fundador, ilustran aun más las enormes consecuencias que puede tener el tamaño pequeño de la población en las frecuencias de alelos de una especie.

Cuello de botella es cuando una especie se reduce drásticamente su tamaño poblacional, de tal forma que solo unos pocos individuos proporcionan genes a la población total futura. La población que pasa por un cuello de botella puede resultar en diferencias en la frecuencia alélica y reducción en la variabilidad genética. Aun y cuando la población abunda y la especie llega a ser común, estos efectos genéticos del cuello de botella pueden permanecer por cientos o miles de generaciones (Audesirk y Audesirk, 1993).

El efecto fundador es un caso especial de cuello de botella en el cual colonias aisladas se establecen por un pequeño número de individuos. Si el aislamiento de la población fundadora se mantiene por largo periodo de tiempo, la nueva población que se desarrolle en esa área diferirá grandemente de la población original (Audesirk y Audesirk, 1993).

Apareamiento no aleatorio: El apareamiento dentro de una población casi nunca es aleatorio. Es raro que los organismos se apareen al azar. Entre los animales hay tres formas comunes de apareamiento no aleatorio: la reproducción tipo harén, el apareamiento discriminado y la selección sexual.

Selección natural: La selección natural es un proceso en el cual ciertos organismos de una población particular ante las condiciones cambiantes del medio ambiente, son seleccionados de acuerdo a la suma de sus adaptaciones. La selección natural es el mecanismo más importante en la evolución de las especies.

Hay tres tipos de selección natural:

1. La selección direccional. Los individuos con características que son diferentes del promedio en una dirección (por ejemplo, más pequeños) se ven favorecidos en comparación con los individuos promedio y los que difieren del promedio en la dirección opuesta.

2. Selección estabilizadora. Los individuos de "valor promedio" para una característica se ven favorecidos sobre los individuos de valores extremos.

3. Selección disruptiva. Los individuos de características extremas se ven favorecidos sobre los individuos con valores promedio.

La selección natural ocurre como resultado de las interacciones de los organismos con las partes bióticas (viviente) y abiótica (no viviente) de sus ambientes. Cuando dos o más especies interactúan estrechamente como para ejercer presiones selectivas mutuas durante largos períodos, ambas evolucionan como respuesta a ello. Dicha co-evolución puede ocurrir como resultado de cualquier tipo de relación entre organismos, incluidas la competencia, la relación depredador-presa y la simbiosis (Audesirk y Audesirk, 1993).

Propiedades de los marcadores RAPD

Los marcadores genéticos amplificados por la técnica DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD) puede ser usada para la identificación de diversidad genética entre poblaciones conespecíficas de algunas especies. Es un método simple y rápido utilizado para generar marcadores genéticos y patrón de huellas genéticas, con la ventaja de que no se requiere conocimiento del genoma bajo investigación. Las condiciones de amplificación de RAPD difieren de la PCR standard en que únicamente se emplea un único iniciador aleatorio. RAPD es utilizado para amplificar DNA molde sobre la base que el genoma nuclear contiene varios sitios complementarios al iniciador, cercanos uno de otro en orientación invertida. Como los iniciadores se unen en la cadena a diferentes distancias, esto trae como consecuencia la amplificación de segmentos del DNA de longitud variable. RAPD-PCR utiliza un primer de 10 pb de secuencia aleatoria con un mínimo contenido de GC de 60 % para amplificar muchas regiones en el genoma simultáneamente (Williams et

al., 1990). Durante la reacción de RAPD-PCR, el primer se alinea al DNA genómico molde a baja temperatura (35 – 36°C). En teoría el primer se alinea a muchas regiones del genoma simultáneamente. Sin embargo, sólo ocurre la amplificación geométrica en aquellas regiones en las cuales al final del 3' de la cara del primer alineado el uno al otro sobre la cadena contraria no es separadas a más de 3 kb. Estas condiciones sugieren que los sitios del alineamiento del primer pueden ser inversiones repetidas (Tabachnick y Black, 1994).

Los polimorfismos en regiones amplificadas por RAPD-PCR son típicamente manifestadas como la presencia o ausencia de una banda en geles de electroforesis del material amplificado entre individuos. Muchos estudios han mostrado que la mayoría > 90% de las bandas amplificadas por RAPD-PCR son heredadas en forma Mendeliana como alelos dominantes. Esto significa que un individuo que manifiesta la banda puede poseer dos copias (homocigoto dominante) o una sola copia (heterocigoto dominante) del alelo amplificable de un locus RAPD. El individuo homocigoto recesivo no manifiesta la banda. La dominancia de la mayoría de los alelos RAPD-PCR presentan un problema para estudios de genética de poblaciones. Los patrones de apareamiento en las poblaciones no pueden ser estudiados, porque para probar el equilibrio Hardy-Weinberg se requiere de la identificación de ambos alelos en un locus. Si hacemos la suposición de que una población está en equilibrio Hardy-Weinberg, entonces la frecuencia del alelo recesivo (q) puede ser calculado como la raíz cuadrada de la frecuencia del homocigoto recesivo individual (q^2) (no banda) (Apóstol et al., 1996). Con esta suposición todas las técnicas que utilizan frecuencias alélicas pueden ser aplicadas a estudios de variación de RAPD-PCR (Tabachnick y Black, 1994). Muchos de los análisis en la genética de poblaciones son de

diferenciación espacial (FST de Wrights y distancia genética), pueden ser aplicados a los marcadores RAPD (Lynch y Milligan, 1994; Black, 1996; Apóstol et al., 1996). Los RAPD-PCR han sido criticados por la falta de reproducibilidad (Black, 1993). Sin embargo, este problema puede ser superado con la cuidadosa estandarización de la técnica, reactivos y proveedores de reactivos. La facilidad con la cual se puede encontrar polimorfismo se ve balanceado con la frecuencia con la cual aparecen artefactos. Se menciona que la razón de la ocurrencia de estos artefactos es por el uso de primers extremadamente cortos para la amplificación del DNA (Favia et al., 1994).

Los marcadores RAPD se caracterizan por ser rápidos en la detección de marcadores, de hecho se obtienen de 50 -60 marcadores de DNA polimórficos en 4 -5 reacciones de PCR. Otra ventaja es que la identificación no radioactiva de los productos, velocidad (un grupo de 50 - 60 insectos pueden ser analizados dentro de 24 -48 h), y la capacidad para llevar a cabo el procedimiento sin ninguna información previa de la secuencia. El análisis de los marcadores RAPD ha sido tradicionalmente realizado en geles de agarosa al 1.2 -1.5% con bromuro de etidio (Apóstol et al., 1993, Apóstol et al., 1996).

Algunas de las desventajas de los RAPD, es la dificultad de distinguir muchos de los polimorfismos aparentes usando esta técnica a partir de artefactos de PCR. La PCR no siempre es un proceso preciso que proporciona exactamente el mismo resultado. A veces la menor diferencia en la calidad del DNA molde, causan diferencias en un producto particular de individuo a otro. Debido a que algunos de los resultados RAPD se hacen a partir de la evidencia negativa (la falta de una banda en el gel), es crítico el preciso control de las condiciones de amplificación para la interpretación confiable del resultado.

También, la ausencia de un producto en una reacción particular puede ser causado por diferencias genómicas, como sustitución nucleotídica en uno a ambos sitios de primers, desigualdad de recombinación o replicación entre los sitios creados, a lo largo de una inserción que no se amplificó bien, o inversiones en el sitio de unión del primer (Wilkerson et al., 1993; Favia et al., 1994).

Por último, loci homólogos son muy difíciles de identificar, haciendo que los RAPD dificulten el uso de comparaciones interpoblacionales o interespecíficas. Este problema puede ser resuelto mediante la clonación y secuencia del producto RAPD-PCR, y usando un rediseño de primer, locus-específico para amplificar un locus homólogo a partir de otros individuos o especies (Wilkerson et al., 1993).

Ejemplos del Uso de RAPD-PCR

Desde sus inicios el uso de la técnica RAPD-PCR ha creado polémica por la falta de reproducibilidad, sin embargo con esta técnica se han realizado trabajos como a continuación se exponen:

La técnica se utilizó exitosamente para diferenciar las dos principales especies del complejo *An. gambiae*. Se aplicó la técnica de RAPD-PCR para diferenciar a *An. gambiae* s.s. y *An. arabiensis*, mediante un tamizaje inicial de 57 primers, que produjeron 377 bandas, de las cuales 295 fueron diferentes entre las dos especies. Sobre la base de reproducibilidad, interpretabilidad y simplicidad, se escogieron sólo 13 primers para análisis posteriores del DNA, utilizando 30 individuos de cada especie. Finalmente se escogieron 7 primers que produjeron bandas diagnósticos (Wilkerson et al., 1993)

En otro estudio se realizó un análisis genómico a las dos principales especies transmisoras de malaria del complejo *An. gambiae* que son *An. gambiae* s.s. y *An. arabiensis*. Se utilizaron 80 diferentes primers, de los cuales cerca de la mitad fueron capaces de detectar polimorfismo. La otra mitad de los primers no amplificaron o produjeron un patrón de bandas idénticas. Con estos primers seleccionados se logró obtener 60 segmentos diferentes del DNA, que fueron diferentemente amplificados en diferentes cepas de *An. gambiae* s.s. y *An. arabiensis* (Favia et al., 1994).

Anopheles darlingi fue sujeto a análisis con el propósito de determinar si estaba constituido de un complejo de especies. Para ello, se utilizó análisis de isoenzimas, marcadores RAPD y marcadores ITS2 (internal transcribed spacer 2). Los resultados mostraron que la población de *An. darlingi* procedente de Belice en Centro América, y Bolivia, Brasil, Colombia, Guyana Francesa, Perú y Venezuela en Sur América, demostraron similaridad genética, que es consistente con la existencia de una sola especie y se sugirió que el flujo de genes es continuo a través del rango geográfico de esta especie (Manguin et al., 1999).

Utilizando RAPD-PCR se logró diferenciar 4 especies del complejo de especies *An. (Nyssorhynchus) albitarsis*. Los ejemplares se obtuvieron del sur de Brasil, Paraguay, y norte de Argentina. Para ello se realizó primeramente un tamizaje de 65 iniciadores o primers de los cuales se identificaron 12, que produjeron 19 marcadores genéticos específicos de especie y 4 marcadores comunes a 2 o más especies. Los resultados de este

estudio mostraron que los RAPD-PCR son una herramienta útil para caracterizar complejos de especies hermanas (Wilkerson et al., 1995).

Se han realizado intensos estudios con el vector del dengue y fiebre amarilla *Ae. aegypti*. En un estudio con este vector de dengue se diferenciaron genéticamente mediante RAPD las subespecies *Ae. aegypti aegypti* de *Ae. aegypti formosus* indicando que la técnica de RAPD puede ser útil en estudios de taxonomía molecular de artrópodos y en estudios epidemiológicos sobre la relación que existe entre poblaciones separadas geográficamente y movimiento de vector (Ballinger-Crabtree et al., 1992).

Otro ejemplo sobre el uso de RAPD en Aedinos fue el trabajo realizado en poblaciones de *Ae. albifasciatus*, principal vector de virus de encefalomielitis equina del oeste, en 6 poblaciones de Argentina Central. Se encontró un rango de heterosis esperada entre 0.19 y 0.31, el cual es un valor ≈ 3 veces mayor al obtenido por 16 aloenzimas estudiadas previamente ($H_e = 0.069 \pm 0.024$) (De Sousa et al., 1996). La tasa efectiva de migración entre las poblaciones, estimada a partir de valores de F_{ST} , presentó un rango de 2.3 a 9.0. En este mismo estudio utilizaron sólo dos primers, que produjeron 28 loci presuntivos (De Sousa et al., 1999). En otro estudio realizado en Puerto Rico con *Ae. aegypti*, se encontró un promedio de heterocigosis de $H_e = 0.354$ con 57 loci presuntivos RAPD, mientras que con 11 isoenzimas se detectó una heterosis más baja con un valor de $H_e = 0.163$, el valor de N_m (tasa efectiva de migración) tuvo un rango de 9.7 a 12.2 indicando alta tasa de dispersión (Apóstol et al., 1996).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En Chiapas están presentes diversos hábitats a lo largo del plano costero con diversos usos del suelo y aplicación de insecticidas. Las poblaciones de *Anopheles albimanus* en época de seca se restringen a charcas permanentes en los esteros y los criaderos tierra adentro permanecen aislados de estas poblaciones. En la época de lluvia las poblaciones de *An. albimanus* se incrementan producto de la formación de nuevos criaderos provocando probablemente que las poblaciones se mezclen libremente.

Anopheles albimanus se distribuye en México en la vertiente del pacífico y del Atlántico, desde Chiapas hasta Sinaloa y desde Tamaulipas hasta la península de Yucatán. A lo largo de su distribución geográfica existen áreas endémicas al paludismo, mientras que en otras el paludismo es raro.

HIPÓTESIS

No existe ninguna barrera para el libre flujo de genes a lo largo del plano costero ni entre poblaciones de diferentes altitudes ni entre mosquitos criados en diferentes hábitats. A lo largo de su distribución geográfica existe un continuo flujo de genes entre los diferentes estados de la República mexicana, debido a que no hay barreras geográficas ni de comportamiento del vector que impidan el libre flujo de migrantes, lo que favorece la existencia de una sola población panmítica.

OBJETIVO GENERAL

Utilizando marcadores RAPD en hembras adultas de *An. albimanus* se determinó la tasa efectiva de migración Nm o patrón del flujo genético y la variabilidad genética mediante los valores de F_{ST} , en el ámbito microgeográfico en el sur de Chiapas y en el ámbito nacional en México.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Se colectaron *An. albimanus* en 20 localidades en un área aproximada de 250 km desde la frontera con Guatemala hasta 250 Km al noreste del sur de Chiapas. Se escogieron de dos o cinco localidades situadas dentro de diferentes agroecosistemas Área de Banano, Cultivos Mixtos, Reserva Ecológica, Caña de Azúcar y Ganadero.

Se colectaron mosquitos de *An. albimanus* en el ámbito macrogeográfico en 9 localidades comprendidas en 8 estados de la República mexicana que son: Chiapas (plano costero y Selva Lacandona), Oaxaca, Colima, Guerrero, Nayarit, Jalisco, Sinaloa, Tabasco, y La Palmilla, Guatemala CA.

Se determinó el flujo génico (Nm) y los valores de F_{ST} entre localidades, áreas agroecológicas y estados de la República mexicana.

Se determinaron las distancias genéticas entre localidades, agroecosistemas y estados de la República mexicana y se representaron por medio de dendrogramas.

MATERIAL Y METODOS

A. Colecta de mosquitos en Chiapas.

Hembras adultas de *An. albimanus* fueron colectadas en corrales de ganado, alimentadas con sangre humana o de conejo y una vez grávidas se les colocó en recipientes individuales para obtener las larvas F1 y criarlas por familias en condiciones estándares de insectario (Gerberg et al., 1994). Las capturas se hicieron en 20 localidades separadas entre 4 a 20 km, localizadas desde la frontera con Guatemala hasta 200 km al noroeste y desde el nivel del mar hasta 50 km tierra dentro.

Área de estudio. El área de estudio comprende desde la frontera de México con Guatemala (14° 33' N, 92° 13' O) hasta aproximadamente 180 km al noroeste (15° 43'N, 93° 29'O). Se seleccionaron 20 localidades que en estudios previos fueron positivas a la presencia de *An. albimanus*. El área de estudio fue dividida en cinco agro-ecosistemas de acuerdo al uso del suelo y aplicación de insecticidas en la agricultura: 1) Banana, 2) cultivos mixtos (mango, soya, ajonjolí, y maíz), 3) Reserva ecológica, 4) caña de azúcar y 5) ganado (Fig 2.1). Se utilizaron entre dos a cinco localidades por cada área, equivalente a treinta a cincuenta mosquitos adultos F1 por agro-ecosistema. Los adultos F1 de 1 día de edad fueron almacenados a -70 ° C. Todos los adultos utilizados para las pruebas moleculares fueron de diferentes hembras de campo.

B. Colecta de mosquitos en México

Se realizaron colectas en diferentes estados de la República mexicana, en localidades situadas el litoral Pacífico que son: Río Arriba, Chiapas; Puerto Ángel, Oaxaca; Cayucan, Guerrero; Colomo, Colima; Barra Navidad, Jalisco; San Blas, Nayarit;

Topolobampo, Sinaloa; por el Litoral Atlántico San Pedro Balancán, Tabasco; y entre ambos litorales y por ser un área de alta transmisión del paludismo se escogió Benemérito de las Américas en la Selva Lacandona, Chiapas y “La Palmilla” en Guatemala C.A (Fig. 2.1, Cuadro 2.1). Para la captura de los mosquitos se utilizaron cilindros de plástico de 30 cm de diámetro y 20 cm de alto, cubiertos en la parte superior con malla fina o jaulas de aluminio de 45 cm³ cubierta de malla metálica. Las capturas de mosquitos se realizaron alrededor de corrales en un horario de 19:00 a 23:00 hrs, sin alimentación sanguínea preferentemente. Aquéllas que presentaron sangre en su abdomen, al momento de la captura se les colocó un algodón húmedo con agua azucarada al 10 %, durante dos días para permitir el metabolismo de la sangre. Los métodos empleados fueron el cebo humano intra y peri, corrales y trampa caballo (Service, 1976). Las hembras después de colocarlas en viales individuales y su debida etiqueta, se trasladaron en nitrógeno líquido al Centro de Investigación de Paludismo en Tapachula, Chiapas donde posteriormente se almacenaron a – 70 ° C hasta su procesamiento.

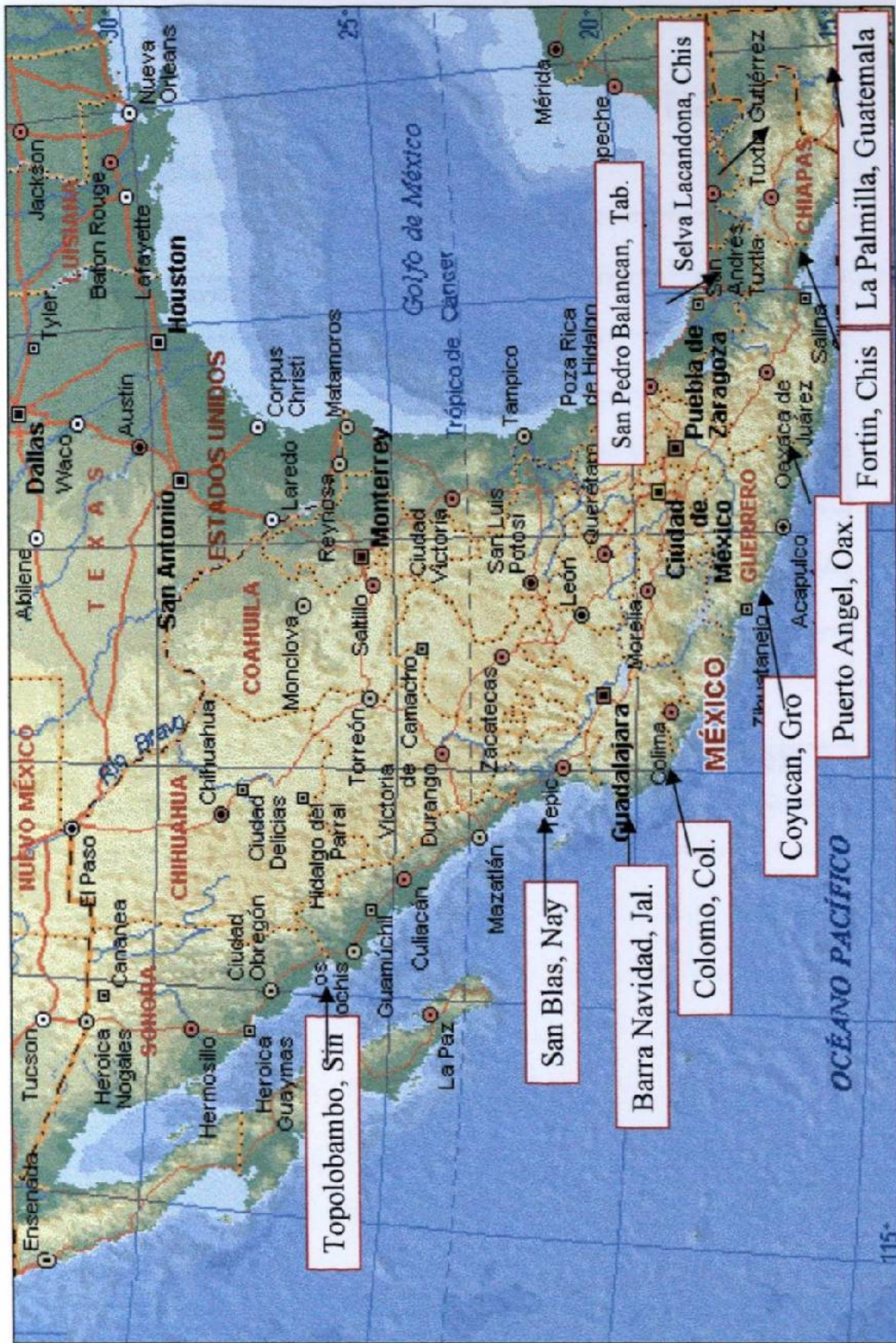


Fig 2.1. Área de estudio para determinar el flujo de genes en *Anopheles albimanus* en el ámbito macrogeográfico en México.

Cuadro 2.1. Localidades de colecta de *Anopheles albimanus* en el ámbito nacional y sus coordenadas.

Localidad	Estado	Latitud Norte	Longitud Oeste
Topolobampo	Sinaloa	25° 36'	109° 03'
San Blas	Nayarit	21° 32'	105° 17'
Barra Navidad	Jalisco	19° 11'	104° 41'
Colomo	Colima	19° 02'	104° 16'
Cayucan	Guerrero	17° 11'	100° 05'
Puerto Ángel	Oaxaca	15° 39'	96° 28'
Río Arriba	Chiapas	15° 08'	92° 43'
San Pedro Balancán	Tabasco	17° 45'	91° 08'
Benemérito (Selva Lacandona)	Chiapas	16° 30'	90° 38'
La Palmilla	Guatemala	14° 52'	89° 22'

Extracción de DNA

Adultos individuales fueron macerados y aislado su DNA como fue descrito por Coen et al. (1982) modificado para mosquitos por Black y Munstermann (1994), como se detalla a continuación:

1. Se colocó el mosquito en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, y con 25 μ l de buffer de extracción (NaCl 0.1M, Sacarosa 0.2M, Tris-HCl pH 9.1, EDTA 0.05M, SDS 0.005). Se maceró uniformemente el mosquito con un pistilo utilizando una punta adecuada al fondo del tubo, hasta que quedó totalmente molido, sin partes reconocibles. Se colocó 25 μ l más de buffer de extracción, limpiando el pistilo.
2. Se centrifugó por 30 segundos para concentrar los restos al fondo del tubo.
3. Se incubó el tubo con el homogeneizado a 65°C por 30 minutos.
4. Mientras los tubos todavía están calientes, se agregó a cada uno 7 μ l de Acetato de Potasio 8M.
5. Se incubó en hielo como mínimo 30 minutos, para precipitar el SDS del buffer de extracción.
6. Se centrifugó a 14,000-17,000 xg por 15 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf nuevo y estéril, procurando no llevar nada del precipitado de SDS (Es preferible centrifugar a 4°C).
7. Se agregó al sobrenadante 100 μ l de ETOH 100%, incubando inmediatamente después en hielo por 5 minutos. OPCIONAL: Puede suspenderse el proceso en este punto, conservando los tubos a -20 °C toda la noche. Centrifugar a 14,000-17,000 xg por 15 minutos.

8. Se retiró cuidadosamente el etanol y se agregaron 100 µl de ETOH al 70%. Se lavó y centrifugó por 5 minutos. Se retiró cuidadosamente el etanol. EL DNA precipitó en los lados y el fondo del tubo, y se observó como una mancha blancuzca. Se adicionaron 100 µl de etanol 100%, y se lavó y centrifugó por 5 minutos.
9. Se retiró el etanol absoluto y agregaron 100 µl de etanol al 70%, lavar por última vez y descartar el etanol con cuidado. Por ultimo se secó totalmente la humedad del tubo en un termoblock por aproximadamente por 30 minutos a 42°C.
10. Resuspender la pastilla de DNA en 300 ul de TE pH 8.0 durante un mínimo de 12 horas a 4°C. Con este protocolo el DNA permanece estable hasta por más de 6 meses. La pastilla de DNA fue resuspendida en 300 µl de TE (0.05 M Tris- HCL, EDTA pH 8.0), y se mantuvo a 4 ° C.

Amplificación del DNA

Con algunas modificaciones la reacción de RAPD-PCR se realizó como fue descrito por Black y Du Teau (1997). Se preparó la mezcla de reactivos para 12 individuos (volumen total de 50 µl). En tubos de 1.5 ml eppendorf, se añadió 447.6 µl de ddH₂O; 60 µl de buffer de PCR 10X (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 9.0, 15 mM MgCl₂, 0.1% gelatina (peso/vol) y 1 % Triton X-100), 6 µl de dNTPs (20 mM de dATP, dCTP, dGTP, dTTP, Gibco, BRL, Life Technologies Alameda Calif); 12 µl del iniciador de 10 bases (concentración final 50 pmol/µl) (de Operon Technologies, Alameda, Calif). Los tubos se colocaron en el transiluminador por 10 min para destruir contaminantes, después se le adicionó 2.4 µl de *Taq* DNA polimerasa equivalente a 1 U (Perkin Elmer Norwalk, CT), y se vertieron 49 µl en tubos de 0.2 ml, posteriormente se adicionó 1 µl de DNA molde. En

todas las reacciones se colocó un control negativo que contenía todos los componentes excepto el DNA molde.

Condiciones de la PCR

Las muestras se incubaron en una termociclador Gene Amp 9600 (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT) las temperaturas fueron: 1 min a 95 °C como primer paso de desnaturalización, cuarenta y cinco ciclos de 1 min a 92 °C (denaturalización), 1 min de 35 °C (alineación) y 2 min a 72 °C (elongación), el tiempo de rampa desde la alineación a la elongación fue 1°C /8 seg. Se programó una elongación final de 7 min a 72 °C, y los productos amplificados se almacenaron a 4 °C.

Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de la amplificación se analizaron en geles de agarosa 1.5 % con 0.8 µg/ml bromuro de etidio, se corrieron a 65V por cerca de 6 hr, se visualizaron con luz UV (312 nm). 1 Kb fue utilizado como marcadores de peso molecular provistos por Gibco BRL, Life Technologies, Alameda Calif.

Iniciadores Oligonucleotidos

Los iniciadores utilizados fueron de 10 bases en longitud de Operon Technologies (Alameda, CA). Cada grupo de 20 iniciadores del A, B y C se suspendieron en agua destilada a una concentración final de 50 pmol/µl y fueron almacenados a -20 °C. Para el estudio en Chiapas se seleccionaron los primers: A05 (5' AGGGGTCTTG 3'), A20 (5' GTTGCGATCC 3'), B04 (5' GGACTGGAGT 3'), B11 (5' GTAGACCCGT 3') y B18 (5'

CCACAGCAGT 3') y en el estudio en el ámbito macrogeográfico se utilizaron los siguientes primers: A05, A08 (5'GTGACGTAGG3'), A12 (5' TCGGCGATAG 3'), A19 (5' CAAACGTCGG 3'), A20, B04, y B11.

Análisis estadístico

Los productos amplificados se registraron directamente de la fotografía de los geles. La presencia/ausencia de los marcadores dominantes se designaron como 1/0 respectivamente. Se realizaron los cálculos de F_{ST} y tasa efectiva de migración (Nm) dentro de los agroecosistemas y entre localidades utilizando tres diferentes metodologías: Wright (1931), Weir y Cockerham (1984) y Lynch y Milligan (1994). La F_{ST} y Nm fueron calculados utilizando el programa RAPDFST 4.0.1 (Black 1996).

El análisis estadístico de los valores de F_{ST} se estimó mediante valores de contingencia chi-cuadrada = $2N F_{ST}$, con grados de libertad igual al número de subpoblaciones menos 1.

La Nm fue estimada de la ecuación: $Nm = [(1/ F_{ST}) - 1]/4$ (Wright 1931).

El programa analiza el valor de F_{ST} como:

$$F_{ST} = \text{Varianza } (p) / (\text{promedio } p (1 - \text{promedio de } p))$$

Donde p es la frecuencia de un alelo en un locus RAPD y promedio de p es la frecuencia promedio ponderada entre todas las subpoblaciones. Esta F_{ST} es el ratio de la varianza observada en la frecuencia de un alelo entre las subpoblaciones, relativa a su máxima varianza en la población total. RAPDFST computa los valores de F_{ST} para cada

locus RAPD, asumiendo que las subpoblaciones están en equilibrio Hardy-Weinberg y asumiendo dominancia en cada locus. La distancia genética de Nei (1972) y análisis Bootstrap fue realizado con el programa RAPDDIST realizando 100 replicas. Las matrices fueron analizadas con el programa NEIGHBOR en PHYLIP 3.5C utilizando el método de análisis de grupos pares no ponderados (UPGMA). Un árbol de similitud genética con el análisis bootstrap se hizo mediante el estadístico CONSENSUS de Joseph Felsenstein (1993).

RESULTADOS

A. Estudio Microgeográfico en Chiapas.

La aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa al DNA de mosquitos con oligonucleótidos únicos de secuencia de DNA arbitraria, resultó en la amplificación de una serie de fragmentos con alto polimorfismo. Oligonucleótidos iniciadores que no produjeron bandas polimórficas bien amplificadas, claramente distinguibles de sus bandas vecinas, fueron eliminados del análisis para reducir ambigüedad. De un tamizaje inicial se escogieron solo 5 iniciadores con base al criterio antes mencionado. No se escogió ningún iniciador del kit C debido a que este grupo de iniciadores amplificaron muchos segmentos difíciles de leer o por el contrario algunos de ellos produjeron pocas bandas con poco polimorfismo y por consiguiente poca información. Del kit A se escogieron dos (5 y 20) y del kit B tres (4, 11 y 18) (Cuadro 2.2). Fueron seleccionados un total de 46 loci polimórficos presuntivos, amplificados por 5 primer (Cuadro 2.2).

La distancia genética de Nei (1972) entre agroecosistemas presentó un rango 0.0078 a 0.0212 (Cuadro 2.3). La menor distancia genética entre las cinco áreas se observó entre el banano y caña de azúcar (0.0078), mientras que la mayor distancia genética fue entre banano y reserva ecológica (0.0212).

Al analizar la estructura genética poblacional de *An. albimanus* entre localidades se encontró con menor distancia genética a La Barra San José y Las Palmas (distancia genética = 0.011), ambas pertenecientes a la zona de reserva ecológica y con mayor distancia genética entre las localidades de El Fortín y El Zapotal (distancia genética = 0.109), ambas pertenecientes a la zona de ganado (Cuadro 2.4).

Los valores de F_{ST} y Nm dentro de los agroecosistemas y entre localidades se determinó mediante los tres métodos propuestos (Cuadro 2.5). El valor promedio de F_{ST} entre las 20 localidades de acuerdo al método de Wright (1931), Theta de Weir & Cockerham (1984) y F_{ST} de Lynch & Milligan (1994) fue de 0.117 (± 0.073), 0.088 (± 0.080) y 0.109 (± 0.153) respectivamente.

Al analizar la F_{ST} por agroecosistemas por los tres métodos, se encontró que los menores valores corresponden al área de reserva ecológica que son: 0.070 (± 0.84), 0.050 (± 0.115) y 0.042 (± 0.157) respectivamente. Los mayores valores de F_{ST} con los tres métodos propuestos se presentaron en le área de ganado: 0.12 (± 0.133), 0.142 (± 0.170) y 0.141 (± 0.22), respectivamente.

En general, el flujo de genes o tasa efectiva de migración (Nm), obtenida dentro de las áreas fue moderadamente bajo con rangos 1.8 a 3.3 (Wright), 1.5 a 4.7 (Weir & Cockerham), y 1.5 a 5.7 (Lynch & Milligan) (Cuadro 2.5). El mayor flujo de genes se presentó dentro del área de reserva ecológica (3.3, 4.7 Y 5.7), mientras que el menor flujo génico fue de 1.8, 1.5 y 1.5 en el área de ganado, con los tres métodos propuestos respectivamente.

Al comparar la tasa efectiva de migración entre los agroecosistemas, se presentó un mayor movimiento de individuos migrantes entre la reserva ecológica y cultivos mixtos

($Nm= 2.4$), mientras que la menor tasa efectiva de migración fue entre el área de ganado con plantaciones de banano y caña de azúcar ($Nm= 1.8$) (Cuadro 2.6).

El dendrograma por localidades muestra algunos grupos de localidades con porcentaje de consistencia $> 50\%$, que se encuentran cercanas (menos de 10 kms) son: Mareas del Suchiate y Brisas del Mar (55%), Barra San José y Las Palmas (87 %), Álvaro Obregón y Cabildo (55%) (Fig 2.2).

El análisis de Bootstrap entre agroecosistemas indicó con un 87 % de soporte que la caña de azúcar y el área de plantación de banano pertenecen a un mismo grupo con un flujo de genes continuo. En el caso de las áreas restantes el porcentaje fue bajo (35 a 45 %) indicando que el flujo de genes es en cierto punto restringido entre estas áreas (Fig. 2.3).

B. Estudio Macrogeográfico en México

En el estudio macrogeográfico se seleccionaron 7 oligonucleótidos, 5 del kit A y 2 del kit B, no se escogió ninguno del kit C (Cuadro 2.2). Se seleccionaron 51 marcadores genotípicos sobre la base de los criterios mencionados anteriormente.

Al comparar las distancias genéticas entre los estados de la República, se encontró que la mayor distancia genética se presentó entre el estado de Jalisco comparado con Chiapas (0.1975) y Tabasco (0.2079), y Guatemala (0.1499), mientras que las menores distancias genéticas se presentaron entre los estados de Guerrero y Colima (0.0203), y los estados de Chiapas y Tabasco (0.0254) (Cuadro 2.7).

El valor promedio de F_{st} entre todas las localidades fue de 0.169 (± 0.122), y con un valor de $Nm = 1.2$ mediante el método de Wright (1931) (Cuadro 2.7). El valor de Nm fue ligeramente menor con el método de Lynch y Milligan (1.1) y ligeramente mayor con el método de Cockerham (1.4). Al determinar la tasa efectiva de migración, agrupando los estados del norte y los del sur, no se observaron diferencias entre los valores de Nm entre las poblaciones del norte ($Nm = 2$) y las del sur ($Nm = 1.8$) (Cuadro 2.8).

El dendrograma de similitud genética mostró dos ramas principales en donde se observa que se agrupan los estados del norte de México en una y los del sur en la otra (Fig. 2.4). La población del estado de Jalisco se presentó separada de estas ramas de similitud genética. El análisis de Bootstrap demostró 100 % de consistencia entre los estados de Chiapas y Tabasco, y un 86 % entre los estados de Nayarit, Sinaloa, Colima y Guerrero. Otras ramificaciones fueron menores del 70 %.

DISCUSIÓN

Con el descubrimiento de complejos de especies en *Anopheles gambiae* y *An. maculipennis* en África y Europa, respectivamente se han hecho considerables esfuerzos por detectar especies hermanas en otras especies de anophelinos en el continente Americano, dentro de estas especies esta *An. albimanus*. Esto se debe a la diversidad de hábitats donde las larvas se pueden desarrollar, al mismo tiempo que exhibe alta variación fenotípica pupal (Faran, 1980). Las larvas se desarrollan desde huellas de animales hasta lagunas, con variación en temperatura y salinidad (Breeland, 1972). Este vector de paludismo ha sido sujeto a diversos estudios en la búsqueda de especies hermanas o sub-poblaciones específicas de *An. albimanus* responsables de la transmisión de paludismo, sin embargo hasta el momento no se ha logrado identificar una población críptica con hábitos antropofílicos exclusivos (Arredondo-Jiménez et al., 1992).

Se cree que *An. albimanus* se originó en algún punto de Centro América y que posteriormente las poblaciones se extendieron hasta sus límites actuales que son al norte hasta el sur de Estados Unidos de América y hacia el sur hasta la parte norte del Perú (Frederickson, 1993). Estudios previos en busca de sub-poblaciones con *An. albimanus* no se detectaron inversiones de heterocigotos en cromosomas politenos de larvas procedentes de Panamá, El Salvador, Guatemala, México y Jamaica además de ser interfértiles al realizar cópulas-cruzadas (Hobbs, 1962). En otro estudio con 11 poblaciones de Colombia utilizando isoenzimas, análisis citogenético y cópula-cruzadas se encontró que las 11 poblaciones pertenecen a la misma especie (Narang et al., 1991). En Guatemala y Centro América se analizaron poblaciones de campo mediante espaciadores intergénicos del DNA

ribosomal nuclear, y se encontró que existen barreras para el libre flujo de genes entre las poblaciones del Pacífico y el Atlántico (De Mérida et al., 1995). Posteriormente se estudió la variación del DNA mitocondrial entre poblaciones de varios países y dentro de Guatemala. La frecuencia de haplotipos fue similar entre poblaciones del norte y sur de Guatemala, poblaciones cercanas a los 200 km intercambian genes continuamente, pero al analizar poblaciones de México, Guatemala, Honduras y Nicaragua contra aquéllas de Costa Rica y Panamá se presentan cambios abruptos en la frecuencia de haplotipos mitocondriales, es decir, que la cantidad del flujo genético disminuye con la distancia geográfica entre poblaciones alejadas > 200 km (De Merida, et al., 1999).

Análisis visual del patrón de bandas producidas por la reacción RAPD-PCR nos permitió seleccionar 5 primers en el ámbito microgeográfico en Chiapas y 7 en el ámbito macrogeográfico en México, de un total de 60 primers analizados. Los primers no seleccionados fueron descartados porque produjeron muchas bandas de tal forma que fue imposible leer las bandas polimórficas de interés y otros primers produjeron pocas bandas y con poco polimorfismo. La mayor distancia genética se presentó entre dos áreas que se distinguen por el diferente uso del suelo y aplicación de insecticidas que son la zona de plantación de banano y reserva ecológica (0.0212). La historia de aplicación de insecticidas en el área de banano es desde los años 60' ya que anteriormente esta zona se cultivaba el algodón y posteriormente se cambió al cultivo de banano. Las diferencias genéticas entre poblaciones de estas dos áreas pueden ser debido a la presión de selección provocada por los productos químicos vertidos al suelo, para el control de plagas agrícolas, los cuales en la época de lluvia son arrastrados a las zonas de baja elevación donde están

presentes criaderos permanentes de *An. albimanus*. En el transcurso de varias generaciones los insecticidas empleados en la agricultura la presión de selección ejercida en la población de este vector, dio como resultado mosquitos con alta tolerancia a los productos insecticidas. El flujo de genes entre áreas y dentro de las áreas fue moderadamente restringido (1.8 a 3.3, mediante el método de Wright). En comparación con otro culicido, *Aedes aegypti* en Puerto Rico, presentó una tasa efectiva de migración de 10 a 12 (Apostol et al., 1996). Una de las posibles causas de esta diferencia entre el flujo de genes de Anophelinos y Aedinos puede ser su comportamiento de oviposición, es decir, una hembra de anophelino como *An. albimanus* normalmente deposita todos sus huevos desarrollados o la mayor parte de ellos durante un ciclo gonotrófico. Este comportamiento se repite durante todos los ciclos de la vida de la hembra, ya que se han obtenido hasta 7 ciclos gonotróficos en condiciones de laboratorio y todos con la misma longitud de 48 hrs (Rodríguez et al., 1992), con concordancia gonotrófica por arriba del 90 % (Villarreal, datos no publicados). En el caso de *Ae. aegypti*, no presenta concordancia gonotrófica y oviposita un pequeño grupo de huevos en varios recipientes, entonces se mueve de un lugar a otro buscando sangre y ovipositando, dejando descendencia fértil en otras áreas. En otra especie transmisora de virus de la encefalomiелitis equina del oeste en Argentina *Ae. albifasciatus*, el flujo génico tuvo un rango de 2.3 a 9.0 determinado por la técnica de RAPD-PCR (De Sousa et al., 1999).

En nuestro estudio la diferencia en el valor de Nm dentro del área de reserva ecológica ($Nm = 3.3$) y la de ganado ($Nm = 1.8$) puede ser debida a la mayor disponibilidad de hospederos en el área de ganado en comparación a la escasa o nula cantidad de animales domésticos en la zona de la reserva ecológica. Por lo que al tener mayor disponibilidad de

hospederos los mosquitos no se mueven largas distancias como se presentó en el área de reserva ecológica.

Al analizar el flujo génico entre áreas se encontró que el área de cultivos mixtos y la reserva ecológica son las que comparten mayor número de individuos ($Nm = 2.4$), mientras que el menor flujo génico se presentó entre el área de ganado contra banano y caña de azúcar con una $Nm = 1.8$ en ambos casos. Esto puede ser explicado por la distancia geográfica, la diversidad de hábitats entre las áreas, además de las diferencias que existen en el uso del suelo y aplicación de insecticidas en la agricultura.

La técnica molecular de RAPD's a suscitado recientemente controversias sobre la reproducibilidad de las bandas (Pérez et al., 1998), en un estudio realizados en *Sus scrofa* la temperatura de alineación baja de 35 °C dio mejores resultados que a 45 °C, pero temperatura de alineación de 45 °C produjo bandas reproducibles en el patrón de bandas en *Drosophila*. En este estudio la temperatura de alineación de 35 °C, fue la que presentó resultados satisfactorios produciendo bandas reproducibles. El problema de baja reproducibilidad se presentó al inicio de nuestro estudio, durante el proceso de estandarización, pero este problema se solucionó al disminuir el tiempo de precalentamiento de 5 min a 1 min a una temperatura de 95 °C. También una vez realizado nuestra estandarización se trabajó siempre bajo las mismas condiciones de ciclos, temperaturas, cantidad de Mg^{++} y búferes, e incluso se trabajó con las mismas casas comerciales con la finalidad de evitar la aparición de artefactos que pudieran interferir con la lectura de la nuestras bandas. Durante el proceso de estandarización y tamizaje de iniciadores se encontraron problemas semejantes a los reportados en un estudio de

diferenciación de especies del complejo sobre *An. gambiae* utilizando RAPD (Favia et al., 1994), donde se menciona que cambio en Mg^{++} produce diferente patrón de bandas, al igual que cambios en la cantidad de DNA produce diferente cantidad y calidad en las bandas. Durante el proceso de selección de las bandas se descartaron aquéllas llamadas “fantasmas” por ser borrosas. Estas bandas consisten de alto peso molecular y exhiben inconsistente amplificación, semejante problema se han presentado en la búsqueda de bandas diagnóstico para diferenciar a las principales especies del complejo *An. gambiae*, que son *An. gambiae* s.s. y *An. arabiensis* (Wilkerson et al., 1993). Otro problema que se presentó fue al asignarles valores de “0” y “1” a las bandas, debido a la homología que se presenta entre ciertas bandas, sobre todo en los primers que producen altos número de bandas. Este problema de homología puede ser definitivamente determinado por posteriores investigaciones, tales como secuenciación (Wilkerson et al., 1993).

En el continente americano se sospecha que varias especies de Anophelinos están constituidos por complejos de especies. Por ejemplo *Anopheles pseudopunctipennis* Theobald es uno de los principales vectores de paludismo en el continente Americano (PAHO 1996), y también es el vector con mayor distribución geográfica en el nuevo mundo (Fleming 1986). Pertenece al Subgénero *Anopheles* (Wilkerson y Strickman 1990). Recientemente con el desarrollo de nuevas técnicas moleculares, esta especie ha sido sujeta a diversos estudios con el fin de determinar si está constituida por una sola especie o de un complejo de especies. En un estudio utilizando isoenzimas y análisis del rDNA mediante la técnica: fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLPs), entre poblaciones de México y Sudamérica se encontraron suficientes diferencias para elevar estas poblaciones a nivel de especie, nombrando la especie “A” en México y especie “B” en Perú y Bolivia

(Estrada-Franco et al 1993a). También se encontró esterilidad macho/hembra unidireccional en cópula-cruzada entre cepas del norte (México) y del sur (Perú y Bolivia), presentado en la forma de testículos atrofiados y extensiva asinapsis de cromosomas politenos (Estrada-Franco 1993b). Un segundo grupo de investigadores (Manguin et al., 1995), analizaron 42 localidades distribuidas desde el Sur de Estados Unidos (Houston, Texas) hasta el norte de Argentina utilizando isoenzimas. Se encontró que a lo largo de su distribución geográfica *An. pseudopunctipennis* consta de dos principales poblaciones, una que se extiende desde el sur de EUA hasta el sur de México y Guatemala y la segunda desde Belice hasta el Argentina. Estas dos poblaciones convergen en el sur de México y norte de Centroamérica. Una parte de esta zona de convergencia fue identificada en una área situada al este de Guatemala y sur de Belice. A diferencia de los reportes previos, ellos concluyeron que las variaciones son clinales y no indicativo de especies sibilinas. Sin embargo los datos indican un patrón descrito como "zona de sutura" (Remington, 1968), donde una población de una especie se separa del grupo por un periodo extensivo de tiempo y posteriormente se reunifican. Otro vector importante de malaria *An. darlingi* ha estado sujeto a diversos estudios mediante isoenzimas, RAPD y espaciadores intergénicos 2 (ITS 2), con el propósito de saber si está constituida en un complejo de especies, pero hasta el momento no se ha demostrado la existencia de algún complejo (Manguin et al., 1999). Es necesario realizar más estudios con la finalidad de encontrar nuevas evidencias que apoyen o rechacen el actual status taxonómico de *An. pseudopunctipennis* y *An. darlingi* con el fin de diferenciar poblaciones importantes en la transmisión de paludismo de aquellas sin importancia. La técnica de RAPD se aplicó a *An. albicans* procedente de Paraguay, Argentina y Brasil, logrando distinguir cuatro especies por medio de 12 primers de un tamizaje inicial de 65, los cuales produjeron 19 marcadores genéticos específicos de especie y cuatro marcadores

comunes a 2 o más especies. Los marcadores fueron correlacionados en casi todos los individuos de cada especie en el rango hecho un muestreo, incluyendo poblaciones tal lejanas como 2,500 km. En nuestro estudio no se encontró bandas únicas de una localidad en el estudio microgeográfico o único de un estado de la República mexicana, en el estudio macrogeográfico, pero se observa en el dendrograma que las poblaciones del norte de México se encuentran separadas de las del sur, probablemente por la presencia de los fuertes vientos constantes que se presentan en el istmo de Tehuantepec que pueden estar actuando como una barrera que impide el libre flujo génico entre las poblaciones de Chiapas y Oaxaca y los estados del norte de México.

El árbol producido por el análisis de Bootstrap presentó un rango de 34 a 87 % de consistencia entre las cinco áreas, indicando que las poblaciones de *An. albimanus* están segregadas y que el flujo de genes es moderadamente restringido. Esto probablemente es resultado de la diversidad de hábitats, y a los procesos de disminución de las poblaciones durante la época de secas, donde las poblaciones de *An. albimanus* disminuyen considerablemente, y la población se concentra principalmente en cuerpos de agua permanentes de baja elevación, mientras que la mayoría de las poblaciones tierra adentro desaparecen o bajan considerablemente (Savage et al., 1990). Está claro que el componente hidrológico potencial más importante para la cría de mosquitos son las áreas inundables, especialmente pastos localizados a bajas elevaciones (Rodríguez et al., 1996), y que estos hábitats son los que producen la mayor cantidad de adultos (Rodríguez et al., 1993). Otra posible explicación de la segregación de la población es por el diferente uso del suelo, aplicación de productos químicos al medio ambiente o disponibilidad de alimento (Slatkin, 1987).

Mediante la técnica RAPD-PCR se encontró que *Anopheles albimanus* presentó un flujo de genes moderadamente restringido. Este flujo de genes restringido indica que cuando se presenta un nuevo caso de paludismo, el mosquito infectado propagará la enfermedad principalmente en los alrededores donde se presentó el caso y por el hecho de que *An. albimanus* presenta un rango de vuelo reducido según estudios realizados en El Salvador (Hobbs, et al., 1974). La dispersión del paludismo, puede ser debido a movimientos de personas enfermas a nuevas áreas, mas que al movimiento de mosquitos enfermos.

En el análisis macrogeográfico en el ámbito Nacional, la tasa efectiva de migración fue de 1.2, lo que indica un flujo de genes restringido, sin embargo el análisis jerárquico por regiones mostró que el flujo de genes es mayor entre los estados del norte ($Nm = 2$). Las divergencias genéticas se presentaron principalmente entre las poblaciones del norte de México y las del sur, indicando la existencia de alguna barrera geográfica debido a montañas, factores ecológicos como el clima, fuentes de alimento de la hembra adulta etc. (Slatkin, 1987). Otro de los factores puede ser debido a los fuertes vientos que se presentan en el istmo de Tehuantepec entre los límites del estado de Oaxaca y Chiapas, donde a lo largo del año imperan vientos fuerte del norte de la República mexicana, y que dichos vientos pueden actuar como una cortina que impide el libre paso de los mosquitos entre el norte y sur de México.

CONCLUSIONES

En Chiapas el dendrograma presentó incipiente agrupación de localidades por agroecosistemas. El área de Banano y Reserva Ecológica presentaron la mayor distancia genética (0.0212). El mayor flujo génico ($Nm = 3.3$) se presentó entre localidades pertenecientes al área de Reserva Ecológica y el menor entre localidades del área de Ganado ($Nm = 1.8$), probablemente como resultado de la disponibilidad hospederos animales.

En el estudio macrogeográfico el dendrograma presentó dos ramas de similitud genética principales, una donde se agrupan los estados del norte: Sinaloa, Nayarit, Colima, Guerrero y Oaxaca y otra rama donde se agrupan los estados del sur: Selva Lacandona, Chiapas, Tabasco, y Guatemala. El estado de Jalisco se presentó separado de las dos ramas genéticas principales.

El flujo de genes de *Anopheles albimanus* fue muy restringido ($Nm = 1$ en Chiapas y 2 en México), lo cual podría explicar (en parte) la focalización del paludismo e indica que cualquier estrategia de control genético, deberá ser realizado con cada una de las metapoblaciones del vector.

Anopheles albimanus esta constituida por metapoblaciones con un flujo génico grandemente diferenciando entre las subpoblaciones pertenecientes a los diversos habitats presentes, y con un modelo metapoblacional de tipo paisaje.

REFERENCIAS CITADAS

- Apostol, B.L. W.C.Black IV, B.R. Miller, P. Reiter, B.J. Beaty. 1993. Estimation of the number of Full sibling families at an oviposition site using RAPD-PCR markers: applications to the mosquito *Aedes aegypti*. *Theor Appl Genet.* 86: 991-1000.
- Apostol, B. L., W. C. Black IV, P. Reiter, B. R. Miller. 1996. Population genetics with RAPD-PCR markers: the breeding structure of *Aedes aegypti* in Puerto Rico. *Heredity* 76: 325 – 334.
- Arredondo-Jiménez, J. I., D. N. Bown, M. H. Rodriguez, C. Villarreal, E. G. Loyola, C. E. Frederickson. 1992. Test for the existence of genetic determination or conditioning in host selection by *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 29: 894-897.
- Audesirk Teresa, Audesirk Gerald. 1993. *Biology. Life on earth.* 4ta. ed. Prentice-Hall Hispanoamericana, S.A. 1-947.
- Ballinger-Crabtree, M.E., W.C. Black 4th, B.R. Miller. 1992. Use of genetic polymorphisms detected by the random-amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) for differentiation and identification of *Aedes aegypti* subspecies and populations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 47: 893 – 901.

- Black, W.C. IV, N. M. Duteau, G. J. Puterka, J. R. Nechols, J. N. Pettorini. 1992. Use of the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphism in aphids (Homoptera: Aphididae). *Bull. Entomol. Res.* 82: 151 – 159.
- Black, W.C. IV. 1993. PCR with arbitrary primers: approach with care. *Insect. Molec. Biol* 2: 1-6.
- Black, W.C. IV, Munstermann, L.M. 1994. Molecular taxonomy and systematics of arthropod vectors. In: *The Biology of Disease Vectors* (Beatty J.B, and Marquardt, W.C. eds). University of Colorado Press, Boulder, Co. p 438- 470.
- Black, W.C. IV. 1996. Fortran programs for analysis of RAPD-PCR data. wcb4@lamar.colostate.edu.
- Black, W.C. IV, N. M. Du Teau. 1997. RAPD-PCR and SSCP analysis for insect population genetic studies. In *Molecular Biology of Insect Vector: A methods manual*. Edited by Crampton, C. B. Beard and C. Louis. Chapman & Hall.
- Breeland, S. G. 1972. Studies on the ecology of *Anopheles albimanus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 21: 271-274.

- Brown RJ, Malcolm CA, Mason PL, Nichols RA. 1997. Genetic differentiation between and within strains of the saw-toothed grain beetle, *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae) at RAPD loci. *Insect Mol Biol.* 6: 285-289.
- Chan A.S., M.H. Rodriguez, J.A. Torres, M.C. Rodriguez, C. Villarreal. 1994. Susceptibility of three laboratory strains of *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) to coindigenous *Plasmodium vivax* in southern Mexico. *J Med Entomol.* 31: 400-403.
- Coen, E.S., J.M. Thoday, G. Dover. 1982. Rate of turnover of structural variants in the rDNA gene family of *Drosophila melanogaster*. *Nature.* 295: 564-568.
- Coetzee, Maureen, Jose G. Estrada-Franco, Collen A. Wunderlich, Richard H. Hunt. 1999. Cytogenetic evidence for a species complex within *Anopheles pseudopunctipennis* Theobald (Diptera: Culicidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60: 649-653.
- De Merida, Ana Maria, M. P. de Mata, E. Molina, C. H. Porter, W.C. Black IV. 1995. Variation in ribosomal DNA intergenic spacers among populations of *Anopheles albimanus* in south and central America. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53: 469 – 477.

- De Merida AM, Palmieri M, Yurrita M, Molina A, Molina E, Black WC 4th. 1999. Mitochondrial DNA variation among *Anopheles albimanus* populations. *Am J Trop Med Hyg* 1999. 61: 230-239.
- De Sousa, G. B., A. Blanco, C.N. Gardenal. 1996. Genetic structure of *Aedes albifasciatus* (Diptera:Culicidae) from a marsh ecosystem in Córdoba, Argentina. *J. Med. Entomol.* 33: 531-536.
- De Sousa, G. B., G. P. De Dutari, C. N. Gardenal. 1999. Genetic Structure of *Aedes albifasciatus* (Diptera: Culicidae) populations in Central Argentina Determined by Random amplified polymorphic DNA- Polymerase Chain Reaction Markers. *J. Med. Entomol.* 36: 400 – 404.
- 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: 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: 746-755.

Faran, M. 1980. A revision of the *Albimanus* section of the subgenus *Nyssorhynchus* of *Anopheles*. Contributions to the American Entomological Institute 15: 1 – 215.

Favia, G., G. Dimopoulos, C. Louis. 1994. Analysis of the *Anopheles gambiae* genome using RAPD markers. Insect Molec. Biology 3: 149-157.

Fleming, G., 1986. Biology and ecology of Malaria Vectors in the Americas. Washington, D.C. Pan American Health Organization. PNSP/86-72.

Frederickson, E. C. 1993. Bionomics and control of *Anopheles albimanus*. Washington, D. C.: P. A. H. O. Tech. Pap. 33-44.

Felsenstein, J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) v.3.5c, Department of Genetics, The University of Washington. Seattle, WA.

Gawel, N. J., A. C. Bartlett. 1993. Characterization of differences between whiteflies using RAPD-PCR. Insect. Mol. Biol. 2: 33 – 38.

Gerberg, E.J., D.R. Barnard, R. A. Ward. 1994. Manual for mosquito rearing and experimental techniques. Am. Mosqr. Control Assoc. Bulletin No. 5. Louisiana. 98 p.

- Hobbs J. 1962. Cytogenetic of *Anopheles albimanus* (Diptera: Culiciadae). Ann Entomol. Soc. Am 55: 245-251.
- Hobbs, J., Lowe, R., Schreck, C. 1974. Studies on flight range and survival of *Anopheles albimanus* in coastal Guatemala. Mosq. News. 34: 389-393.
- Kambhampati, S., W. C. Black IV, K. S. Rap. 1992. Random amplified polymorphic DNA of mosquito species and populations (Diptera : Culiciadae): techniques, statistical analysis, and applications. J. Med. Entomol. 29: 939 - 945.
- Klug Williams S., Cummings Michael R. 1996. Essentials of Genetics. 2da. ed. Prentice Hall.76.
- Lynch, M., B. G. Milligan. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. Mol. Ecol 3: 91 – 99.
- Manguin, S., D.R. Roberts, E.L. Peyton, I. Fernández-Salas, M.Barreto, R.F. Loayza, R.E.Spinola, R.M.Granaou, M. H. Rodríguez 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.
- Manguin, S., R.C. Wilkerson, Y. Rubio-Palis, J.A. Danoff-Burg, D.R. Roberts. 1999. Population structure of the primary malaria vector in South America, *Anopheles*

- darlingi*, using isozyme, random amplified polymorphic DNA, internal transcribed spacer 2, and morphologic markers. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 60: 364-376.
- Narang, S. K., J.A. Seawright, M. F. Suarez. 1991. Genetic structure of natural populations of *Anopheles albimanus* in Colombia. J. Am. Mosq. Control Assoc. 7: 437 - 445.
- Nason, J. Empirical population genetics. Course Bot 567x, Iowa State University, Ames Iowa.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. Am. Nat. 106: 283-292.
- Pan American Health Organization. 1996. Status of Malaria Program in the Americas. Washington DC. Report XLIV.
- Penilla, P. R., A. D. Rodriguez, J. Hemingway, J. L. Torres, J. I. Arredondo-Jiménez, M. H. Rodríguez. 1998. Resistance management strategies in malaria vector mosquito control. Baseline data for a large-scale field trial against *Anopheles albimanus* in México. Med. Vet. Entomol. 12: 217 - 233.
- Pérez, T., J. Albornoz, A. Domínguez. 1998. An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. Mol. Ecol. 7: 1347-1357.
- Raymond, M., A. Callaghan, P. Fort, N. Pasteur. 1991. World wide migration of amplified resistance genes in mosquitoes. Nature 350: 151-153.

- Remington, C. L., 1968. Suture-zones of hybrid interaction between recently joined biotas. Pp. 321-428 in *Evolutionary Biology*. (T. Dobzhansky, M.K. Hecht, and W.C. Steere, eds.) Appleton Century Crofts, New York.
- Rodríguez M.H., E.G. Loyola. 1989. Situación epidemiológica actual y perspectivas de la investigación entomológica en México, p. 15-40. In S. Ibáñez (ed.), *Memorias del IV Simposio Nacional de Entomología Médica y Veterinaria*. Sociedad Mexicana de Entomología, México DF.
- Rodríguez, M.H., B. Chávez, A. Orozco, E. G. Loyola, Martínez-Palomo. 1992a. Scanning electron microscopic observations of *Anopheles albimanus* (Diptera : Culicidae) Eggs. *J. Med. Entomol.* 29: 400 – 406.
- Rodríguez, M.H., D.N. Bown, J.I. Arredondo-Jiménez, C. Villarreal, E.G. Loyola, C.E. Frederickson. 1992b. Gonotrophic cycle and survivorship of *Anopheles albimanus* (Diptera:Culicidae) in southern México. *J. Med. Entomol.* 29: 395-399.
- Rodríguez MH, L. Gonzalez-Ceron, J.E. Hernandez, J.A. Nettel, C. Villarreal, K.C. Kain, R.A. Wirtz. 2000. Different prevalences of *Plasmodium vivax* phenotypes VK210 and VK247 associated with the distribution of *Anopheles albimanus* and *Anopheles pseudopunctipennis* in Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* 62: 122-127.

- Rodríguez, A.D., M. H. Rodríguez, R. A. Meza, J. E. Hernández, E. Rejmankova, H. M. Savage, D. R. Roberts, K. O. Pope, L. Legters. 1993. Dynamics of population densities and vegetation associations of *Anopheles albimanus* larvae in a coastal area of southern Chiapas, México. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 9: 46-58.
- Rodríguez, A.D., M. H. Rodríguez, J. E. Hernández, S.W. Dister, L. R. Beck, E. Rejmankova, D.R. Roberts. 1996. Landscape surrounding human settlements and *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) abundance in southern Chiapas, México. *J. Med. Entomol.* 33: 39-48.
- Savage, H. M., E. Rejmankova, J. I. Arredondo-Jiménez, D. R. Roberts, M.H. Rodríguez. 1990. Limnological and botanical characterization of larval habitats for two primary malarial vectors, *Anopheles albimanus* y *An. pseudopunctipennis*, in costal areas of Chiapas State, México. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 6: 612-620.
- Schapira, A., P.F. Beales, M.E. Halloran. 1993. Malaria: living with drug resistance. *Parasitology today* 9: 168-174.
- Service, M.W. 1976. Mosquito ecology field sampling methods. Applied Science Publishers, London.
- Slatkin, M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236: 787 - 792.

- Sork, V. L. D. Cambell, R. Dyer, J. Fernandez, J. Nason, R. Petit, P. Smouse, E. Steinberg. 1998. Proceedings from a workshop on gene flow in fragmented, managed, and continuous populations. National Center for Ecological Analysis and Synthesis University of California-Santa Barbara.
- Tabachnick, W.J., W. C. Black IV. 1994. Population genetic in vector biology. In: The Biology of Disease Vectors (Beatty J.B, and Marquardt, W.C. eds). University of Colorado Press, Boulder, Co. p 417- 437.
- Weir, B. S., C.C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*. 33: 1358 – 1370.
- Wilkerson, R.C., T.J. Parsons, D. G. Albright, T.A. Klein, M J. Braun. 1993. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers readily distinguish cryptic mosquito species (Diptera : Culicidae : Anopheles). *Insect Mol. Biol* 1: 205 - 211.
- Wilkerson R. C, T. J. Parsons T. A. Klein, T. V. Gaffigan, E. Bergo, J. Consolim. 1995. Diagnosis by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction of four cryptic species related to *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* (Diptera: Culicidae) from Paraguay, Argentina and Brazil. *J. Med. Entomol*. 32: 697-704.
- Williams, J. K., A.R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*. 18: 6531-6535.

Wilkerson and Strickman, 1990. Clave Ilustrada para la identificación de las hembras de mosquitos anofelinos de México y Centroamérica. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* Vol. 6, No. 1 pp. 7-34.

Winchester A., M., 1985. Herencia. Una introducción a la Genética. Ed. Continental, S.A. de C. V., México. 83-85 y 252.

Wright, S. 1931. Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16: 97 – 159.

Cuadro 2.2. Número de marcadores genéticos y la secuencia de los iniciadores seleccionado en *Anopheles albimanus* procedentes de Chiapas, México.

Iniciadores	No de marcadores	
	En Chiapas	En México
A05	7	7
A08	-	8
A12	-	9
A19	-	6
A20	9	8
B04	10	6
B11	10	7
B18	10	-
TOTAL	46	51

Cuadro 2.3. Distancia genética de Nei (1972)(abajo) y distancia geográfica (arriba) en *Anopheles albimanus* entre agroecosistemas.

Agro-ecosistema	1	2	3	4	5
1 Banano	-	32.3	74.6	70.7	156
2 cultivativos mixtos	0.0122	-	42.1	39.5	124
3 Caña de Azúcar	0.0078	0.0146	-	15.7	83.5
4 Reserva Ecológica	0.0212	0.0163	0.0182	-	84.5
5 Área de Ganado	0.0168	0.0124	0.0112	0.0116	-

Cuadro 2.4. Matriz de distancia genética de Nei (1972) (abajo) y distancia geográfica (arriba) en *Anopheles albimanus* por localidades del sur de Chiapas, México.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1 Herradero	-	.32	.88	5.2	7.2	26.4	42.4	39.1	35.2	73.2	72.4	80.8	72.4	87.6	96	90.4	56	172	120	137.2
2 Gancho	.031	-	10	3.6	8.4	27.6	43.2	42	38	75.2	74.4	82	74	89.2	96.2	91.6	56	172.8	120.8	138
3 Brisas	.055	.030	-	13.2	6	18	34	33.6	31.2	66.4	65.2	72.8	64.8	79.6	87.6	82.4	46.8	162.4	111.6	128
4 Marelas	.061	.046	.026	-	11.2	30.8	46.8	45.2	40.4	78	77.6	85.6	77.6	92	100	95.2	59.6	176	160.8	141.6
5 Cosatlapa	.048	.036	.062	.075	-	22	37.2	34	29.2	67.2	66.8	74.8	66.8	82	90	93.0	50	164.8	114.4	130.4
6 Cahildo	.067	.035	.043	.041	.034	-	16	21.6	26.4	48.4	48	50.8	47.6	62	69.6	64	28.8	144	94	110
7 E. Zapata	.043	.025	.030	.037	.037	.023	-	20	28.8	36.4	33.6	40	32.8	46.4	53.6	48.4	13.2	128.8	78	94
8 A. Obregon	.057	.043	.056	.067	.034	.023	.029	-	10.4	34	34.8	44.8	36	51.6	62	56.4	26.4	136	49.6	101.6
9 Confeti	.066	.060	.048	.053	.048	.044	.048	.042	-	42	45.2	54.4	45.6	61.2	71.2	66.4	37.2	145.6	96	110.4
10 L. Cárdenas	.045	.047	.080	.084	.051	.075	.064	.067	.066	-	8.8	18	12	22.4	34.4	30.8	29.6	8.8	56.8	70.8
11 Alkamira	.043	.041	.034	.032	.062	.057	.040	.063	.032	.054	-	10.4	2	16	27.2	23.1	26.8	98.8	49.6	64
12 Río Arriba	.045	.051	.065	.065	.040	.058	.057	.076	.070	.043	.060	-	9.2	6.8	17.6	13.2	28	91.2	40.8	56.8
13 Xochicalco	.047	.021	.049	.039	.035	.048	.043	.052	.045	.027	.043	.042	-	15.6	26	21.6	22	100	50	66
14 Castaño	.050	.031	.044	.051	.034	.052	.024	.036	.052	.073	.049	.064	.040	-	12	9.6	34	84.4	34.8	50.4
15 Zacapalan	.057	.041	.077	.086	.038	.044	.049	.050	.066	.093	.080	.078	.054	.042	-	4.8	40.8	75.6	24.8	40.8
16 Las Palmas	.057	.038	.066	.064	.030	.040	.028	.036	.074	.050	.072	.053	.043	.030	.051	-	36	80.6	30	45.6
17 San José	.055	.044	.071	.071	.021	.039	.031	.027	.054	.044	.064	.051	.039	.027	.054	.011	-	112	65.2	81.6
18 Perlán	.073	.053	.067	.070	.073	.082	.080	.077	.053	.058	.043	.038	.034	.067	.064	.093	.075	-	50.8	34.4
19 B. Pajón	.073	.041	.077	.082	.042	.032	.031	.036	.075	.066	.082	.075	.054	.035	.049	.026	.025	.105	-	16
20 Zapotal	.087	.060	.093	.089	.036	.041	.047	.033	.086	.081	.090	.083	.069	.039	.041	.031	.030	.109	0.034	-

Cuadro 2.5. F_{ST} estadística y tasa efectiva de migración (Nm) dentro de agroecosistemas y entre localidades, por tres métodos en *Anopheles albimanus* de Chiapas, México.

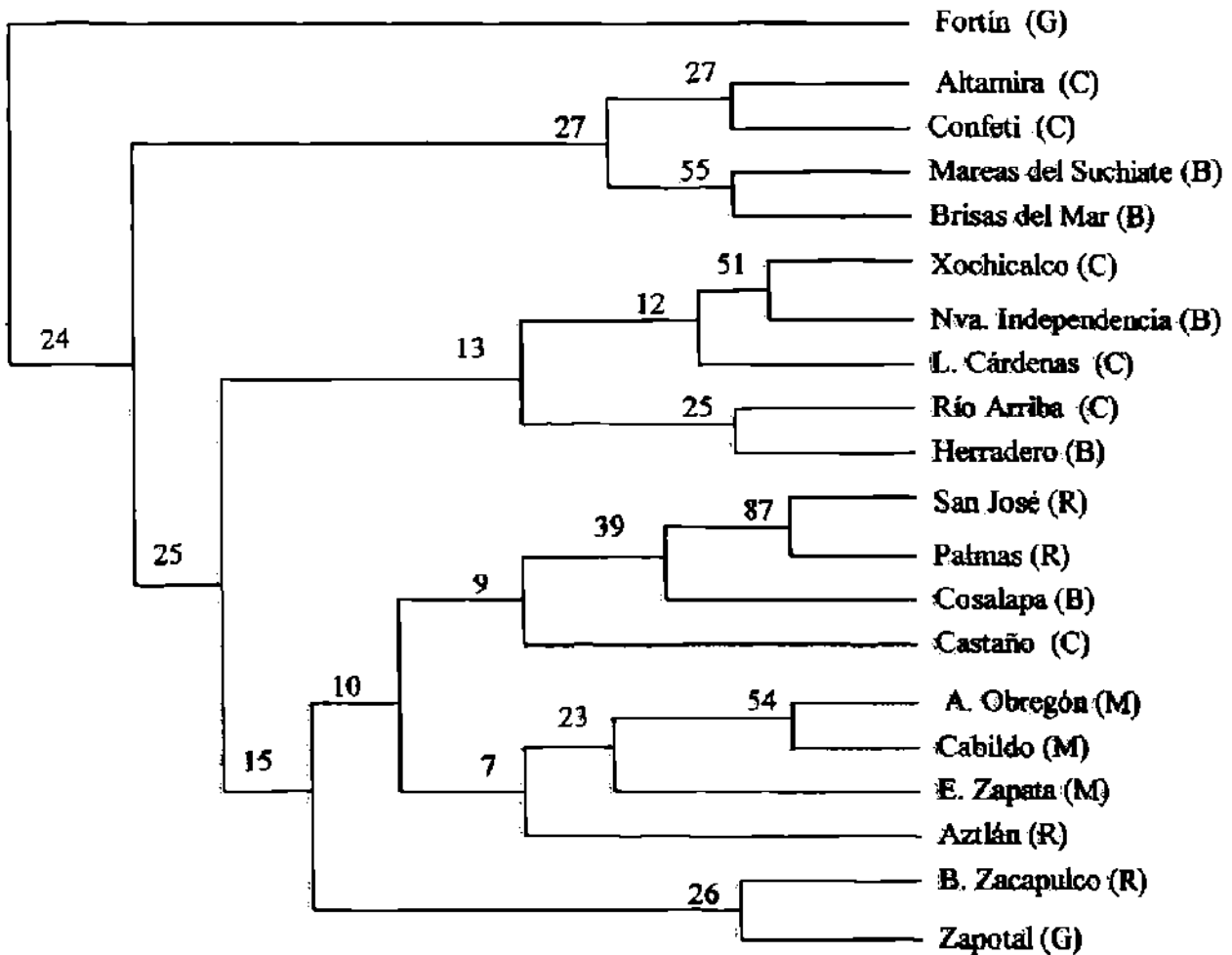
Agro-ecosistema	F_{ST} de Wright &		θ de Weir & Cockerham		F_{ST} de Lynch & Milligan &	
	F_{ST}	Nm	θ	Nm	F_{ST}	Nm
Banana	0.093 (0.086)	2.4	0.079 (0.106)	2.9	0.081 (0.184)	2.8
C. Mixtos	0.0790 (0.076)	2.9	0.0520 (0.098)	4.6	0.043 (0.148)	5.6
Caña de Azúcar	0.101 (0.096)	2.2	0.091 (0.115)	2.5	0.097 (0.183)	2.3
Reserva	0.0700 (0.84)	3.3	0.050 (0.115)	4.7	0.042 (0.157)	5.7
Ganado	0.120 (0.133)	1.8	0.142 (0.170)	1.5	0.141 (0.22)	1.5
Entre Localidades	0.117 (0.073)	1.9	0.088 (0.080)	2.6	0.109 (0.153)	2.0

& (Media \pm D St)

Cuadro 2.6. Tasa efectiva de migración (Nm), entre agroecosistemas en *Anopheles albimanus* de Chiapas, Mexico.

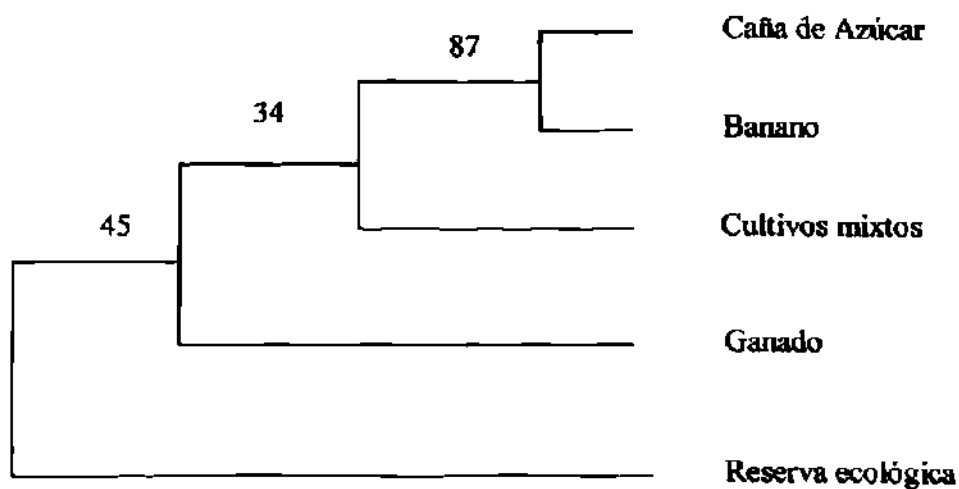
Agroecosistema	1	2	3	4	5
1 Banano	–				
2 Cultivos mixtos	2.3	–			
3 Caña de azúcar	2.0	2.1	–		
4 Reserva ecológica	1.9	2.4	2.1	–	
5 Ganado	1.8	1.9	1.8	2.0	–

Fig. 2.2 Arbol de distancia genética de Nei (1972) utilizando el método de grupos pares no ponderado (UPGMA) en 20 localidades después de 100 replicas de Bootstrap.



B: Banano; R: reserva ecológica; M: cultivos mixtos; C: Caña; G: Ganadero.

Fig 2.3 Arbol de distancia genéticas de Nei (1972) utilizando el método de análisis de grupos pares no ponderado (UPGMA) entre cinco agroecosistemas después de 100 replicas del análisis bootstrap.



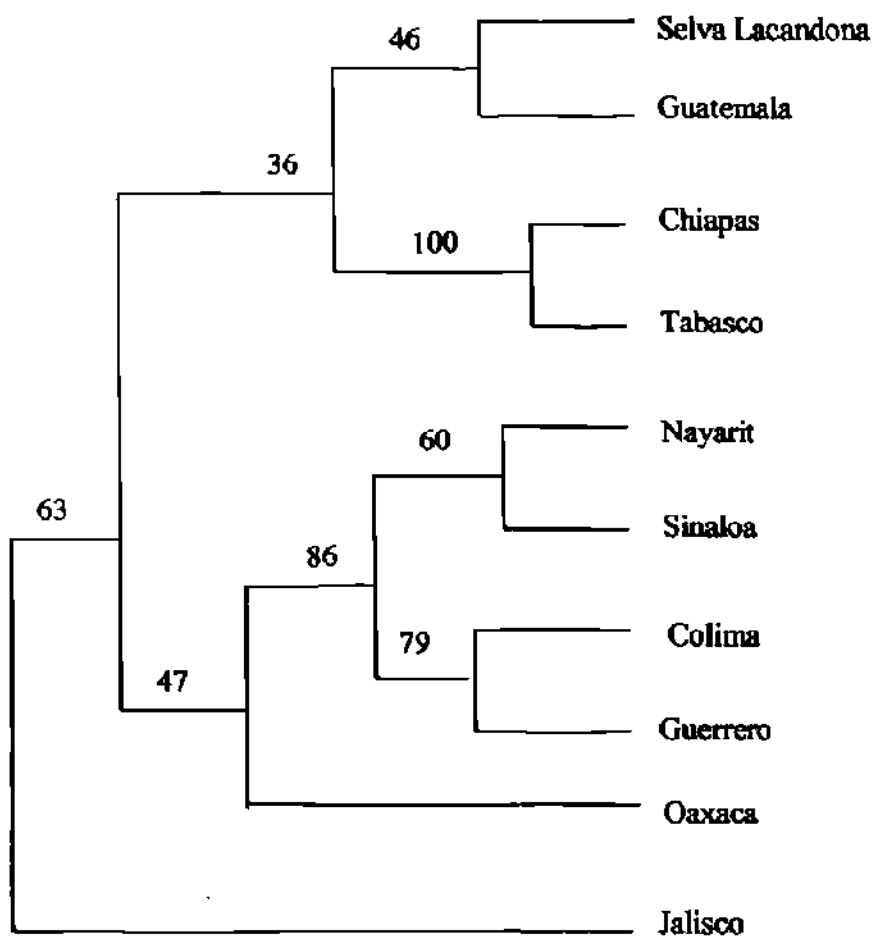
Cuadro 2.7. Matriz de distancia genética de Nei (1972) (abajo) y distancia geográfica (arriba) de *Anopheles albimanus* en la República Mexicana.

Localidades	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 Sinaloa	—	645	1038	1456	2239	2334	2464	896	1848	2606
2 Nayarit	0.0294	—	355	833	1733	1720	1921	277	1271	2001
3 Colima	0.0336	0.0351	—	455	1357	1395	1537	49.1	893	1741
4 Guerrero	0.0342	0.0350	0.0203	—	1025	859	1089	552	418	1249
5 Tabasco	0.1097	0.0877	0.0960	0.1231	—	336	144	1700	613	397
6 Chiapas	0.0951	0.0764	0.0835	0.1014	0.0254	—	272	1467	470	361
7 Selva, Chis	0.0861	0.0646	0.0797	0.0878	0.0820	0.0776	—	1629	659	228
8 Jalisco	0.0964	0.0938	0.0894	0.0650	0.2079	0.1975	0.1226	—	1048	2058
9 Oaxaca	0.0612	0.0575	0.0694	0.0567	0.0828	0.0930	0.0680	0.1005	—	878
10 Guatemala	0.0840	0.0667	0.0799	0.0917	0.0740	0.0704	0.0591	0.1499	0.0680	—

Cuadro 2.8. Valores promedio de F_{st} y N_m en *Anopheles albimanus* entre diferentes estados de la República Mexicana.

Areas	F_{st} de Wright (\pm Desv.St)	N_m	ϕ Weir y Cockerham (\pm Desv.St)	N_m	Lynch y Milligan (\pm Desv.St)	N_m
Entre estados del Norte	0.113 (0.096)	2.0	0.103 (0.107)	2.2	0.0123 (0.189)	1.8
Entre estados del Sur	0.122 (0.097)	1.8	0.109 (0.110)	2.0	0.123 (0.198)	1.8
Todos los Estados	0.169 (0.122)	1.2	0.149 (0.136)	1.4	0.186 (0.194)	1.1

Figura 2.4 Árbol de distancia genética de Nei (1972) utilizando el método de análisis de grupos pares no ponderados (UPGMA) entre los diferentes estados de la República mexicana después de 100 réplicas de Bootstrap.



Anexo 1. Zonas epidemiológicas y vectores de la malaria en humanos.

<p>1. Norte America</p> <p><i>A. (A) freeborni</i></p> <p><i>A. (A) quadrimaculatus</i></p> <p><i>(A. (N) albimanus)</i></p> <p><i>A. (A.)pseudopunctipennis</i></p>	<p>7. Afrotropical</p> <p><i>A. (C.) arabiensis</i></p> <p><i>A. (C.) funestus</i></p> <p><i>A. (C.) gambiae</i></p> <p><i>(A. (C.) melas)</i></p> <p><i>(A. (C.) merus)</i></p> <p><i>(A. (C.) moucheti)</i></p> <p><i>(A. (C.) nili)</i></p> <p><i>(A. (C.) pharoensis)</i></p> <p><i>A. (C.) rufipes</i></p> <p><i>A. (C.) d'thali</i></p>
<p>2. America Central</p> <p><i>(A. (A) aztecus)</i></p> <p><i>(A. (A) punctimacula)</i></p> <p><i>A. (N) albimanus</i></p> <p><i>(A.(A) albitarsis</i></p> <p><i>A. (N) aquasalis</i></p> <p><i>A. (N) argiritarsis</i></p> <p><i>A. (N) darlingi</i></p>	<p>8. Indo-Irani</p> <p><i>(A. (A.) sacharovi)</i></p> <p><i>(A. (C.) annularis)</i></p> <p><i>A. (C.) culicifacies</i></p> <p><i>A. (C.) fluviatilis</i></p> <p><i>(A. (C.) pulcherrimus)</i></p> <p><i>(A. (C.) stephensi)</i></p> <p><i>(A. (C.) superpictus)</i></p> <p><i>(A. (C.) tesellatus)</i></p>

3. Sur America

A. (A.) pseudopunctipennis

A. (A.) punctimacula

(A. (K) bellator)

(A. (K) cruzii)

A. (N) albimanus

(A. (A) albitarsis)

A. (N) aquasalis

A. (N) argiritarsis

A. (N) darlingi

(A. (N) nunestovari)

A. (N) triannulatus

9. Colinas Indo-chinas

(A. (A.) nigerrimus)

(A. (C.) annularis)

A. (C.) culicifacies

(A. (C.) dirus)

A. (C.) fluviatilis

(A. (C.) maculatus)

A. (C.) minimus

*A. (C.) leucosphyrus****

*A. (C.) balabacensis****

4. Eurasiatico Norte

- A. (A.) atroparvus*
- (A. (A.) messeae)*
- (A. (A.) sacharovi)*
- (A. (C.) sinensis*
- (A. (C.) pattoni)*
- A. (C.) maculipennis***

10. Malasia

- A. (A.) campestris*
- A. (A.) donaldi*
- A. (A.) leifer*
- A. (A.) nigerrimus*
- (A. (A.) whartoni)*
- A. (C.) aconitus*
- A. (C.) balabacensis*
- A. (C.) dirus*
- A. (C.) flavirostris*
- A. (C.) leucosphyrus*
- A. (C.) ludlowae*
- A. (C.) maculatus*
- A. (C.) minimus*
- (A. (C.) philippinensis)*
- A. (C.) supictus*
- A. (C.) sundaicus*
- A. (C.) unprosus*
- A. (C.) barbirostris*

<p>5. Mediterraneo</p> <p><i>A. (A.) atroparvus</i></p> <p><i>(A. (A.) claviger</i></p> <p><i>A. (A.) labbranchiae</i></p> <p><i>(A. (A.) messeae)</i></p> <p><i>A. (A.) sacharovi</i></p> <p><i>(A. (A.) hispaniola)</i></p> <p><i>(A. (C.) pattoni)</i></p> <p><i>A. (C.) superpictus**</i></p>	<p>11. China</p> <p><i>A. (A.) anthropophagus</i></p> <p><i>A. (A.) sinensis</i></p> <p><i>(A. (C.) pattoni)</i></p> <p><i>A. (A.) sacharovi</i></p>
<p>6. Afro-arabia</p> <p><i>(A. (A.) hispaniola)</i></p> <p><i>(A. (C.) multicolor</i></p> <p><i>A. (C.) pharoensis</i></p> <p><i>A. (C.) sergentii</i></p> <p><i>A. (C.) gambiae</i></p>	<p>12. Australia</p> <p><i>(A. (A.) bancroftii)</i></p> <p><i>A. (C.) farauti tipo 1</i></p> <p><i>A. (C.) farauti tipo 2</i></p> <p><i>(A. (C.) hilli)</i></p> <p><i>(A. (C.) karwari)</i></p> <p><i>A. (C.) koliensis</i></p> <p><i>A. (C.) punctulatus</i></p> <p><i>(A. (C.) subpictus)</i></p> <p><i>A. (C.) koliensis</i></p>

A= Anopheles

C= Cella

K= Kerteszia

N= Nysorhynchus Nysorhynchus

Anexo 2. Distribución de los anofelinos mexicanos por estados de la República Mexicana.

ESPECIE	ENTIDAD FEDERATIVA
<i>An. albimanus</i>	Chiapas (las dos vertientes), Oaxaca (las dos vertientes), Guerrero, Michoacán, Colima, Nayarit, Sinaloa, Tamaulipas, Nuevo León, Veracruz, Tabasco, Campeche, Yucatán, Quintana Roo, San Luis Potosí. Desde el nivel del mar hasta lugares altos como tres puentes cerca de Morelia, Michoacán, altitud de Morelia: 1,941 msnm.
<i>An. apicimacula</i>	Chiapas (las dos vertientes), Michoacán, Quintana Roo, San Luis Potosí, Tabasco, Veracruz, Yucatán. Desde los lugares bajos de la costa hasta 1,427 msnm.
<i>An. argyritarsis</i>	Campeche, Chiapas (las dos vertientes), Hidalgo, Michoacán, Nayarit, Oaxaca (las dos vertientes), San Luis Potosí, Tabasco, Tamaulipas. Desde la costa hasta lugares tan altos como Banderillas, Veracruz, 1,520 msnm.
<i>An. aztecus</i>	Distrito Federal, Durango, Guanajuato, Jalisco, México, Michoacán, Puebla, Tlaxcala, y Zacatecas. Sólo en la Altiplanicie, a más de 1,500 metros. Una de las localidades más altas es Xochicalco, D.F., a 2,266 msnm.
<i>An. barberi</i>	Sonora. Única localidad conocida: Imuris, Son., 852 msnm.
<i>An. bradleyi</i>	Campeche, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán, Quintana Roo, Chiapas. En localidades próximas al nivel del mar.
<i>An. crucians</i>	Nuevo León, Quintana Roo, San Luis Potosí, Veracruz, Yucatán. Casi desde el nivel del mar hasta lugares altos. Localidad de mayor altitud conocida: Banderillas, Veracruz, 1,520 msnm.

<i>An. durlingi</i>	Chiapas (vertiente del Golfo de México), Tabasco. En localidades de escasa altitud como Teapa, Tabasco, 60 msnm.
<i>An. eiseni</i>	Chiapas (las dos vertientes), Durango, Guerrero, Hidalgo, Michoacán, Morelos, Oaxaca (las dos vertientes), San Luis Potosí, Tabasco, Veracruz. Casi desde el nivel del mar hasta lugares muy altos. Localidad más alta conocida: Aldea Berriozábal, municipio de Motozintla Chiapas, 1,920 msnm.
<i>An. fausti</i>	San Luis Potosí. Única localidad: Tlapexhuacán, Tamazunchale, San Luis Potosí, 110 msnm.
<i>An. freeborni</i>	Baja California Norte, Sonora. Localidad de mayor altitud conocida: Imuris, Sonora, 852 msnm.
<i>An. gabaldoni</i>	Chiapas (vertiente del Golfo de México), Tabasco, Veracruz. Sólo en localidades de baja altitud; la más alta conocida es Salto de Agua, Chiapas, 518 msnm.
<i>An. hectoris</i>	Chiapas. Sólo en las localidades de más de 1,200 msnm. Una de las más altas es San Cristobal de las Casas, Chiapas, 2,128 msnm.
<i>An. hermsi</i>	Baja California, Rosarito y Ensenada.
<i>An. neivai</i>	Chiapas y Veracruz (Córdova, Veracruz, 924 msnm).
<i>An. neomaculipalpus</i>	Chiapas (vertiente del Pacífico), Tabasco, Veracruz. Sólo en localidades de poca altitud; la más alta que se conoce es finca. La Esmeralda, Pueblo Nuevo, Chiapas, 650 msnm.

<i>An. parapunctipennis</i>	Chiapas, Morelos, Oaxaca, Veracruz, Sólo en lugares altos, a más de 1,200 msnm sobre el nivel del mar. La localidad más alta es Lagunas de Zempoala, Morelos, 2,820 msnm.
<i>An. franciscanus</i>	Baja California Norte y Baja California Sur.
<i>An. pseudopunctipennis</i>	En todas las entidades estatales del país, desde el nivel del mar hasta la Altiplanicie. Uno de los lugares más altos es Tacuba, D.F., 2,270 msnm.
<i>An. pseudopunctipennis willardi</i>	Aguascalientes, Chihuahua, Coahuila, Hidalgo, Sonora, Zacatecas. Localidad de mayor altitud conocida: Madera, Chihuahua, 2,079 msnm.
<i>An. punctimacula</i>	Campeche, Chiapas, (las dos vertientes), Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Tabasco, Veracruz. Desde la costa hasta lugares como Jalapa, Veracruz 1,427 msnm
<i>An. punctipennis</i>	Aguascalientes, Chihuahua, Coahuila, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Michoacán, Nayarit, Nuevo León, Querétaro, Tamaulipas, Veracruz. Principalmente en la Altiplanicie, zonas bajas cerca de la costa.
<i>An. quadrimaculatus</i>	Nuevo León, San Luis Potosí, Tamaulipas, Veracruz. Sólo en lugares de poca elevación en la costa del Golfo de México. La más alta es Ciudad Victoria, Tamaulipas, 321 msnm
<i>An. strodei</i>	Veracruz. En lugares bajos de la costa como a 60 msnm
<i>An. vestitipennis</i>	Campeche, Chiapas, (las dos vertientes), Quintana Roo, San Luis Potosí, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán. En lugares próximos al nivel del mar. El más alto es Tamasopo, San Luis Potosí, 350 msnm.
<i>An. walkeri</i>	Veracruz. Única localidad: Pánuco, Veracruz, 20 msnm

<i>An. xelajuensis</i>	Oaxaca. Única localidad conocida: Galera Vieja, entre Ixtlán y Tepanzacoalco, Oaxaca, 2,400 msnm.
------------------------	---

Nombre: Cuauhtémoc Villarreal Treviño
Licenciatura Ing. Agrónomo Parasitólogo. ITESM. Campus Mty. 1980 - 1984
Maestría En Ciencias especialidad en Sanidad Vegetal. ITESM Campus Mty
1985 - 1988.

SISTEMA NACIONAL DE INVESTIGADORES

Candidato a Investigador 1992 - 1996
Investigador Nacional Nivel 1 1996 - 2002

EXPERIENCIA EN INVESTIGACION

Jefe del Departamento de Biología de Vectores

Investigador Asociado C.

Instituto Nacional de Salud Pública / Centro de Investigación de Paludismo. 1989 -

PUBLICACIONES:

Rodríguez, M. H., D. N. Bown, J. I. Arredondo-Jiménez, C. Villarreal T., E.G. Loyola, and C. E. Frederickson. 1992. Gonotrophic cycle and survivorship of *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) in southern México. J. Med. Entomol. 29 (3): 395-399.

Arredondo- Jiménez J.I., D.N. Bown, M. H. Rodríguez, C. Villarreal, E. G. Loyola, and C. Frederickson. 1992. Test for the existence of genetic determination or conditioning in host selection by *Anopheles albimanus* (Diptera : Culicidae). J. Med. Entomol. 29:894-897.

Arredondo-Jiménez, J. I., Loyola E.G., Rodríguez M.H. Danis-Lozano R., Fuentes G., Villarreal C. 1993b. Efectividad de un insecticida carbamato en rociado intradomiciliar a bajo volumen para el control del paludismo. Salud Pub. Mex. 35: 27-38.

Rodríguez, M. H., E.G. Loyola, A. F. Betanzos, C. Villarreal, D. N. Bown. 1994. Tratamiento focal usando quimioprofilaxis y rociado intradomiciliar con insecticidas para el control del paludismo en el sur de México. Gaceta Médica de México. 130: (5).

Chan, A. T., M. H. Rodríguez, J. A. Torres, M. Del C. Rodríguez and C. Villarreal. 1994. Susceptibility of three laboratory strain of *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) to coinidgenous *Plasmodium vivax* southern México. J. Med. Entomol. 31: 400-403.

Villarreal T. C., G. F. Maldonado, M. H. Rodríguez and B. Yuval. 1994. Low rates of multiple fertilization in parous *Anopheles albimanus*. J. Am. Mosq. Control Assoc. 10: 67-69.

Villarreal T. C., M.H. Rodríguez, D.N. Bown, J.I. Arredondo-Jiménez. 1995. Low volume application by mist-blower compared with conventional compression sprayer treatment

of houses with residual pyrethroid to control the malaria vector *Anopheles albimanus* in México. *Med. Vet. Entomol.* 9: 187-194.

Villarreal T. C., J. I. Arredondo-Jiménez, M. H. Rodríguez and A. Ulloa. 1998. Colonization of *Anopheles pseudopunctipennis* from México. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*

Gonzalez-Cerón, L., M.H. Rodríguez, Jose C. Nettel, Cuauhtemoc Villarreal T., Kevin C. Kain and Juan E. Hernández. 1999. Differential susceptibilities of *Anopheles albimanus* and *Anopheles pseudopunctipennis* to infection with coindigenous *Plasmodium vivax* variants VK210 and VK247 in southern México. *Infection and Immunity* 410 – 412.

Rodríguez, M. H., L. G. Cerón, J. E. Hernández, J. A. Nettel, Cuauhtémoc Villarreal T., Kevin C. Kain, and Robert A. Wirtz. 2000. Different prevalences of *Plasmodium vivax* phenotypes VK210 and VK247 associated with the distribution of *Anopheles albimanus* and *Anopheles pseudopunctipennis* in Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 62(1) 122 – 127.

CAPITULOS DE LIBROS:

Villarreal, T.C., J. I. Arredondo, M.H. Rodríguez. 1998a. Bionomía de los principales vectores del paludismo en México. A cien años del descubrimiento de Ross. El paludismo en México. Ed. Jesús Kumate y A. M. Palomo. El Colegio Nacional. 149 – 161.

Areas de Interés: Genética de poblaciones, taxonomía clásica y molecular, comportamiento de insectos y resistencia a insecticidas en vectores de paludismo.



