

AÑO 2018

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Anopheles*
SUBGÉNERO *Nyssorhynchus*, UTILIZANDO EL GEN CITOCROMO C
OXIDASA SUBUNIDAD I COI-BARCODE EN ZONAS ENDEMICAS PARA
MALARIA EN EL DEPARTAMENTO DE CORDOBA.**

Autor: Maria Caludia Atencia Pineda

RESUMEN

Los mosquitos del género *Anopheles* son considerados vectores de malaria en todo el mundo, de las nueve especies incriminadas como vectores primarios, seis pertenecen al subgénero *Nyssorhynchus*; y al menos doce especies son consideradas vectores secundarios. Taxonómicamente, las especies del subgénero *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) son extremadamente difíciles de diferenciar con base en caracteres anatómicos, generando posibles consecuencias en la efectividad de los programas de control vectorial. Frente a esta situación se hace necesario realizar una adecuada identificación taxonómica de las especies del subgénero *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) como criterio fundamental para la incriminación vectorial, la medición del riesgo epidemiológico y el desarrollo de programas de control.

Objetivo. Caracterizar la secuencia nucleotídica del gen *COI* en mosquitos del subgénero *Anopheles* (*Nyssorhynchus*), presentes en ocho veredas y/o corregimientos del departamento de Córdoba.

Materiales y Métodos. Se secuenciaron 267 productos de PCR del gen *COI* de procedentes de xxx especies del subgénero *Anopheles* (*Nyssorhynchus*). Las secuencias obtenidas y el alineamiento consenso se usaron para estimar matrices de distancia genética intraespecífica e interespecífica, utilizando el software MEGA 7. También se estimaron los parámetros de diversidad genética DH , π y las pruebas de neutralidad utilizando el programa DnaSP v5; las redes de haplotipos por especies fueron inferidas con el programa NETWORK v5. Los estimadores de diferenciación genética F_{ST} y flujo génico Nm se calcularon con el programa ARLEQUIN v3.5 y el árbol de relaciones filogenéticas se construyó mediante inferencia bayesiana con el modelo de sustitución nucleotídica HKY + G en el programa MrBayesv3.

Resultados. Las especies identificadas por medio de la secuencia del gen *COI* fueron *An. nuneztovari*, *An. albimanus*, *An. triannulatus*, *An. oswaldoi* B, *An. darlingi*, *An. janconnae*, *An. malefactor* y *An. pseudopuctipennis*. Las distancias genéticas intraespecífica e interespecífica oscilaron entre 0 - 0.9% y 6.1-15.8% respectivamente. Se hallaron 9 haplotipos para *An. nuneztovari*, 14 para *An. albimanus*, 44 para *An. triannulatus* y 5 para *An. oswaldoi* B; las especies con los valores más alto de diversidad genética fueron *An. albimanus* ($DH= 0.918$; $\pi= 0.003$), *An. triannulatus* ($DH= 0.902$; $\pi= 0.005$) y *An. oswaldoi* B ($DH= 0.900$; $\pi= 0.009$). Las pruebas de neutralidad Tajima'D y Fu's F_s arrojaron valores negativos, sugiriendo que las

poblaciones de *An. nuneztovari*, *An. albimanus* y *An. triannulatus* pasaron por un proceso de expansión poblacional. Los valores obtenidos en los estimadores de diferenciación genética F_{ST} y flujo génico Nm , en general para las especies *An. nuneztovari*, *An. albimanus* y *An. triannulatus* indican que las poblaciones de estas especies son genéticamente semejantes. El análisis bayesiano muestra cada especie como un clado monofilético y reveló dos linajes genéticos para *Anopheles nuneztovari*, *Anopheles oswaldoi* B, *Anopheles triannulatus*. **Conclusión.** El gen mitocondrial *COI* es una herramienta útil para la identificación taxonómica molecular certera de las especies de subgénero *Anopheles* (*Nyssorhynchus*); pero además permite realizar estudios de diversidad genética, estructura poblacional y análisis filogenético, aspectos importantes para la epidemiología y el control de la malaria.

PALABRAS CLAVES:, subgénero *Anopheles* (*Nyssorhynchus*), *COI*, Barcode, identificación taxonómica y diversidad genética.

ABSTRACT

The mosquitoes of the genus *Anopheles* are considered vectors of malaria in the whole world, of the nine species incriminated as primary vectors, six belong to the subgenus *Nyssorhynchus*; However, in this subgenus at least twelve species are considered secondary vectors. But the species of the subgenus *Nyssorhynchus* are extremely difficult to differentiate morphologically, generating possible consequences in the effectiveness of vector control programs. Therefore, it is necessary to make an adequate taxonomic identification of the *Anopheles* species as a fundamental criterion for vectorial incrimination, the epidemiological risk measurement and the development of control programs. **Objective.** Molecular characterization of the *COI* gene in *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) useful for the molecular taxonomic identification of the species, found in eight villages and/or rural areas of the department of Córdoba. **Materials and methods.** 267 PCR products of the *COI* gene of *Anopheles* species were sequenced. Sequences obtained and alignment consensus, were used to estimate intraspecific and interspecific genetic distance matrices, using MEGA 7 software. The genetic diversity parameters DH , π and the neutrality tests were also estimated using the DnaSP v5 program; the haplotype networks by species were inferred with the NETWORK v5 program. The estimators of genetic differentiation F_{ST} and gene flow Nm were calculated with the program ARLEQUIN v3.5 and the tree of phylogenetic relationships was constructed by Bayesian inference with the model of nucleotide substitution HKY + G in the program MrBayesv3. **Results.** The species identified by sequence of the *COI* gene were *An. nuneztovari*, *An. albimanus*, *An. triannulatus*, *An. oswaldoi* B, *An. darlingi*, *An. janconnae*, *An. malefactor* and *An. pseudopuctipennis*. Intraspecific and interspecific genetic distances ranged between 0 - 0.9% and 6.1-15.8% respectively. We found 9 haplotypes for *An. nuneztovari*, 14 for *An. albimanus*, 44 for *An. triannulatus* and 5 for *An. oswaldoi* B; the species with the highest genetic diversity values were *An. albimanus* ($DH = 0.918$, $\pi = 0.003$), *An. triannulatus* ($DH = 0.902$, $\pi = 0.005$) and *An. oswaldoi* B ($DH = 0.900$; $\pi = 0.009$). The

neutrality tests Tajima'D and Fu's F_s yielded negative values, suggesting that the populations of *An. nuneztovari*, *An. albimanus* and *An. triannulatus* went through a process of population expansion. The values obtained in the estimators of genetic differentiation F_{ST} and gene flow Nm , in general for the species *An. nuneztovari*, *An. albimanus* and *An. triannulatus* indicate that the populations of these species are genetically similar. The Bayesian analysis shows each species as a monofiletico clade and revealed two genetic lineages for *Anopheles nuneztovari*, *Anopheles oswaldoi* B, *Anopheles triannulatus*. **Conclusion.** The mitochondrial gene *COI* is a useful tool for accurate molecular taxonomic identification of *Anopheles* species; but it also allows for studies of genetic diversity, population structure, and phylogenetic analysis, important aspects for the epidemiology and control of malaria.

KEY WORDS: *Anopheles*, *Nyssorhynchus*, *COI*, Barcode, taxonomic identification and genetic diversity.