



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

**Aplicación de redes de haplotipos para estudios
genético espaciales del complejo de especies
Lutzomyia longipalpis (Díptera: Phlebotomínae),
utilizando la región mitocondrial COI**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO
Presentado ante la ilustre Universidad
Central de Venezuela, por la bachiller
Ana Teresa Ramos Herrera como
requisito para optar al título de
Licenciado en Biología.

CARACAS, VENEZUELA

MAYO – 2015



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

**Aplicación de redes de haplotipos para estudios
genético espaciales del complejo de especies
Lutzomyia longipalpis (Díptera: Phlebotomínae),
utilizando la región mitocondrial COI**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO
Presentado ante la ilustre Universidad
Central de Venezuela, por la bachiller
Ana Teresa Ramos Herrera como
requisito para optar al título de
Licenciado en Biología, mención
Ecología. Tutor: PhD. Jazzmín
Arrivillaga. Asesor académico: PhD.
Yadira Rangel

CARACAS, VENEZUELA

MAYO – 2015



ACTA

Los abajo firmantes, miembros del jurado designado por el Consejo de la Escuela de Biología para examinar el Trabajo Especial de Grado de la bachiller, Ana Teresa Ramos Herrera, CI: 18460691, titulado “Aplicación de redes de haplotipos para estudios genéticos espaciales del complejo de especies *Lutzomyia longipalpis* (Díptera: Phlebotominae), utilizando la región mitocondrial COI”, nos hemos reunido hoy, 12 de Mayo de 2015, en la Sala Guillermo Ruggeri de la Escuela de Física, perteneciente a la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, para atender a la defensa pública de su trabajo, después de lo cual consideramos que amerita la calificación de **Diez y Nueve (19)** puntos. Certificamos así que este Trabajo especial de Grado cumple con los requisitos exigidos por la Universidad Central de Venezuela para optar al título de Licenciado en Biología.

Prof. Hernán Carrasco (IMT-UCV)

Jurado

Prof. Palmira Guevara (IBE-UCV)

Jurado

Profa. Jazzmín Arrivillaga (USB)

Tutora

Prof. Yadira Rangel (IZET-UCV)

Asesor Académico

DEDICATORIA

A Dios por su infinita bendición y amor.

A mí, Ana Teresa Ramos Herrera, por mi dedicación, esfuerzo y por lograr superar este reto que me propuse hace varios años. Porque este logro sea un ejemplo de lo que puedo hacer, de que puedo superar cualquier obstáculo y de que puedo alcanzar cualquier meta que me proponga, con esfuerzo, sacrificio y valor.

A mis padres Ana Herrera y Carlos Ramos por todo lo que me han dado, por su amor, cariño y dedicación.

A mis hermanos Jose Alberto y Carlos Oswaldo por estar a mi lado, y amarme sobre todas las cosas.

A mis tíos Amarilis y Carlos Luis, y a mi prima hermana Andrea, por su amor y confianza.

A mi familia, por su amor y colaboración, en especial a mí amada abuela Silvia.

A esas personitas que fueron y siguen siendo muy importantes en mi vida, y que un día dejaron de acompañarme físicamente para convertirse en esos ángeles maravillosos que cada día me cuidan y protegen, en especial a mis 2 grandes amigos Ucevistas Carlos Monasterios (mi MT) y a César Molina, por su amistad, cariño y buenos momentos compartidos.

Ustedes sin duda han sido mi mayor motivación, inspiración y fuente de felicidad a lo largo de mi vida. Gracias.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por haberme permitido culminar con éxito uno de mis proyectos de vida.

A la Universidad Central de Venezuela, por haberme abierto sus puertas y permitir que venciera las sombras.

A mis formadores, quienes no solo fueron mis profesores y me ayudaron a superar obstáculos educativos, sino que también fueron mis amigos, me impulsaron y me ayudaron a mejorar como persona, en especial a Laura Delgado, Jesús Romero, Ernesto González y Ernesto Fuenmayor.

A mi Tutora Jazzmín Arrivillaga y a mi Asesora académica Yadira Rangel, por sus conocimientos, orientación y asesoría. Ellas fueron quienes me guiaron a lo largo de este Trabajo Especial de Grado con paciencia y sabiduría, me enseñaron, me aconsejaron, y se convirtieron en más que mis tutoras, en mis amigas, fueron personas fundamentales para culminar con éxito este proyecto. En especial agradezco a la profesora Jazzmín Arrivillaga por haberme aceptado en el Laboratorio de Ecología Molecular de Insectos Vectores, de la Universidad Simón Bolívar, donde pude desarrollar este trabajo.

A mis padres por darme la vida, por su entrega, dedicación, sacrificio, por ser mis grandes guías y mis pilares, por cuidarme, amarme, confiar en mí y apoyarme durante toda mi vida. A mis hermanos por su amor, cariño y apoyo, por su amistad y hermandad. A mis tíos Amarilis y Carlos Luis por abrirme las puertas de su casa, ser mis segundos padres, por quererme, apoyarme y ayudarme a avanzar, por haberme brindado su confianza y amor. A mis primos Andrea y Carlos Roberto por ser mis hermanos, por ser mis amigos, por darme todo su cariño y apoyarme siempre. A mi familia Ramos, Herrera, Boza, Abzueta y Martínez, y por haberme apoyado durante todo lo que llevo de vida, por quererme, cuidarme, y estar presentes cuando los necesité, por sus consejos y enseñanzas.

A mis amigas Yamila, Kenia y María de los Ángeles por haberme acompañado y apoyado desde el principio de la carrera, haberme ayudado a avanzar, por haberse convertido en más que mis amigas mis hermanas, por aconsejarme y darme ánimos en los momentos difíciles, por haberme brindado su cariño y amistad incondicional, sencillamente por ser parte fundamental de este logro. A mis amigos Marijul, Phenelope, Jennire, Lorena, Rubmary, Michelle, Bartolo, Manu, Piña, Joxmer, Ñañel, Gabo, Renny, Marwill, Maga, Raiza, Yayfré, Maybe, Grecia, Ruth, Bea, Albertoto, Migue, Nelson, Iker, Mariana, Javi, Gustavo, Solmar, a mi grupito de computistas del amper, por su amistad, por su apoyo, por sus buenos consejos, por esas largas noches de estudio, por su compañía en las salidas de campo en tardes de risas, los viajes, por su cariño y comprensión, por lo vivido y compartido, por todos los buenos momentos.

A mi querido Danny Gomes, por abrirme las puertas del cafetín, por haberme adoptado durante casi toda la carrera, por permitirme compartir con él buenos momentos y un excelente café, por haber aguantado mis lloraderas cuando me sentía mal, cuando no salía como esperaba en algún trabajo, cuando me caí de un autobús, o simplemente cuando tenía ganas de llorar, por haberme aconsejado y brindarme su amistad y su cariño incondicional, además porque gracias a él pude compartir grandes momentos con mis amiguitos los Físicos del cafetín, con Jose Enrique, Junger, Maricarmen, María Lourdes, Yaya, y todo esto acompañado de un divino cafecito o una rica manzanilla.

A mis amigos de la USB, Tatiana, Gabo, Miguel y Arianna, por haberme ayudado y guiado en estos últimos años, por atender a mis llamados a altas horas de la noche, por resolver muchas dudas que se me presentaron, y haberme brindado su amistad a pesar del poco tiempo de conocernos. A Víctor por su cariño, por su afecto, por su empuje, sus palabras de aliento, por impulsarme a mejorar y a no desfallecer cuando sentía que no podía más, por haber aguantado todas mis lloronas en la USB cuando algo no me salía bien, y brindarme ese cafecito que mejoraba mi ánimo, por su amistad incondicional y confianza.

A Richard Hoyos y María Angélica Contreras por su asesoría, ayuda, por su colaboración y guía cuando estuve realizando pasantías en el Laboratorio de Biología y Sistemática de Insectos de la Universidad de Colombia, sede Medellín. También a Yenny y a su familia, a Doris, Andrés, Lina y a Isabel, por su colaboración y hacer más placentera mi estadía en Medellín.

Gracias a todos, por todo.

ÍNDICE GENERAL

	Páginas
Índice de figuras	x
Índice de tablas	xii
Resumen	xiii
Abreviaturas	xiv
CAPÍTULO	
I. INTRODUCCIÓN, MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES	
1.1 Introducción	1
1.2 Marco Teórico	4
1.2.1 Conceptos de Especie	4
1.2.2 Biogeografía: la dimensión espacial de la evolución	5
1.2.3 Filogeografía	7
1.2.4 Redes de Haplotipos	9
1.2.5 ADN mitocondrial	11
1.3 Antecedentes	14
1.3.1 Estudios Moleculares del ADN mitocondrial en el complejo <i>Lu. longipalpis</i> .	17
1.3.2 Variación genética de cito b vs COI dentro del complejo <i>Lu. longipalpis</i> con fines de estudios de distribución genética espacial	18
1.3.3 Genes mitocondriales y su uso en estudios filogeográficos del complejo <i>Lu. longipalpis</i> .	18
1.3.4 Filogeografía basada en métodos filogenéticos ó filogeografía <i>sensu stricta</i> .	19
1.3.5 Filogeografía con métodos de distribución genética espacial ó filogeografía no <i>sensu stricta</i> .	19
1.3.6 Otras aplicaciones de redes de haplotipos o filogeografía no <i>sensu stricta</i> dentro de <i>Lutzomyia longipalpis sensu lato</i> .	21
1.3.7 Uso de redes de haplotipos para el estudio de otras especies de flebotomíinos, distintas de <i>Lu. longipalpis</i> , usando marcadores mitocondriales.	25

II.OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1 Hipótesis	27
2.2 Objetivos	27
2.2.1 Objetivo General	27
2.2.2 Objetivos Específicos	27

III. METODOLOGÍA

3.1 Muestra Biológica	28
3.2 Base de datos	31
3.3 Alineamiento de secuencias de ADN	33
3.4 Análisis molecular de las secuencias de ADN	33
3.4.1 Conversión del formato de alineamiento	33
3.4.2 Conversión del formato .MEG a .PHY	33
3.5 Redes de haplotipos	34
3.6 Trazos panbiogeográficos	35
3.7 Secuencias consenso	35

IV.RESULTADOS

4.1 Base de datos	36
4.2 Alineamiento de secuencias de ADN	37
4.3 Análisis molecular de las secuencias de ADN	37
4.4 Haplotipos	38
4.5 Redes de haplotipos	39
4.5.1 Red de Haplotipo con secuencias de <i>Lu. longipalpis sensu lato</i> y <i>Lu.pseudolongipalpis</i> .TCS1.21.	39
4.5.2 Comparación de Redes de Haplotipo con secuencias de <i>Lu. Longipalpis sensu lato</i> y <i>Lu. pseudolongipalpis</i> , hechas a través de Network, vs hechas por TCS.21.	42
4.5.3 Comparación de Redes de Haplotipo con secuencias de <i>Lu.</i>	

<i>Longipalpis sensu lato</i> , hechas a través de Network, vs hechas por TCS.21.	43
4.5.4 Análisis filogeográfico sensu estricto (Arrivillaga y col. (2002) vs Análisis filogeográfico mediante Redes de Haplotipo.	44
4.6 Trazos Panbiogeográficos	47
4.7 Secuencias consenso	49
V.DISCUSIÓN	52
Hipótesis filogeográfica	56
VI.CONCLUSIONES	59
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
ANEXO 1	69
ANEXO 2	70

Índice de figuras

		Pp.
Figura		
1	Red mínima de haplotipos en las que se muestran las conexiones entre haplotipos de <i>Culex quinquefasciatus</i> obtenidos con el gen mitocondrial COI.	10
2	Red haplotípica partiendo de las secuencias del gen ND4 de poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> de Sincelejo y Guaranda. Colombia.	11
3	Estructura del ADN mitocondrial de un invertebrado, del orden Díptera, género <i>Drosophila</i> .	13
4	Marcador molecular utilizado para la sistemática molecular de flebótomos.	15
5	Descripción general de los genes COI y COII, con localización de nucleótidos en Dípteros como en <i>Drosophila yakuba</i> .	16
6	Diagrama del gen indicando la dirección del cebador y la secuencia parcial amplificada.	17
7	Red de haplotipos de mínima expansión de poblaciones de <i>Lutzomyia longipalpis</i> .	20
8	Árbol filogenético Neighbor-Joining de secuencias de <i>Lutzomyia longipalpis</i> de la localidad de Sobral.	22
9	Dendograma construido según los criterios propuestos en la Bauzer y col., 2002b, con 1000 replicas de bootstrap.	23
10	Red de haplotipos de secuencias de <i>Lu. longipalpis</i> de Estrella de Alagoas.	24
11	Redes de haplotipos de las poblaciones brasileñas de <i>Lu. longipalpis</i> y <i>Lu. cruzi</i> .	25
12	Red de haplotipos de la región 12S en individuos de 4 localidades venezolanas.	26
13	Red de genotipos usando la región 28 S.	26
14	Ubicación geográfica de poblaciones de <i>Lutzomyia longipalpis</i> utilizadas en los análisis de ADN mitocondrial.	29
15	Árbol filogenético producido por PAUP 4.0b2 basados en la secuencia del	

	locus mitocondrial COI.	30
16	Fragmentos de Secuencias de ADN para 13 poblaciones del complejo <i>Lutzomyia longipalpis</i> . 18 haplotipos únicos.	32
17	Formato de las secuencias para usarlas en DnaSP 5.	33
18	Base de datos realizada para 18 haplotipos.	36
19	Imagen de una fracción del alineamiento convertido en un archivo .MEG.	37
20	Fracción del alineamiento en CLUSTALW	37
21	Red haplotípica fragmentada con secuencias de <i>Lu. longipalpis</i> y <i>Lu. pseudolongipalpis</i> utilizando 30 mutaciones.	39
22	Red haplotípica fragmentada con secuencias de <i>Lu. longipalpis</i> y <i>Lu. pseudolongipalpis</i> utilizando 35 mutaciones.	40
23	Red haplotípica con secuencias de <i>Lu. longipalpis</i> y <i>Lu. pseudolongipalpis</i> utilizando 48 mutaciones.	41
24	Comparación de redes de haplotipos utilizando especies del complejo <i>Lu. longipalpis sensu lato</i> y <i>Lu. pseudolongipalpis</i>	42
25	Comparación de redes de haplotipos utilizando especies del complejo <i>Lu. longipalpis sensu lato</i> .	43
26	Árbol filogenético (A) vs Red de haplotipos (B) realizados con base en secuencias de ADN del complejo <i>Lutzomyia longipalpis</i> .	44
27	Red haplotípica Network proyectada en mapa de localidades del complejo <i>Lutzomyia longipalpis</i> .	48
28	Trazo individual para poblaciones del complejo <i>Lutzomyia longipalpis</i>	48
29	Distribución de los tipos de bosques asociados a Brasil.	54
30	Vegetación de Caatinga y Curarigua sobre la Red haplotípica	55
31	Modificación de la hipótesis filogeográfica propuesta por Arrivillaga en 2003.	57
32	Hipótesis filogeográfica propuesta por Arrivillaga (2003).	57

Índice de tablas

		Pp.
Tabla		
1	Marcadores moleculares utilizados para la sistemática molecular de flebótomos.	15
2	Sitios de información de 12 poblaciones de <i>Lutzomyia longipalpis</i> .	28
3	Frecuencia de haplotipos del Citocromo c oxidasa I, en 12 poblaciones del complejo <i>Lu. longipalpis</i> .	29
4	Información copilada para la realización de la base de datos.	31
5	Información de los haplotipos utilizados para estudios del complejo <i>Lu. longipalpis</i> , con base en redes de haplotipo	38

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
Licenciatura en Biología
Mención Ecología

APLICACIÓN DE REDES DE HAPLOTIPOS PARA ESTUDIOS GENÉTICO
ESPACIALES DEL COMPLEJO DE ESPECIES *Lutzomyia longipalpis* (DÍPTERA:
PHLEBOTOMÍNAE), UTILIZANDO LA REGIÓN MITOCONDRIAL COI.

Autor: Br. Ana Teresa Ramos Herrera
Tutor: PhD. Jazzmín Arrivillaga
Asesor académico: PhD. Yadira Rangel

RESUMEN

El complejo de especies *Lutzomyia longipalpis*, es el grupo más importante perteneciente a la familia de dípteros Psychodidae, denominados comúnmente como flebotomíneos ó flebótomos y considerado como importante transmisor de la *Leishmania chagasi*, parásito causante de la Leishmaniasis Visceral Americana (LVA). El complejo de especie, tiene distribución Neotropical, está conformada por dos especies morfológicas: *Lutzomyia pseudolongipalpis* (Arrivillaga y Feliciangeli, 2001) y *Lutzomyia longipalpis sensu lato* (Lutz y Neiva, 1912). *Lutzomyia longipalpis s. l.* está conformado por cuatro (4) especies filogenéticas, que se diferencian genéticamente con base en marcadores moleculares, tales como, la región mitocondrial COI, y marcadores quasi-diagnósticos como la izoenzima Glucosa Fosfato Isomerasa (GPI). Hasta la fecha, los estudios moleculares con *L. longipalpis s. l.*, habían tenido un enfoque de genética de poblaciones y filogenéticos, pero no se habían realizado estudios sobre la variabilidad genética mitocondrial de las especies en toda su distribución geográfica. El objetivo de este trabajo es evaluar la distribución espacial de la variabilidad genética en el complejo *Lu. longipalpis*, utilizando 343 secuencias con 540 pb del gene mitocondrial Citocromo C Oxidasa I (COI), de doce localidades de 6 países, Colombia, Costa Rica, Brasil, Honduras y Venezuela con base en métodos de filogeografía no *sensu stricta*, como son las redes de haplotipo. Los resultados mostraron la congruencia con los resultados filogenéticos y la presencia de cuatro especies (A, B, C y D). La distribución y conexión de los haplotipos sugieren la relación de la orogénesis andina con la especiación simpátrida del grupo andino y la dispersión de las especies a los ecosistemas terrestres de cada región en el grupo Brazilian

Palabras claves: complejo *Lutzomyia longipalpis*, ADN, redes, haplotipos, distribución genética, distribución espacial, sensu lato, COI.

ABREVIATURAS

Ae.: *Aedes*

ARNt: Acido ribonucleico de transferencia

ARNmt: ARN mitocondrial

COI: Citocromo C Oxidasa región I

H:Haplotipo

L.: *Leishmania*

Lu.: *Lutzomyia*

LV: leishmaniasis visceral

s. l.: *sensu lato*

SIG: Sistema de información geográfica

CAPITULO I

1.1 INTRODUCCIÓN

Los flebotomíneos neotropicales son un grupo diverso de dípteros, con amplia distribución geográfica y con similaridad morfológica y ecológica entre la mayoría de sus especies. En el neotrópico este grupo de insectos está compuesto por 865 especies distribuidas en 3 géneros según la clasificación convencional (Young y Duncan, 1994), el género dominante por su distribución geográfica y abundancia es *Lutzomyia*. Dentro de este género, el complejo de especies *Lutzomyia longipalpis*, es el grupo más importante en el área Neotropical por su capacidad vectorial (Bejarano, 2006).

Según Corredor y col. (1989), esta especie es considerada como principal vector de la Leishmaniasis visceral (LV) Americana causada por el parásito *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Lainson y col., 1977), parásito considerado por muchos autores como una variante geográfica de *Leishmania (L.) infantum*, conocida como el agente etiológico de la LV en el área del mediterráneo (Bofante-Garrido y col., 2007).

Lutzomyia longipalpis, fue descrita inicialmente como una especie simple desde material biológico colectado en Brasil por Lutz y Neiva (1912), y nominado como *Phlebotomus longipalpis*. Luego, fue renombrada por Franca en 1920 como *Lutzomyia longipalpis*, con base en el material facilitado por el Doctor Adolpho Lutz (Mangabeira, 1969). Esta especie según la clasificación de Young y Duncan (1994) pertenece a la clase insecta por tener tres pares de patas, al orden Díptera por tener un par de alas, a la familia Psychodidae por el tipo de espermateca que presenta, a la subfamilia Phlebotomínae por tener la probóscide más larga que la cabeza, y al género *Lutzomyia* por tener alas en forma de V, y presentar una sutura interocular. Su distribución geográfica va desde el sur de México hasta el norte de Argentina colectándose frecuentemente en ecosistemas terrestres tipo bosque semideciduo, como una especie abundante (Young y Duncan, 1994).

Después de la descripción taxonómica de *Lutzomyia longipalpis*, esta fue considerada como un complejo de especies conformada por dos o más taxones, basándose en diferencias morfológicas entre los machos, con base en una mancha pálida encontrada en el tercer y cuarto tergo abdominal de éstos, según Mangabeira (1969). Posteriormente, se demostró

que estas manchas tergaes eran sitios de producción de varios tipos de feromonas, sugiriéndose como un segundo carácter fenotípico que podría tener peso en las diferencias genético poblacionales (Ward y col., 1983; 1985; 1988; Hamilton y col., 1996; Hamilton y Ward, 1994; González y col., 2013). Dichos autores también sugirieron que las feromonas podrían generar aislamiento reproductivos. Sin embargo, los estudios genéticos utilizando feromonas, han arrojado resultados controversiales, ya que los experimentos de Ward y col. (1986), demostraron barreras precopulatorias, mientras, los estudios de Lanzaro y col. (1993), indicaron barreras postcopulatorias. La controversia hizo cuestionable el uso del tipo de feromona como un carácter para discriminar el número de especies dentro del complejo.

Estudios isoenzimáticos y citogenéticos de la banda G, no encontraron ninguna correlación entre estructura genética y tipo de feromona, pero evidenciaron la presencia de tres poblaciones genéticas en alopatria representadas por Brasil, Colombia y Centro América. La presencia de al menos tres especies en el complejo (Lanzaro y col., 1993; Yin y col., 1999; Mutebi y col., 1999) evidencia que no hay correlación con el tipo de feromonas. Los estudios isoenzimáticos también mostraron la existencia de una población bien diferenciada genéticamente, como es la población de Curarigua en el estado Lara, al comparar poblaciones dentro de Venezuela (Arrivillaga y col., 2000a), las cuales habían mostrado variaciones morfológicas de la morfología bucal a nivel de larvas de IV estadio (Arrivillaga, 1999). Estos resultados permitieron proponer a la población de Curarigua, como la primera especie genética bien diferenciada, y fue nominada usando caracteres morfológicos no convencionales, como *Lutzomyia pseudolongipalpis* (Arrivillaga y Feliciangeli, 2001). La diagnosis de esta primera especie, dentro del complejo, permitió realizar estudios genéticos, mediante comparaciones directas entre *Lu. pseudolongipalpis*, y poblaciones pertenecientes a las tres especies genética propuestas por Lanzaro y col. (1993).

Las comparaciones directas usando isoenzimas, genes mitocondriales, específicamente el gen COI, empleando métodos filogenéticos, evidenció la existencia de una especie ancestral, previamente descrita como *Lu. pseudolongipalpis* (nominada antes como especie B, Curarigua, La Rinconada), de la que derivan filogenéticamente cuatro especies

filogenéticas basadas en la monofilia de los clados y en la presencia de marcadores isoenzimáticos que las diferencian. Estas cuatro especies genéticas han sido consideradas en el presente trabajo como especies genéticas válidas alopátridas: especie A (Brasil), especie C1 (Colombia), especie C2 (Venezuela, no incluye *Lu. pseudolongipalpis*), especie D (Centro América) con una historia filogeográfica asociada a deriva continental e hipótesis biogeográfica de vicarianza (Arrivillaga y col., 2002; 2003). Ver anexo 1.

Durante el presente trabajo de investigación referiremos taxonómicamente al complejo como *Lu. longipalpis sensu lato* (Arrivillaga, 2009; Arrivillaga y Marrero, 2009) debido a que, a pesar de conseguir diferencias morfológicas, todavía las especies del complejo no han sido descritas (Arrivillaga, 2003).

Arrivillaga y col. (2002), sugirieron que la estructuración genética del complejo *Lutzomyia longipalpis* es el resultado de eventos vicariantes que ocurrieron durante el período Plioceno-Pleistoceno, los cuales sugieren que el levantamiento inicial de la Cordillera Andina del Este resultó la formación del linaje Laraensis, que de la formación del Río Amazonas y el levantamiento progresivo del CAE resultó la formación de un linaje brasilero y otro sub- andino, y que del levantamiento máximo de la Cordillera Andina del este, el cambio de drenaje del Río Amazonas y la conexión con el istmo de Panamá resultaron otros tres linajes contemporáneos Brasiliensis, cis- andino y trans-andino. Con base en esta hipótesis filogeográfica y con la finalidad de mejorarla, en el presente trabajo se evaluó la distribución geográfica de la varianza genética de este grupo de especies, usando métodos de genética espacial, empleando redes de haplotipos como una herramienta filogeográfica no *sensu stricta*.

1.2 MARCO TEÓRICO

1.2.1 Conceptos de Especie

Las especies son el resultado de procesos evolutivos, por lo tanto, el concepto de especie debe ser consistente con la teoría evolutiva. Se considera que la evolución es el resultado de una serie de transformaciones parciales, o completas, e irreversibles de la composición genética de las poblaciones, debidas principalmente a las interacciones de los organismos con el ambiente (Aguilera y col., 1997). A lo largo de la historia se han propuestos muchas definiciones de especie, algunas de ellas a continuación:

Concepto de Especie Biológica: también llamado por Simpson en 1961, de Especie genética. Este concepto se basa en que las especies están formadas de poblaciones con una realidad y cohesión genética, lo cual conduce a establecer que los miembros de una especie posean las características para conformar una unidad reproductiva, ecológica y genética, estableciendo entonces, que “las especies son grupos de poblaciones naturales de entrecruza que se producen aisladamente de otros grupos” (Valencia, 1991).

Concepto de Especie Evolutiva: se define como un linaje (una secuencia ancestro-descendiente de poblaciones) que evoluciona separadamente de otras y con sus propias tendencias y su propio papel evolutivo unitario (Valencia, 1991).

Concepto de Especie Ecológica: fue propuesto por Van Valen en 1976 con base en el concepto de especie evolutiva. Define a la especie como un linaje (o juego de linajes estrechamente relacionados) que ocupa una zona adaptativa mínimamente diferente de algún otro linaje en su rango y la cual evoluciona separadamente de todos los linajes fuera de su rango” (Valencia, 1991).

Especie Filogenética es una definición que ha surgido bajo dos conceptos diferentes, uno propuesto por Cracraft en 1978 y Ereshefsky en 1989, el cual define a una especie filogenética como “un grupo irreducible de organismos, en los cuales hay un patrón parental de ancestralidad y descendencia, que es diagnósticamente distinto del de otros grupos, así, las especies son taxas basales diferenciados”. Y otro concepto propuesto por

Mishler y Donoghue en 1982, y más tarde retomado por Mishler y Brandon (1987), quienes lo definen como “el taxón inclusivo más pequeño reconocido en clasificación, en el cual los organismos son agrupados por su evidencia de monofilia (generalmente, pero no restringidos a la presencia de sinapomorfías), que es categorizado como especie por ser el linaje importante más pequeño que se juzga digno de reconocimiento formal, donde importante se refiere a la acción de aquellos procesos que son dominantes en producir y mantener linajes en un caso particular (Valencia, 1991).

Concepto de Especie Cladista: Ridley lo define como “grupo de organismos entre dos eventos de especiación, o entre un evento de especiación y uno de extinción o de aquellos que son descendientes de un evento de especiación” (Valencia, 1991).

Basándonos en el concepto de especie biológica, *Lu. longipalpis* representa un complejo de especies donde existe aislamiento reproductivo, lo que conlleva a catalogarlas como varias especies. Bajo el concepto evolutivo se llega a una conclusión similar, dadas las diferencias morfológicas y de comportamiento que definen al complejo. Sin embargo, actualmente sólo se puede usar con certeza el concepto filogenético que involucra a varias especies filogenéticas separadas en varios clados con significativa divergencia nucleotídica, debido a que la relación de ancestralidad y descendencia hace que cada grupo pertenezca por derivación a un mismo linaje único, y que separa históricamente y reproductivamente a una especie de otra, por una historia de vida distinta sin importar el fenotipo.

1.2.2 Biogeografía, la dimensión espacial de la evolución.

La biogeografía es la disciplina de la biología comparada que estudia la distribución espacio temporal de los seres vivos y los diversos factores que dieron lugar a tal distribución. En la disciplina pueden reconocerse dos vertientes, la biogeografía ecológica y la biogeografía histórica, de donde parte la filogeografía. Con el desarrollo de modernas herramientas computacionales, como los Sistemas de Información Geográfica (SIG) que permiten realizar análisis espaciales de la información biológica, la biogeografía ha tenido una revolución que la ha hecho más eficiente metodológicamente (Contreras-Medina, 2006).

Un estudio biogeográfico puede tener varias etapas y en cada una puede intervenir la aplicación de alguna de las diferentes metodologías contemporáneas, donde el análisis de la distribución geográfica de los taxones bajo estudio puede llevar al reconocimiento y delimitación de áreas de endemismo y riqueza mediante un análisis geográfico. Mediante un análisis Panbiogeográfico se pueden determinar las homologías espaciales entre los taxones, así como una hipótesis de las relaciones históricas entre las áreas que habitan los taxones; y por el análisis de Parsimonia de Endemismos (PAE) y biogeografía cladística se pueden indicar las relaciones de área con la secuencia de su fragmentación (Contreras-Medina, 2006).

A pesar que se ha considerado a la panbiogeografía y a la biogeografía cladística como programas de investigación en competencia, ambos métodos pueden ser complementarios y utilizarse como diferentes fases dentro de un mismo análisis biogeográfico, donde las homologías biogeográficas de los taxones son obtenidas a partir de un trazo generalizado de la panbiogeografía y con la biogeografía cladística se obtiene la secuencia de fragmentación de las áreas involucradas en el trazo. (Morrone y Crisci, 1995).

Los trazos se entienden como la línea de unión de un par de áreas de distribución disyunta de taxones; se llama trazos generalizados al gran número de trazos individuales que coinciden en sus trayectorias, y su evidencia implica la existencia de procesos que operan sobre conjuntos de especies de distribución geográficamente semejante, bajo una causa común: la vicarianza (Espinosa y col., 2005).

Los patrones biogeográficos se manifiestan en varias formas: 1. Por las diferencias en las riquezas de especies entre un lugar y otro. 2. Por la adaptación de los organismos al ambiente dando lugar a razas geográficas. Por ejemplo, se han propuesto reglas ecogeográficas que predicen variaciones en el tamaño del cuerpo y apéndices, y en patrones de coloración entre individuos de diferentes poblaciones de la misma especie, de acuerdo a la variación del clima (Llorente y col., 2000).

1.2.3 Filogeografía.

La filogeografía es el estudio de los principios y procesos que rigen la distribución geográfica de los linajes genealógicos, especialmente los que están dentro y entre las especies estrechamente relacionadas (Avice, 1987). La filogeografía se ocupa de estudiar los componentes históricos y filogenéticos de la distribución espacial de los linajes genéticos y requiere para su análisis e interpretación a varias disciplinas micro y macroevolutivas, tales como, la genética molecular una amplia contribución de la genética molecular, genética de poblaciones, la etología, la demografía, la biología, la paleontología, la sistemática filogenética, la geología y la geografía histórica, es por esto que se considera a la filogeografía como la unión de diversas disciplinas micro y macroevolutivas (Avice, 2000).

La filogeografía parte de la idea de que la gran mayoría de las especies en la naturaleza exhiben cierto grado de estructura genética asociada con la historia geográfica. Esta estructura puede ser muy compleja, ya sea porque las especies habitan áreas de fuerte actividad tecto-volcánica o paleoclimática, o de menos complejidad, como el caso de poblaciones con tasas altas de migración o cuyo aislamiento, es relativamente reciente, geológicamente. Además es utilizada como una herramienta para: 1. Esclarecer patrones históricos y evolutivos entre poblaciones de una misma especie. 2. Inferir procesos demográficos históricos como flujo génico, tamaño efectivo poblacional, secuencias de colonización, cuellos de botella. 3. Para determinar fronteras entre especies e identificar unidades de conservación (Dominguez-Dominguez y col., 2009).

Los estudios filogeográficos en especies animales se basan principalmente en secuencias de ADN mitocondrial (ADNmt) porque presenta heredabilidad materna, no hay recombinación, tiene alta tasa de mutación y divergencia rápida para evaluar variabilidad intraespecífica (Lanteri y col., 2003). Adicionalmente no hay existencia de selección natural sobre la organela mitocondrial, existe una sola copia genómica, y es de fácil aislamiento y conservación de estructura (Arrivillaga, 2003). Las variantes de ADNmt, conocidas como haplotipos, registran la historia matrilineal de eventos mutacionales, los cuales pueden conectarse de un modo filogenéticamente intangible en un filograma o mejor llamado, árbol de genes. En los árboles de la filogeografía, dicho filograma es superpuesto

con la distribución geográfica de las poblaciones de estudio, lo que permite hacer una descripción de la reconstrucción filogeográfica (Avice, 2000; 2008).

Si se trabaja con muestras de genes nucleares provenientes de individuos que tienen o han tenido flujo génico, es probable que haya ocurrido recombinación genética durante el apareamiento de cromosomas homólogos en la meiosis, que pueda desvirtuar las genealogías de las secuencias. Por tal razón, la mayoría de los trabajos de filogeografía utilizan marcadores de herencia citoplasmática no mendeliana como el ADNmt, en organismos vegetales el ADN de los cloroplastos (ADNcp), o marcadores nucleares en donde se haya comprobado que exista poca o ninguna recombinación genética (Lanterí y col., 2003).

La mayor parte de los estudios filogeográficos se basan en estudios de secuencias de ADN, sin embargo, los primeros trabajos sobre filogeografía realizados cuando las técnicas de secuenciación no eran tan accesibles, fueron hechos con otro tipo de información, por ejemplo, la que proveen los fragmentos de restricción, y una de las técnicas más utilizadas ha sido la RFLP (Polimorfismos para la longitud de fragmentos de restricción) sobre ADNmt total (Lanterí y col., 2003).

Entre los estudios de insectos vectores que utilizaron técnicas filogeográficas se encuentra el de Brenière y colaboradores (2012). Los autores exploraron en Bolivia la distribución geográfica y el papel epidemiológico de las poblaciones silvestres de *Triatoma infestans*, vector de la enfermedad de Chagas. Ellos aplicaron herramientas de biología y genética molecular a los vectores de *Trypanosoma cruzi* el agente de la enfermedad, para determinar el origen de la sangre consumida por los triatominos y su infección por *T. cruzi*. Los estudios filogeográficos de las poblaciones silvestres de *Triatoma infestans* revelaron un posible origen andino de la especie, en la ecoregión del “Chaco Serrano” en Bolivia y además evidenció la amplia distribución de las poblaciones del triatomino silvestre.

Otro estudio filogeográfico fue el realizado por Villanueva y Saldamando en 2013, con *Tecia solanivora*, un insecto del orden Lepidóptera reportado por primera vez en Centroamérica, el cual fue causante de daños graves en cultivos de papa. La filogeografía mostró los impactos económicos reflejados en el estudio del origen y dispersión en la

especie a través de los países, sus implicaciones en los cultivos y las estrategias para controlar su impacto. Los enfoques más importantes son el filogeográfico y genético de poblaciones de *Tecia solanivora*, ya que les permitieron implementar medidas de manejo efectivas.

1.2.4 Redes de Haplotipos

La filogeografía utiliza con mayor frecuencia métodos de reconstrucción filogenética, y métodos filogenéticos tradicionales. A diferencia de los árboles bifurcados tradicionales, las redes de haplotipo permiten describir las relaciones evolutivas en forma de árboles multifurcados, en los cuales un único haplotipo puede dar origen a muchos haplotipos arreglados a manera de redes. Dichas redes son conocidas como redes mínimas de haplotipos, en otras palabras, las conexiones entre haplotipos son dadas por el mínimo número posible de mutaciones entre ellos. Debido a que se trabaja con filogenias de haplotipos a nivel intraespecífico, pueden presentar muy poca variación e implican un tiempo evolutivo mucho menor (Vázquez y col., 2009; Dominguez-Dominguez y col., 2009).

Las conexiones entre los haplotipos representan eventos coalescentes, y pueden hacerse a partir de la red de parsimonia predicciones como:

- Los haplotipos con mayor frecuencia tienen alta probabilidad de ser alelos ancestrales.
- Los haplotipos que tienen múltiples conexiones muy probablemente son ancestrales.
- Dentro de la red, los haplotipos ancestrales son de interior y los haplotipos nuevos tienen mayor probabilidad de ser periféricos de extremos.
- Se espera que los haplotipos ancestrales tengan una amplia distribución geográfica (básicamente porque los individuos que tienen esos haplotipos han tenido mayor tiempo para dispersarse);
- y los haplotipos con una única conexión se prevé estén unidos a haplotipos de la misma población (dado que han evolucionado recientemente y por lo tanto sin tiempo para dispersarse) (Vázquez y col., 2009).

En el año 2012, Quintero y Navarro hicieron estudios de filogenia intraespecífica y variabilidad genética de *Culex quinquefasciatus* con los genes ND5 y COI, realizando redes de haplotipos con secuencias mitocondriales de esta especie, colectados en 9 localidades (cementeros) de Venezuela. Los estudios sugirieron alta homogeneidad genética inter-poblacional y una sola entidad filogenética (monofilia). Las redes de haplotipo (fig. 1) mostraron poblaciones en expansión con alta variabilidad haplotípica, heterogeneidad genética intrapoblacional y homogeneidad inter poblacional, con implicaciones evolutivas en la dispersión de sus poblaciones, evidencia de posible cuello de botella en poblaciones producto de marcadas campañas de aplicación de insecticidas, lo cual se transforma en información útil para la planificación de futuras estrategias de control sanitario.

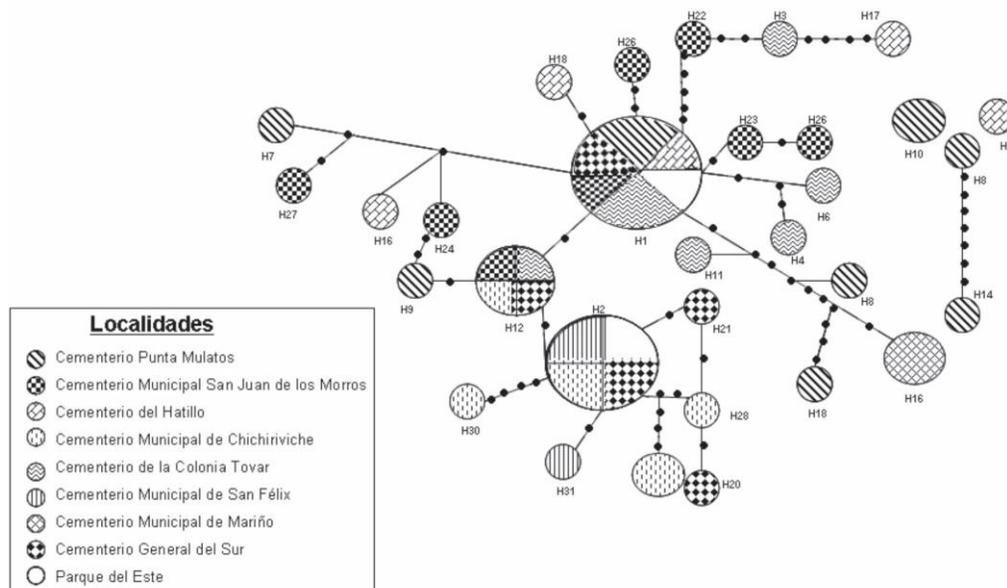


Figura 1. Red mínima de haplotipos en las que se muestran las conexiones entre haplotipos de *Culex quinquefasciatus* obtenidos con el gen mitocondrial COI. Tomado de Quintero y Navarro, 2012.

En el año 2013 se realizaron varios trabajos en poblaciones colombianas de *Aedes aegypti*, utilizando el método de redes de haplotipo. Uno de estos fue el realizado por Caldera y colaboradores (2013), quienes buscaban determinar la variabilidad genética del gen mitocondrial ND4 que codifica para la subunidad 4 de la enzima NADH-deshidrogenasa entre poblaciones de *Ae. Aegypti* de los municipios de Sincelejo y Guarandadel departamento Sucre de Colombia, donde se registra alta y baja incidencia de dengue,

respectivamente. Los autores realizaron análisis moleculares y construyeron la red de haplotipo (fig. 2), obteniendo que existe diferenciación genética y un limitado intercambio de genes entre las poblaciones estudiadas y concluyen que las poblaciones son genéticamente divergentes. Gráficamente pudo observarse la relación genealógica que tienen los haplotipos estudiados, además infieren que el haplotipo 1 (H1) fue uno de los primeros introducidos y posteriormente extiende su distribución en el departamento de Sucre con pérdida de variabilidad haplotípica.

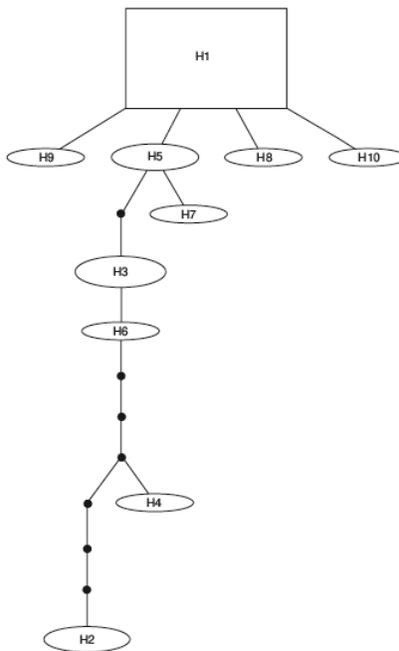


Figura 2. Red haplotípica partiendo de las secuencias del gen ND4 de poblaciones de *Ae. aegypti* de Sincelejo y Guaranda, Colombia. Tomado de Caldera y col., 2013.

1.2.5 ADN mitocondrial

La utilización de regiones mitocondriales y el análisis de su contenido informativo, ha sido empleado en estudios a nivel de especie en diferentes invertebrados como insectos, gasterópodos, mamíferos, aves, reptiles y anfibios para el análisis evolutivo de variación intraespecífica y diversidad genética (Quiñonez, 2011). En los flebotómios los estudios moleculares con genes mitocondriales tiene aproximadamente más de una década y la primera especie estudiada fue el complejo de especie *Lutzomyia longipalpis* utilizando marcadores moleculares como la subunidad Deshidrogenasa 4 (NADH4), las regiones I y II

del gen Citocromo Oxidasa, la unidad larga ribosomal (LRU), el Citocromo B, el NADH1 y el RNA de transferencia, también han sido utilizados en estudios de otras especies del género *Lutzomyia* como por ejemplo, *Lu. evansi* y *Lu. Whitmani* (Uribe y col., 1999), *Lutzomyia columbiana* (Pérez-Doria y col., 2008).

El gen mitocondrial Citocromo C Oxidasa I fue propuesto como Identificador universal de especies mediante la técnica de código de barras genético para mejorar el proceso de identificación taxonómica (Lanteri, 2007). Actualmente, es usado como marcador en especies de diferentes grupos como en Hemípteros (Cuellar, 2014), Bivalvos (Velasco y col., 2006), Moluscos (Congrains, 2010), entre otras. El Citocromo B al igual que el COI, además de insectos ha sido usado para la identificación de otras especies en diferentes grupos, como por ejemplo en Rodentia (Abud, 2011; Da Silva, 2011).

El ADN mitocondrial es una molécula circular covalentemente cerrada, conformada por un total de 37 genes, que tiene un alto grado de polimorfismo y una alta tasa de sustitución de nucleótidos en muchos taxa (Quintero y Navarro, 2012). En los insectos, está constituido por una sola molécula circular de ADN de doble cadena, con una longitud aproximada de 16 kb. Posee 13 genes que codifican para proteínas involucradas en el transporte de electrones y fosforilación oxidativa, representados por 3 subunidades del complejo Citocromo C oxidasa (COI, COII, COIII), 2 subunidades de la ATPasa (ATPasa 6, ATPasa 8), 7 subunidades del complejo NADH deshidrogenasa (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6) y 1 subunidad que hace parte del complejo Citocromo c reductasa, denominado Citocromo b (fig. 3). Además, el genoma mitocondrial contiene 22 genes que codifican para ARN de transferencia usados para la traducción de los ARN mensajeros mitocondriales y 2 genes ARN que codifican para la subunidad larga y subunidad pequeña ribosomal (LRU y SRU) relacionadas con el ensamblaje de proteínas. La región control, no codificante, en esta molécula, es conocida en los insectos como la región rica en adenina y timina (A+T-rich), a través de la cual el núcleo controla la replicación, transcripción y traducción mitocondrial (Bejarano, 2001).

1.3 ANTECEDENTES

La sistemática molecular es uno de los campos de más rápida expansión en la biología y sin embargo nuestra comprensión de los patrones de evolución de carácter molecular, siguen siendo relativamente superficiales. El análisis de los datos moleculares ha demostrado ser importante para la comprensión de las relaciones filogenéticas profundas, examinando la estructura de la población de una especie, el diagnóstico y la delimitación de especies crípticas. El uso de caracteres moleculares para agilizar la identificación de especies ha demostrado ser útil, eficaz, porque se puede lograr usando sólo un pequeño número de diferencias moleculares. Sin embargo, la delimitación de las especies requiere “idealmente” datos de diversas fuentes como la morfología, comportamiento y varios marcadores moleculares. Usando sólo caracteres mitocondriales, se han generado debates polémicos recientes, porque se han enfocado particularmente a la luz de la creciente popularidad de los proyectos como el Consorcio para el Código de Barras de la Vida (Roe y col., 2007).

Para la sistemática molecular de flebotomíneos, ha habido una gran cantidad de publicaciones que han utilizado marcadores mitocondriales, como por ejemplo, el Citocromo b (Cyt b) ya sea parte o completo, el NADH1 de forma parcial, y el frecuentemente utilizado ARNt. Recientemente, el gen COI ha sido más utilizado, mientras que otros genes lo han sido con menor frecuencia, como el NADH 4 y 12S. También, se han utilizado frecuentemente los marcadores de ADN ribosomal. El uso de marcadores ribosomales nucleares no es tan frecuente (Depaquit, 2014). Ver tabla 1 y fig. 4.

Tabla 1. Marcador molecular utilizado para la sistemática molecular de flebotomos. Tomado de Depaquit, 2014

Citocromo b	50	ADNmt	75
COI	16		
NADH 1	2		
NADH 4	5		
12S	2		
18S	8	ADNr	33
ITS1	1		
ITS2	20		
28S	4		
EF-alpha	6	Otros	29
Periodo	9		
Cacophony	6		
Otros	8		
Total	137		137

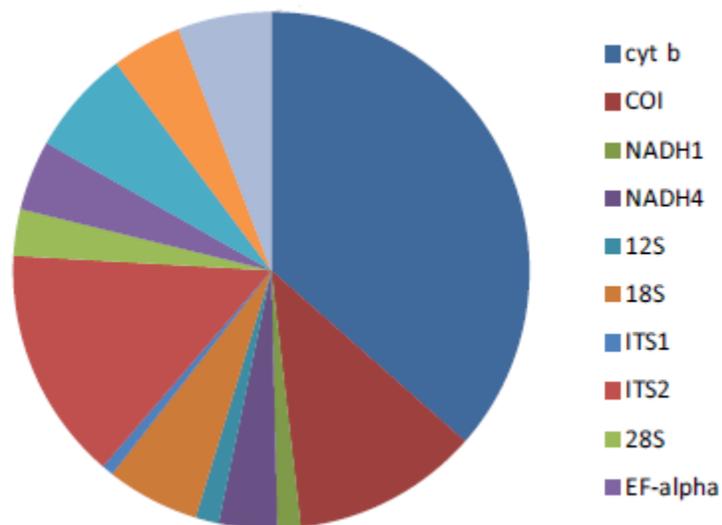


Figura 4. Marcadores moleculares utilizados para la sistemática molecular de flebotomos. Tomado de Depaquit, 2014.

Aunque se han criticado muchos aspectos de los códigos de barras de ADN, sólo ha habido una discusión limitada sobre la decisión de utilizar un fragmento específico de aproximadamente 600pb, desde el extremo 5´ de la COI como la región de código de barras de ADN ya que permite obtener información más óptima. Por otra parte, ha habido poca discusión de los efectos potenciales del uso de esta región en particular sobre la delimitación de especies estrechamente relacionadas. (Roe y col., 2007).

Los genes COI y COII están compuestos de regiones intercaladas altamente conservadas, unidas a la membrana, y bucles extra membrana muy variables (Fig. 5).

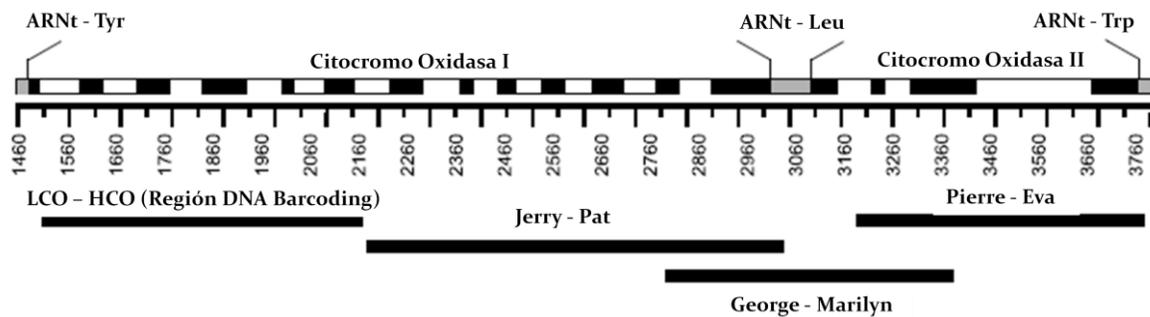


Figura 5. Descripción general de los genes COI y COII, con localización de nucleótidos en Dípteros como en *Drosophila yakuba*. Las divisiones estructurales se muestran a lo largo de la barra superior, donde los fragmentos grises indican ARNt, los blancos indican regiones unidas a la membrana, y los negros indican regiones no unidas a la membrana. Regiones COI-COII que se utilizan en la sistemática molecular de insectos se identifican por sus primers en ambas direcciones (forward y reverse). Tomado de Roe y col., 2007.

Kambhampati y col. (1995) publicaron una recopilación completa de secuencias de cebadores para la amplificación de prácticamente todos los genes codificados para el ADNmt en insectos, específicamente amplificaron porciones de los dos genes de ARNr, COI, los genes deshidrogenasas NADH 4 y NADH 5, y todo el ARNt. La amplificación de un fragmento de 590 pb del gen COI, utilizando el cebador directo (forward) CI-J-1632, y el contrario (reverse) CI-N-2191 (el cual es 3 nucleótidos más corto en el extremo 5´), se obtuvo en la mayoría de los insectos probados por Kambhanpati y col. (1995). (Fig. 6)

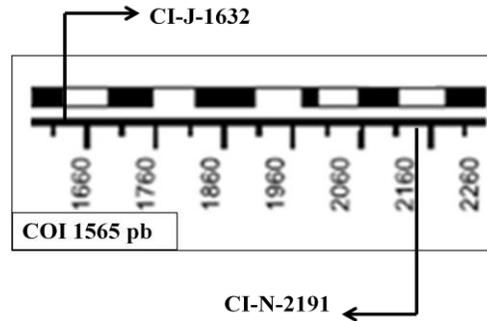


Figura 6. Diagrama del gen indicando la dirección del cebador y la secuencia parcial amplificada.

1.3.1 Estudios moleculares más relevantes del ADN mitocondrial en el complejo *Lu. longipalpis*.

En el estudio de *Lu. longipalpis* como complejo de especie, solo tres estudios moleculares han evaluado la variabilidad genética usando genes moleculares:

1-Uribe y col. (1999) analizaron tres regiones mitocondriales, Citocromo b, NADH1 y el RNA de transferencia, obteniendo cambios significativos entre las secuencias de Colombia, Costa Rica y Brasil (60–63 sustituciones nucleotídica) y bajos niveles de flujo genético cuando se utilizan parámetros de genética de poblaciones como “n” número de emigrantes por generación ($Nm = 0,081-0,1$), confirmando así la existencia del complejo *Lutzomyia longipalpis*. Siendo, el gen cito b el que mostró la mayor variación para diferenciar entre tres especies-grupos.

2-Arrivillaga y col. (2003) estudiaron tres genes mitocondriales, COI, 12S, 16S. El locus COI reveló una baja variación intra-poblacional pero una alta inter-poblacional que es revelada en cuatro clados, y refuerzan la teoría de la existencia de otras especies. Los cuatro clados tienen rangos geográficos diferentes: 1. Brasil (especie A, *Lutzomyia longipalpis sensu stricto*), 2. Lara (especie B, *Lutzomyia pseudolongipalpis*), 3. Cis-andino (especie C) que se divide en dos grupos (Colombia y Noreste de Venezuela) y 4. Trans-andino (especie D). Mientras que los estudios sobre las regiones ribosomales mitocondriales (12S y 16S), no mostraron ninguna variación genética significativa entre los linajes geográficos que fueron obtenidos con COI.

3- Hoyos y col. (2012) usando la región más variable del fragmento COI revelaron la existencia de 26 haplotipos y la presencia de varios haplotipos únicos en tres poblaciones del vector *Lu. longipalpis* en Colombia. El análisis de variabilidad nucleotídica por sitio evidenció una variabilidad intrapoblacional, derivando que las distancias genéticas (0,05 – 0,07) de ‘Neighbor-Joining’ calculadas entre haplotipos por localidad sean variables, lo que refleja una alta segregación geográfica, y divergencia filogenética.

1.3.2 Variación genética de cito b vs COI en el complejo *Lu. longipalpis* con fines de estudios de distribución genética espacial.

La región COI mostró ser la más variable a escala geográfica, representando un total de 18 haplotipos para 12 poblaciones del complejo *Lutzomyia longipalpis*, de los cuales 7 son haplotipos únicos, mientras, que la región cito B sólo reflejo la ocurrencia de 14 haplotipos. Filogenéticamente, el gen COI evidencia 5 linajes geográficos y cito b solo 4 (Uribe y col., 1999; Arrivillaga y col., 2002). Por lo cual, los estudios de diferenciación, divergencia y filogeografía se han reducido al gen COI, dentro del complejo longipalpis.

1.3.3 Genes mitocondriales y su uso en estudios filogeográficos.

El desarrollo de técnicas moleculares y el conocimiento de la molécula de ADN mitocondrial ha contribuido a la consolidación de los análisis filogeográficos. La filogeografía trabaja con los componentes históricos, filogenéticos de la distribución espacial de linajes de genes, y considera como ejes el tiempo y el espacio, en los cuales (idealmente) se trazan las genealogías de estudio. Al comparar las relaciones evolutivas de los linajes con su distribución geográfica, es posible tener un mejor entendimiento de cuáles factores han influido más en la distribución de la variación genética (Dominguez-Dominguez y col., 2009).

1.3.4 Filogeografía basada en métodos filogenéticos ó filogeografía *sensu stricta*.

La filogeografía *sensu stricta* se entiende como el estudio de los principios y procesos que rigen la distribución geográfica de los linajes genealógicos a nivel intraespecífico mediante el uso de caracteres de ADN mitocondrial (Avice y col., 1987).

Específicamente dentro del complejo *Lu. longipalpis*, sólo existe un estudio filogeográfico (Arrivillaga y col., 2002) que usa la técnica de filogeografía *sensu stricta*, con métodos filogenéticos que determinan cladogramas de áreas. Los autores hicieron los estudios para 12 poblaciones de *Lutzomyia longipalpis* de Centro y sur América utilizando el gen mitocondrial Citocromo C oxidasa I (COI), obteniendo una alta variación inter-poblacional pero una baja variación intrapoblacional, sugiriendo polimorfismos en las secuencias. La reconstrucción filogenética utilizando distancia y análisis de máxima parsimonia revelaron la existencia de cuatro clados entre las poblaciones estudiadas: 1. Lara, 2. Brasil, 3. Cis-andina, 4. Trans-andina, proponiendo que cada especie representa un clado. La interpretación biogeográfica de la filogenia molecular sugirió que el proceso de especiación en el complejo *Lutzomyia longipalpis* comenzó en el Plioceno en la reserva genética sub-andina-amazónica y como resultado de la formación de la cordillera andina oriental. Sin embargo, no se ha evaluado la variabilidad del gen COI mitocondrial con otros métodos de distribución de la variabilidad genética, llamados por algunos autores como métodos filogeográficos *no sensu strictos*.

1.3.5 Filogeografía con métodos de distribución genética espacial o filogeografía *no sensu stricta*.

La filogeografía *no sensu stricta* se entiende como el estudio de la relación más parsimoniosa genealógica de secuencias de haplotipos en forma gráfica y refleja la evolución de las secuencias o haplotipos como los nodos en una red, a esta metodología se le llama también redes de haplotipo. Las redes sólo pueden ser utilizadas en las relaciones intraespecíficas porque retratan las relaciones entre las secuencias para las poblaciones en las que muchas secuencias pueden derivar del mismo genotipo ancestral. Los árboles de

expansión suponen que el ancestro común directo de los haplotipos observados está presente en la muestra (Fig. 7).

Hodgkinson y colaboradores (2003) realizaron análisis poblacionales con el marcador molecular Citocromo B y la metodología de redes de haplotipos a seis poblaciones de *Lutzomyia longipalpis* colectadas en Brasil que representan a la especie A (Arrivillaga y col., 2003). La alineación de secuencias conformada por 261 pares de bases permitió la identificación de 30 haplotipos, 21 sitios segregantes en 78 individuos. Las comparaciones por pares indicaron una estructura estadísticamente significativa entre las poblaciones del norte y sur, así como también una sub-estructuración en las poblaciones del sur. Sin embargo, a pesar de la agrupación prominente espacial para ambas poblaciones, la divergencia no fue suficiente para evidenciar a especies crípticas, que representarían partición geográfica.

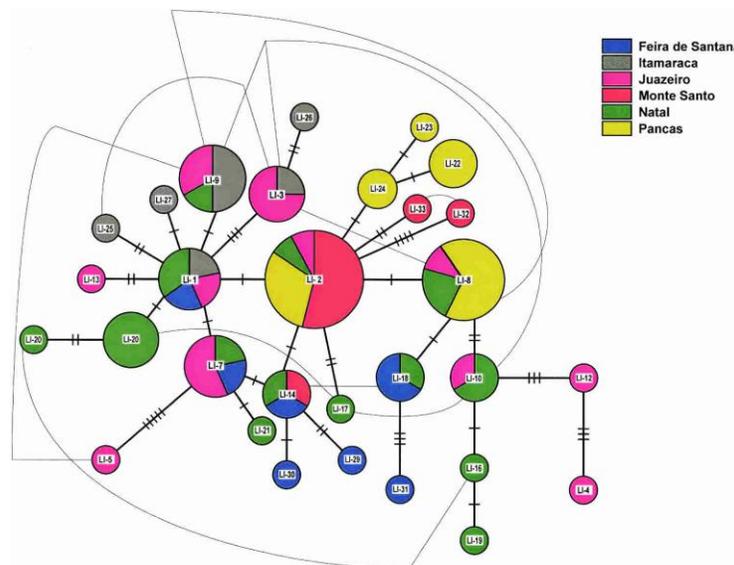


Figura 7. Red de haplotipos de mínima expansión de poblaciones de *Lutzomyia longipalpis*. Cada nodo corresponde a un haplotipo único. Los nodos están en proporción con la frecuencia del haplotipo. Cada barra transversal representa una sustitución de nucleótidos entre dos haplotipos. Tomado de Hodgkinson y col., 2003.

1.3.6 Otras aplicaciones de redes de haplotipos o filogeografía no *sensu stricta* dentro de *Lutzomyia longipalpis sensu lato*.

El gen período (*per*) es uno de los marcadores frecuentemente usado en el estudio de filogenia, procesos de especiación, aislamiento reproductivo y evolución de insectos. Dicho gen regula el batido de las alas esencial para el cortejo en Dípteros (Oliveira y col., 2001), y ha sido ligado al control de las diferencias específicas de las especies respecto a las actividades de apareamiento y cortejo a través de sonidos particulares llamados cantos de cortejo. Los fenotipos conductuales son potencialmente importantes en el mantenimiento de aislamiento reproductivo entre especies estrechamente relacionadas. Sin embargo el papel relevante del gen *per* en la especiación de mosquitos no ha sido demostrada.

Bauzer y col. (2002b) utilizaron un fragmento de 266 pb del gen *per* como marcador molecular en especies del complejo *Lu. longipalpis* para el estudio de la diferenciación entre poblaciones alopátricas de Brasil, especie A. Los resultados indicaron un alto nivel de diferenciación entre ellas. Posteriormente, usaron las mismas regiones ya diferenciadas para analizarlas a modo de comparación con dos poblaciones de Sobral, estado Ceará, y determinaron si son especies diferentes, lo que sugirió que las poblaciones del Sobral (1S y 2S) representan dos especies simpátricas diferentes. También se observó que las diferencias entre los 2 grupos eran fijas, a pesar de que el número de polimorfismos exclusivos (22 en 1S y 16 en 2S) era mayor que el número de polimorfismos compartidos (solo 6) (Fig. 8).

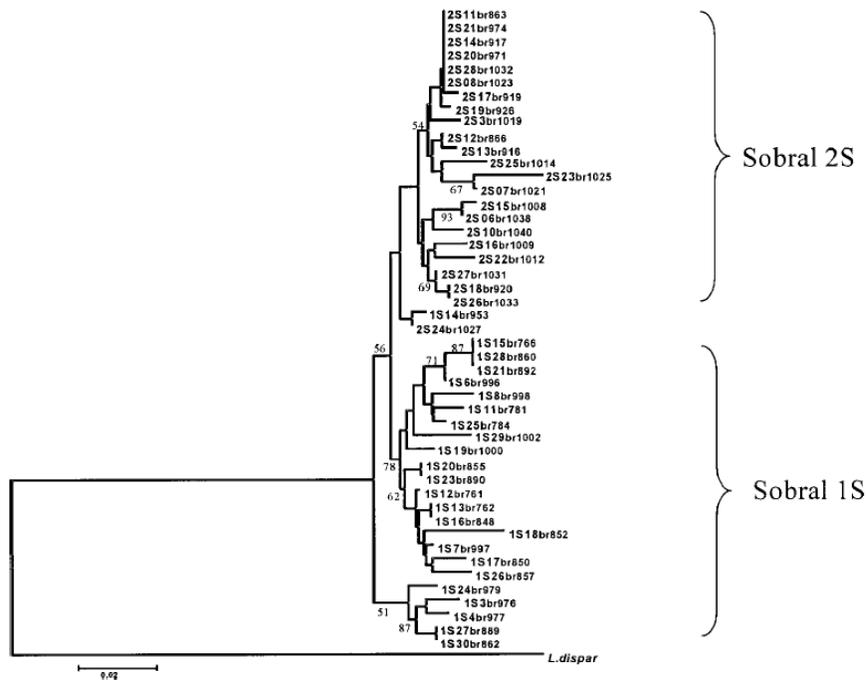


Figura 8. Árbol filogenético Neighbor-Joining de secuencias de *Lutzomyia longipalpis* de la localidad de Sobral. Tomado de Bauzer y col., 2002b.

Sin embargo, estudios filogenéticos recientes (Golczer y Arrivillaga, 2010) han sugerido que el gen *per* no resuelve filogenias intra-específicas porque no es lo suficientemente variable ni divergente para diferenciar especies cercanas filogenéticamente dentro del complejo basándose en la utilización de distintos análisis filogenéticos, empleando las secuencias utilizadas por Bauzer y col. (2002a; 2002b) y secuencias adicionales depositadas en la base de datos Gen Bank.

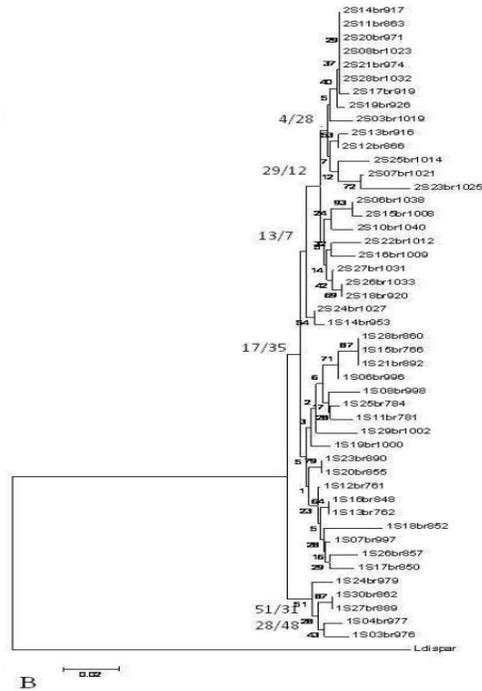


Figura 9. Dendrograma construido según los criterios propuestos en la Bauzer y col., 2002b, con 1000 replicas de bootstrap. Los soportes de las ramas basales representan los valores de Bootstrap/Jacknife, y los soportes de los nodos mas internos representan solo valores de Bootstrap. Tomado de Golczer y Arrivillaga, 2010.

Araki y col. (2009) utilizaron la metodología de redes de haplotipos, y el gen *per* como marcador genético para analizar polimorfismo molecular en muestras de *Lutzomyia longipalpis* de diferentes regiones de Brasil asociado a algunas feromonas y al canto de los machos en la copulación. Los resultados sugieren la existencia de dos grandes grupos, un grupo que representa una sola especie con machos que producen feromonas cembrene-1, cantos tipo ráfagas y un segundo grupo más heterogéneo que representa probablemente un numero incipiente de especies productoras de diferentes combinaciones de cantos tipo pulso y feromonas (Fig. 10). Estos resultados revelarían un alto nivel de complejidad en la divergencia y flujo de genes entre las poblaciones del complejo *Lutzomyia longipalpis* pertenecientes a Brasil, pero los estudios, no incluyeron poblaciones de otras especies genéticas diferentes a Brasil.

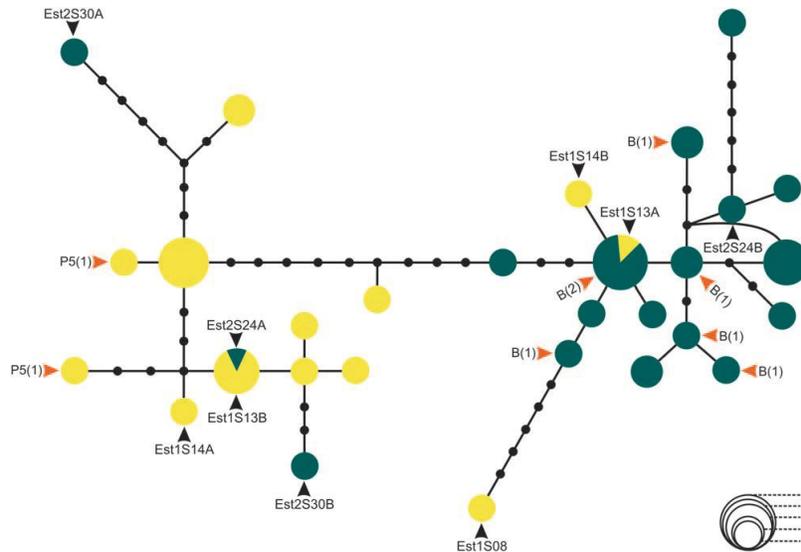


Figura 10. Red de haplotipos de secuencias de *Lu. longipalpis* de Estrella de Alagoas. Estrella 1S (amarillo) y Estrella 2S (verde), los haplotipos de individuos con canciones de copulación grabadas (B: tipo ráfaga y P5: tipo pulsación 5) y el numero de secuencias (entre paréntesis). Las líneas curvas representan ramificación alterna entre los haplotipos. Tomado de Araki y col., 2009.

Lins y colaboradores (2012) analizaron la divergencia molecular en poblaciones de *Lutzomyia longipalpis* de Brasil con un fragmento del gen *paralytic*, un locus involucrado en el control del canto tipo ráfaga y pulso en el cortejo de *Drosophila*. Los resultados revelaron un nivel muy alto de divergencia y diferencias fijas entre las poblaciones de Brasil, y sugiere que las poblaciones pueden dividirse en dos grupos principales. Asimismo, compararon *Lu. longipalpis* con una especie estrechamente relacionada, *Lutzomyia cruzi*, que produce un canto tipo ráfaga, e indicaron un mayor número de diferencias fijas entre *Lu. cruzi* y las poblaciones de *Lu. longipalpis* con canto tipo pulso. Los datos confirmaron las suposiciones previas de que las diferentes especies hermanas del complejo *Lu. longipalpis* en Brasil se pueden dividir en dos grupos principales basados en el tipo de canto que producen durante la cópulas los individuos machos, uno en representación de una sola especie, y el otro grupo más heterogéneo que representa probablemente al número de especies incipientes (Fig. 11). Además, aunque las diferencias no se fijaron entre los dos linajes observados en *per*, los pares de divergencia entre poblaciones de *Lu. longipalpis* de ambos genes están altamente correlacionados y muestran un mayor nivel de diferenciación entre los cantos tipo pulso y los tipo ráfaga. Sin embargo, no se incluyeron poblaciones de otros países en el análisis.

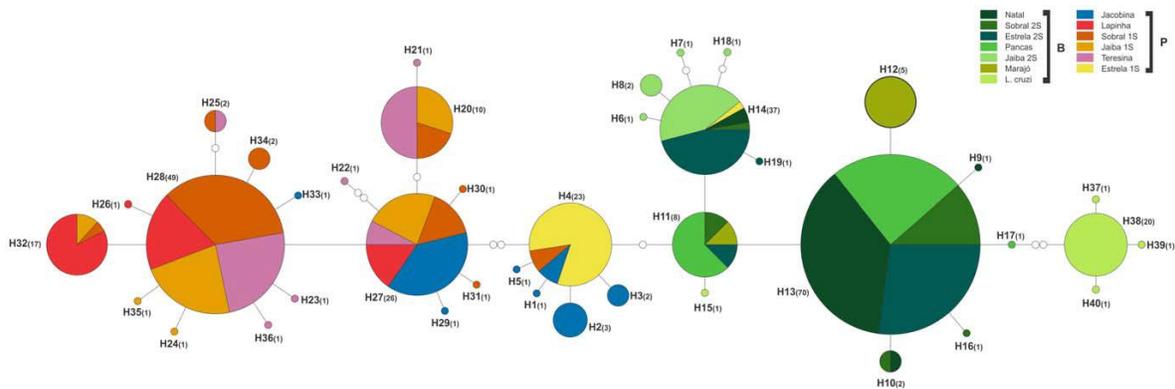


Figura 11. Redes de haplotipos de las poblaciones brasileñas de *Lu. longipalpis* y *Lu. cruzi*. Cada población es representada por un color diferente y cada nodo representa una haplotipo único. Tomado de Lins y col., 2012.

1.3.7 Uso de redes de haplotipos para el estudio de otras especies de flebotomíno, distintas de *Lu. longipalpis*, usando marcadores mitocondriales.

Golczer (2011) realizó estudios de diferenciación y divergencia filogenética en tres especies crípticas de *Lutzomyia* del grupo Verrucarum, vectores de Leishmaniasis cutánea, mediante una serie de análisis filogenéticos, cladísticos, probabilísticos, y redes de haplotipos para la región nuclear 28S, y las regiones mitocondriales 12S ribosomal, COI y NADH5. Los resultados de las redes permitieron explicar la distribución de la variación genética de los haplotipos dominantes, compartidos y únicos con base en la conectividad geográfica entre regiones de Venezuela (Mérida, Trujillo, Táchira, Aragua) a pesar de ser consideradas como tres especies morfológicas, con diferenciación a nivel de machos, e isomorfismos de las hembras (Fig. 12 y 13). Se concluye que las redes pueden ser una herramienta útil para explicar e ilustrar la conectividad entre las especies genéticas del grupo *Lu. Longipalpis sensu lato*, donde existe evidencia de diferenciación morfológica en caracteres morfológicos no convencionales de las hembras (Arrivillaga, 2003).

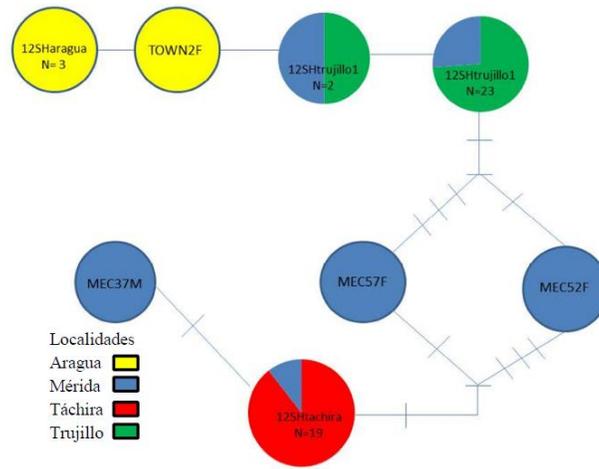


Figura 12. Red de haplotipos de la región 12S en individuos de 4 localidades venezolanas. Tomado de Golczer, 2011.

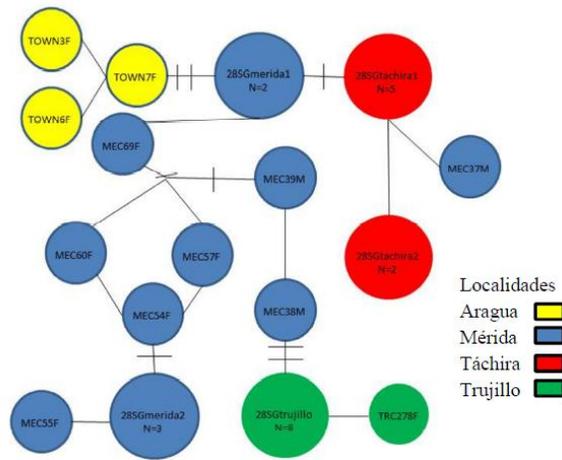


Figura 13. Red de genotipos usando la región 28S. Tomada de Golczer, 2011.

Cabe resaltar que en los estudios de variabilidad genética espacial en *Lutzomyia longipalpis*, el método de las redes de haplotipos ha sido usado sólo para evaluar genes de especiación, genes nucleares con poca señal filogenética, como el gen *per* y *paralytic*.

No existen otros trabajos sobre distribución geográfica de la variabilidad genética mitocondrial para el complejo *Lu. longipalpis*, y menos, que incluyan poblaciones de todas las especies genéticas descritas para el mismo.

CAPITULO II

2.1 HIPÓTESIS

Sí la estructura genética espacial dentro del complejo *Lutzomyia longipalpis*, evidenciada con el gen COI, representa la historia evolutiva del grupo, se esperaría la congruencia entre los métodos de distribución genética espacial con los métodos filogenéticos. Lo que demostraría que la estructura genética espacial es independiente del modelo de análisis.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo general:

Evaluar la distribución espacial de la variabilidad genética dentro del complejo *Lutzomyia longipalpis*, utilizando secuencias disponibles del gen mitocondrial Citocromo C Oxidasa I (COI), con base en métodos de filogeografía no *sensu stricto*

2.2.2 Objetivos específicos:

- Realizar redes de haplotipos con secuencias del gene COI disponibles para las cuatro especies filogenética que conforman *Lutzomyia longipalpis sensu lato*.
- Analizar la distribución de la variabilidad genética con base en las redes de haplotipos respecto a *Lu. pseudolongipalpis* como especie hermana.
- Derivar secuencias consenso para cada población genética geográfica con discontinuidad espacial dentro de *Lu. longipalpis sensu lato*.

CAPITULO III

METODOLOGÍA

3.1 Muestra biológica:

Se utilizaron 343 secuencias de ADN de la región I del gen mitocondrial Citocromo C oxidasa I (COI) con 540 pb, de *Lutzomyia longipalpis sensu lato* y *Lutzomyia pseudolongipalpis*, disponibles en el documento presentado por Arrivillaga y col. (2002, 2003), sobre filogeografía del complejo de especies *Lutzomyia longipalpis* (Tabla 3). Estas secuencias, obtenidas por los autores, pertenecen a 12 diferentes localidades de distintos países como Colombia, Costa Rica, Brasil, Honduras y Venezuela (Tabla 2 y Fig. 14). Los autores argumentan que las poblaciones fueron seleccionadas basándose en estudios isoenzimáticos que sugerían que esas poblaciones son representativas de cinco especies genéticas. Los autores realizaron la amplificación y secuenciación utilizando los cebadores universales, CI-J-1632(+): 5'-TGATCAAATTTATAAT-3' y CI-N-2191(-): 5'-GGTAAAATTTAAAATATAAACTTC-3' (Kambhupati y Smith, 1995).

Tabla 2. Sitios de información de 12 poblaciones de *Lutzomyia longipalpis*. Tomada de Arrivillaga y col., 2002.

Población	N°	Localización	País	Año	Método de captura	Región Geográfica
Liberia	39	10°38,181'N, 85°26,727'W	Costa Rica	Agosto, 1997	Aspirador manual	Sistema de montañas, América Central
Pavana	25	13°25,352'N, 87°20,19'W	Honduras	Julio, 1995	Aspirador manual	Sistema de montañas, América Central
Curarigua	39	9°59'N, 69°55'W	Venezuela	1996-1999	Trampa CDC	Depresión Lara (Final de la Cordillera andina) limitada por el norte con el Sistema coreano de montañas, Cuenca Falcón.
Trujillo	32	9°25'N, 70°30'W	Venezuela	1997-1998	Trampa CDC	Este de la Cordillera andina, Mérida
Bucaramanga	38	7°08'N, 73°09'W	Colombia	Junio, 1993	Aspirador manual	Este de la Cordillera andina, parte media del río Magdalena
Neiva	12	2°56'N, 75°18'W	Colombia	Junio, 1993	Aspirador manual	Este de la Cordillera andina, por alta del río Magdalena
Roraima	28	5°30'N, 60°40'W	Brasil	1999	Aspirador manual	Escudo Guayanés, Montañas Pakaraima
Santarem	13	2°26'S, 54°41'W	Brasil	Agosto, 1997	Aspirador manual	Río Amazonas
Salvaterra	34	0°46'S, 48°31'W	Brasil	Agosto, 1997	Aspirador manual	Delta del Río Amazonas
Baturite	32	4°20'S, 38°53'W	Brasil	Agosto, 1997	Aspirador manual	Matorral brasileño
Jacobina	16	11°11'S, 40°31'W	Brasil	Agosto, 1997	Aspirador manual	Cuenca San Francisco
Lapinha	35	19°03'S, 43°57'W	Brasil	Noviembre, 1997	Aspirador manual	Escudo Brasílerio

Tabla 3. Frecuencia de haplotipos del Citocromo c oxidasa I, en 12 poblaciones del complejo *Lutzomyia longipalpis*. Tomada de Arrivillaga y col., 2002

Population	N	Haplotypes																	
		Curarigua 6	Curarigua 2	Curarigua 10	Trujillo 12	Trujillo 10	Salvaterra	Santarem 46	Santarem 49	Jacobina	Baturite	Roraima 1	Roraima 2	Lapinha 53	Bucaramanga 90	Bucaramanga 86	Neiva 25	Liberia 63	Pavana 1
Pavana	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25
Liberia	39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	39	-
Neiva	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	-	-
Bucaramanga	38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	35	3	-	-	-	-
Lapinha	35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	35	-	-	-	-	-	-
Roraima	28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25	3	-	-	-	-	-	-	-
Baturite	32	-	-	-	-	-	-	-	-	32	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jacobina	16	-	-	-	-	-	-	-	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Santarem	13	-	-	-	-	-	12	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salvaterra	34	-	-	-	-	34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Curarigua	39	36	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trujillo	32	-	-	-	30	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

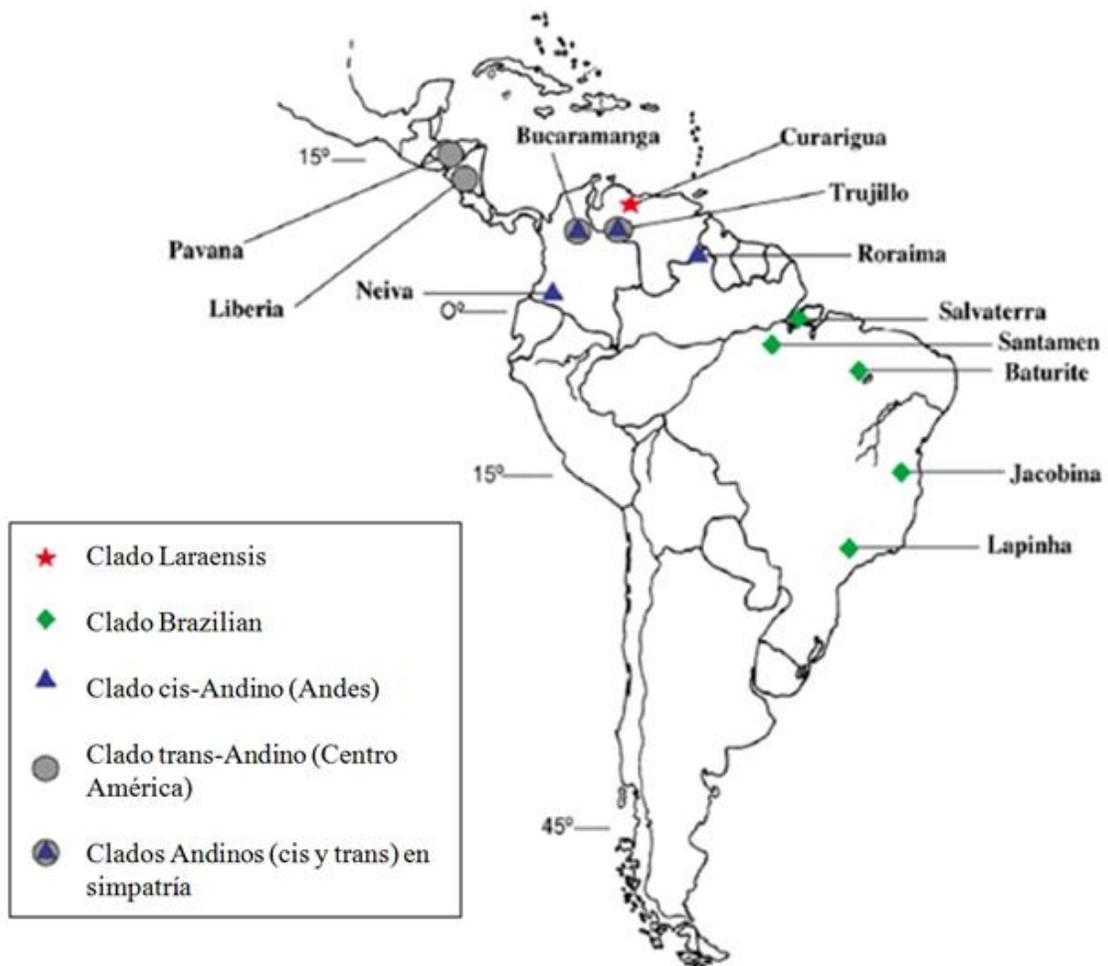


Figura 14. Ubicación geográfica de poblaciones de *Lutzomyia longipalpis* utilizadas en los análisis de ADN mitocondrial. Los símbolos indican las asociaciones de poblaciones individuales con los clados a los que pertenecen. Tomado de Arrivillaga y col., 2002.

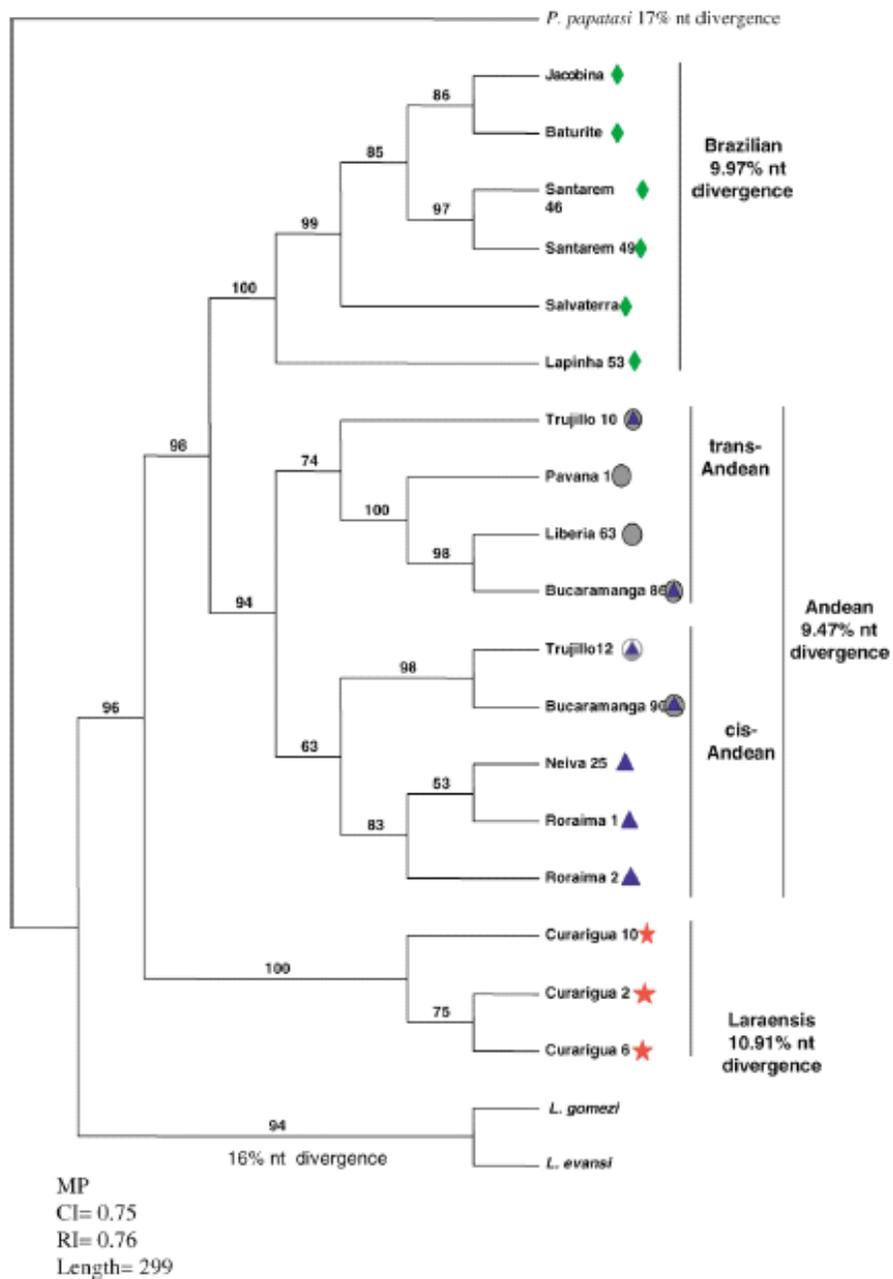


Figura 15. Árbol filogenético producido por PAUP 4.0b2 basados en la secuencia del locus mitocondrial COI. Para las secuencias COI, el estricto consenso de 10 árboles se muestra sobre la base de 131 caracteres sinapomórficos. Índice de consistencia 0.75 en 299 pasos. Las figuras geométricas corresponden a las localidades indicadas en el mapa de la figura 11. Tomado de Arrivillaga y col., 2002.

3.2 Base de datos.

Se armó y estructuró un archivo de texto con todas las secuencias obtenidas por Arrivillaga y col. (2002; 2003) (fig. 16), organizándolas por frecuencia de los haplotipos, por especie y por región geográfica (Tabla 4). El archivo de texto de las secuencias de ADN se estructuró tomando de Arrivillaga (2002; 2003), cada secuencia de 9 fragmentos obtenidos de cada haplotipo, repitiéndolo para los 18 haplotipos encontrados en las 12 poblaciones muestreadas, y a su vez, repitiendo la secuencia tantas veces como apareció el haplotipo. Al organizarlo por especie, se estructuró como Especie A, B, C (C1 y C2) y D. Se hizo así según el formato requerido por el programa CLUSTALW (Li, 2003) para el posterior alineamiento de las secuencias.

Tabla 4. Información copilada para la realización de la base de datos.

País	Localidad	N° de individuos	Nombre de Haplotipos	Frecuencias de H
Brasil	Baturité	32	Batur0	32
Brasil	Jacobina	16	Jacob0	16
Brasil	Lapinha	35	Lapi530	35
Brasil	Roraima	28	Rora10	25
			Rora20	3
Brasil	Santarém	13	Sant460	12
			Sant490	1
Brasil	Salvaterra	34	Salva0	34
Colombia	Bucaramanga	38	Buca860	3
			Buca900	35
Colombia	Neiva	12	Nei250	12
Costa Rica	Liberia	39	Libe630	39
Honduras	Pavana	25	Pava10	25
Venezuela	Curarigua	39	Cura10	1
			Cura20	2
			Cura60	26
Venezuela	Trujillo	32	Truj100	2
			Truj120	30

1										50										251										300									
jacobina										jacobina										jacobina										jacobina									
Cu10										Cu10										Cu10										Cu10									
Cu2										Cu2										Cu2										Cu2									
Cu6										Cu6										Cu6										Cu6									
La53										La53										La53										La53									
Tru10										Tru10										Tru10										Tru10									
Tru12										Tru12										Tru12										Tru12									
Pa1										Pa1										Pa1										Pa1									
Li63										Li63										Li63										Li63									
Bu86										Bu86										Bu86										Bu86									
Bu90										Bu90										Bu90										Bu90									
beturite										beturite										beturite										beturite									
ne25										ne25										ne25										ne25									
ro1										ro1										ro1										ro1									
ro2										ro2										ro2										ro2									
santa46										santa46										santa46										santa46									
santa49										santa49										santa49										santa49									
salva										salva										salva										salva									
51										100										301										350									
jacobina										jacobina										jacobina										jacobina									
Cu10										Cu10										Cu10										Cu10									
Cu2										Cu2										Cu2										Cu2									
Cu6										Cu6										Cu6										Cu6									
La53										La53										La53										La53									
Tru10										Tru10										Tru10										Tru10									
Tru12										Tru12										Tru12										Tru12									
Pa1										Pa1										Pa1										Pa1									
Li63										Li63										Li63										Li63									
Bu86										Bu86										Bu86										Bu86									
Bu90										Bu90										Bu90										Bu90									
beturite										beturite										beturite										beturite									
ne25										ne25										ne25										ne25									
ro1										ro1										ro1										ro1									
ro2										ro2										ro2										ro2									
santa46										santa46										santa46										santa46									
santa49										santa49										santa49										santa49									
salva										salva										salva										salva									
101										150										351										400									
jacobina										jacobina										jacobina										jacobina									
Cu10										Cu10										Cu10										Cu10									
Cu2										Cu2										Cu2										Cu2									
Cu6										Cu6										Cu6										Cu6									
La53										La53										La53										La53									
Tru10										Tru10										Tru10										Tru10									
Tru12										Tru12										Tru12										Tru12									
Pa1										Pa1										Pa1										Pa1									
Li63										Li63										Li63										Li63									
Bu86										Bu86										Bu86										Bu86									
Bu90										Bu90										Bu90										Bu90									
beturite										beturite										beturite										beturite									
ne25										ne25										ne25										ne25									
ro1										ro1										ro1										ro1									
ro2										ro2										ro2										ro2									
santa46										santa46										santa46										santa46									
santa49										santa49										santa49										santa49									
salva										salva										salva										salva									
151										200										401										450									
jacobina										jacobina										jacobina										jacobina									
Cu10										Cu10										Cu10										Cu10									
Cu2										Cu2										Cu2										Cu2									
Cu6										Cu6										Cu6										Cu6									
La53										La53										La53										La53									
Tru10										Tru10										Tru10										Tru10									
Tru12										Tru12										Tru12										Tru12									
Pa1										Pa1										Pa1										Pa1									
Li63										Li63										Li63										Li63									
Bu86										Bu86										Bu86										Bu86									
Bu90										Bu90										Bu90										Bu90									
beturite										beturite										beturite										beturite									
ne25										ne25										ne25										ne25									
ro1										ro1										ro1										ro1									
ro2										ro2										ro2										ro2									
santa46										santa46										santa46										santa46									
santa49										santa49										santa49										santa49									
salva										salva										salva										salva									
201										250										451										495									
jacobina										jacobina										jacobina										jacobina									
Cu10										Cu10										Cu10										Cu10									
Cu2										Cu2										Cu2										Cu2									
Cu6										Cu6										Cu6										Cu6									
La53										La53										La53										La53									
Tru10										Tru10										Tru10										Tru10									
Tru12										Tru12										Tru12										Tru12									
Pa1										Pa1										Pa1										Pa1									
Li63										Li63										Li63										Li63									
Bu86										Bu86										Bu86										Bu86									
Bu90										Bu90										Bu90										Bu90									
beturite										beturite										beturite										beturite									
ne25										ne25										ne25										ne25									
ro1										ro1										ro1										ro1									
ro2										ro2										ro2										ro2									
santa46										santa46										santa46										santa46									
santa49										santa49										santa49										santa49									
salva										salva										salva										salva									

Figura 16. Fragmentos de Secuencias de ADN para 13 poblaciones del complejo *Lutzomyia longipalpis*. 18 haplotipos únicos. Tomado de Arrivillaga y col., 2003.

3.3 Alineamiento de secuencias de ADN.

Las 343 secuencias de ADN obtenidas de Arrivillaga y col. (2003), fueron alineadas mediante el algoritmo CLUSTALW (Li, 2003) usando los mismos criterios de homología para el alineamiento propuesto por los primeros autores mencionado.

3.4 Análisis molecular de las secuencias de ADN

3.4.1 Conversión del formato de alineamiento.

El alineamiento obtenido mediante el programa CLUSTALW fue convertido en un archivo .MEG a través del programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) versión 5.2 (Tamura y col., 2011).

3.4.2 Conversión del formato .MEG a .PHY

El archivo .MEG obtenido a través del programa MEGA, fue posteriormente sometido al programa DnaSP 5 (Librado y Rozas, 2009), para estimar el número de haplotipos. A través de este programa se estipuló el formato de las secuencias (Fig. 17) y se hicieron grupos por especies, para crear un archivo .PHY el cual posteriormente se usó para crear las redes de haplotipos.

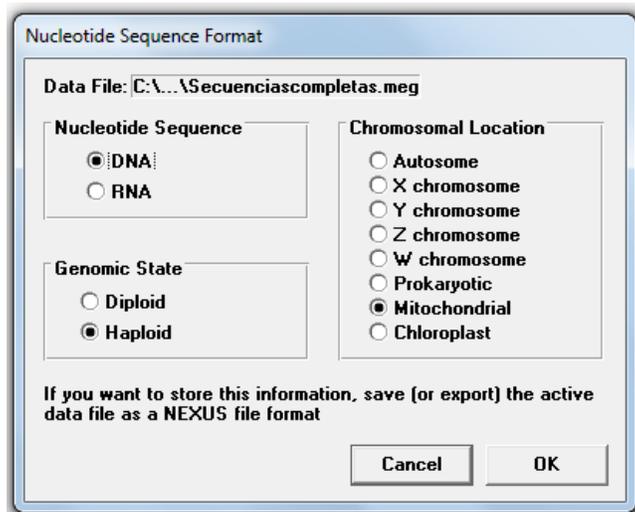


Figura 17. Formato de las secuencias para usarlas en DnaSP 5.

El DnaSP 5 es un paquete de software para el análisis de polimorfismo de nucleótidos, el cual puede estimar varias medidas de variación de secuencia de ADN dentro de y entre las poblaciones, así como el desequilibrio de ligamiento, la recombinación, el flujo de genes y los parámetros de conversión génica (Librado y Rozas, 2009).

3.5 Redes de Haplotipos

Con estas secuencias de regiones mitocondriales se realizaron Redes de haplotipos empleando el programa TCS1.21 (se usa para estimar por parsimonia estadística) para estudiar la distribución geográfica de la variabilidad genética mitocondrial para el complejo *Lu. longipalpis*, siguiendo el método propuesto por Golczer (2011), además se utilizó el programa Network 4.5.1 (Bandelt y col., 1999) para realizar redes haplotípica con los mismos datos y compararlas, ya que la diferencia de TCS.21 con Network, es que este paquete computacional estima las redes en Median Joining por sigma (basadas en distancias medias y no parsimonia).

Las redes de haplotipos se construyen utilizando determinado fragmento de la secuencia, o un bloque no recombinante. Lo primero que debe hacerse para crear una red de haplotipos, es construir una red filogenética de haplotipos no enraizada, mediante la aplicación de un algoritmo de parsimonia. En esta red se indicaron todos los pasos mutacionales que diferencian a cada uno de los haplotipos, los cuales fueron considerados como haplotipos intermediarios ausentes. De esta manera, la red de haplotipos se convierte en una serie de cladogramas anidados (Confalonieri, V., S/F).

Las redes de haplotipos realizadas se construyeron con dos rutinas distintas, una utilizando todas las secuencias de lo que se conoce como el complejo *Lutzomyia longipalpis*, las cuales incluyen secuencias de *Lu. longipalpis sensu lato* y *Lu. pseudolongipalpis*; y la segunda rutina, utilizando solo las secuencias de *Lu. longipalpis sensu lato*. Adicionalmente, se exploraron las rutinas considerando diferentes números de cambios mutacionales, para evaluar la factibilidad de conectividad y los de pasos que permiten tener la red de haplotipos total, con base en los haplotipos diferentes derivados de 343

secuencias de *Lutzomyia longipalpis* utilizados en los estudios de Arrivillaga y col. (2002; 2003).

3.6 Trazos Panbiogeográficos.

La distribución de las especies *Lutzomyia longipalpis sensu lato* y *Lutzomyia pseudolongipalpis* fue representada gráficamente en un mapa con las áreas donde fueron colectados los haplotipos (círculos amarillos), conectados por medio de líneas que representen distancias entre localidades, y formando un trazo individual. La finalidad era representar el área de distribución y el espacio probable de evolución de la especie. Este trazo fue orientado mediante filogenia, utilizando la información del árbol filogenéticos de Arrivillaga y col. (2002).

3.7 Secuencias consenso.

Se realizaron secuencias consenso por especie (A, B, C y D), alineando todas las secuencias pertenecientes a las poblaciones de cada especie, para posteriormente alinear las secuencia consenso y determinar la región óptima para la formación de los primers.

CAPITULO IV

RESULTADOS

4.1 Base de Datos

```
>Cur a6035
TAATACCTATTATAATTGGAGGTTGGAAACTGATTAGTCCCTTAATACCTCGGAGCCCCGATATGGCATTCCCACGAATAAATAACATAAA
>Cur a6036
TAATACCTATTATAATTGGAGGTTGGAAACTGATTAGTCCCTTAATACCTCGGAGCCCCGATATGGCATTCCCACGAATAAATAACATAAA
>Jacob01
TAATACCTATTATAATTGGAGGATTGGAAATTGATTAGTCCCTTAATATTAGGAGCCACATGGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGAT
>Jacob02
TAATACCTATTATAATTGGAGGATTGGAAATTGATTAGTCCCTTAATATTAGGAGCCACATGGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGAT
>Jacob03
TAATACCTATTATAATTGGAGGATTGGAAATTGATTAGTCCCTTAATATTAGGAGCCACATGGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGAT
>Jacob04
TAATACCTATTATAATTGGAGGATTGGAAATTGATTAGTCCCTTAATATTAGGAGCCACATGGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGAT
>Jacob05
TAATACCTATTATAATTGGAGGATTGGAAATTGATTAGTCCCTTAATATTAGGAGCCACATGGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGAT
>Jacob06
TAATACCTATTATAATTGGAGGATTGGAAATTGATTAGTCCCTTAATATTAGGAGCCACATGGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGAT
>Jacob07
TAATACCTATTATAATTGGAGGATTGGAAATTGATTAGTCCCTTAATATTAGGAGCCACATGGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGAT
>Jacob08
TAATACCTATTATAATTGGAGGATTGGAAATTGATTAGTCCCTTAATATTAGGAGCCACATGGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGAT
>Jacob09
TAATACCTATTATAATTGGAGGATTGGAAATTGATTAGTCCCTTAATATTAGGAGCCACATGGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGAT
>Jacob010
TAATACCTATTATAATTGGAGGATTGGAAATTGATTAGTCCCTTAATATTAGGAGCCACATGGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGAT
>Jacob011
TAATACCTATTATAATTGGAGGATTGGAAATTGATTAGTCCCTTAATATTAGGAGCCACATGGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGAT
>Jacob012
TAATACCTATTATAATTGGAGGATTGGAAATTGATTAGTCCCTTAATATTAGGAGCCACATGGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGAT
>Jacob013
TAATACCTATTATAATTGGAGGATTGGAAATTGATTAGTCCCTTAATATTAGGAGCCACATGGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGAT
>Jacob014
TAATACCTATTATAATTGGAGGATTGGAAATTGATTAGTCCCTTAATATTAGGAGCCACATGGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGAT
>Jacob015
TAATACCTATTATAATTGGAGGATTGGAAATTGATTAGTCCCTTAATATTAGGAGCCACATGGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGAT
>Jacob016
TAATACCTATTATAATTGGAGGATTGGAAATTGATTAGTCCCTTAATATTAGGAGCCACATGGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGAT
>Lap15301
TAATACCTATTATAATTGGAGGATTGGAAATTGATTAGTCCCTTAATATTAGGAGCCCCGACATGGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAA
>Lap15302
TAATACCTATTATAATTGGAGGATTGGAAATTGATTAGTCCCTTAATATTAGGAGCCCCGACATGGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAA
```

Figura 18. Base de datos realizada para 18 haplotipos.

En la figura 18 se observa la base de datos realizada cumplió con el siguiente formato: se colocó el símbolo de mayor (>) seguido de no más de 10 caracteres alfanuméricos para la identificación de cada secuencias, en la línea posterior la secuencia formada por la base nitrogenada en mayúscula (A, G, C y T), y esto se repitió para cada secuencia.

4.2 Alineamiento de secuencias de ADN.

```

Rora10      TAATACCTAT TAT-AATTGGAGGATTC--GGAAT TGATTAGTTCCTTTAATAT T-AGGG
Rora20      TAATACCTAT TAT-AATTGGAGGATTC--GGAAT TGATTAGTTCCTTTAATAT T-AGGA
Nei250      TAATACCTAT TAT-AATTGGAGGATTCG--GGAAT TGATTAGTTCCTTTAATAT T-AGGA
Truj120     TAATACCTAT TAT-AATTGGGGGATTC--GGAAT TGATTAGTTCCTTTAATAT T-AGGA
Buca900     TAATACCTAT TAT-AATTGAGG-ATTC--GGAAT TGATTAGTTCCTTTAATAT T-AGGA
Truj100     TAATACCTAT TAT-AATTGGGGATTC--GGAAT TGATTAGTTCCTTT- --ACT-AGGA
Libe630     TAATACCTAT CAT--ATTGGAGGATTC--GAAAAI TGATTAGTTCCTTTAATAT TTAGGA
Buca860     TAAGACCTAT CAATAATTGGGGGATTCGGAAAAI TGATTAGTTCCTTTAATAT T-AGGA
Pava10      TAATACCTAT TAT-AATTGGAGGATTC--GGAAT TGATTAGTTCCTTTAATAT T-AGGA
Cura10      TAATACCTAT TAT-AATTGGAGGATTC--GGAAT TGATTAGTTCCTTTAATACT-CGGA
Cura20      TAATACCTAT TAT-AATTGGAGGATTC--GGAAT TGATTAGTTCCTTTAATACT-CGGA
Cura60      TAATACCTAT TAT-AATTGGAGGATTC--GGAAT TGATTAGTTCCTTTAATACT-CGGA
Lapi530     TAATACCTAT TAT-AATTGGAGGATTC--GGAAT TGATTAGTTCCTTTAATAT T-AGGA
Baturo      TAATACCTAT TAT-AATTGGAGGATTC--GGAAT TGATTAGTTCCTTTAATAT T-AGGA
Salva0      -TAATACCTAT TAT-AATTGGAGGATTC--GGAAT TGATTAGTTCCTTTAATAT T-AGGA
Jacob0      TAATACCTAT TAT-AATTGGAGGATTC--GGAAT TGATTAGTTCCTTTAATAT T-AGGA
Sant460     TAATACCTAT TAAAAA--GGAGGATTC--G--GAAAT TGATTAGTTCCTTTAATAT TTAGGA
Sant490     TAATACATAT TAAAAATTGGAGGATTC--ATGATTT TAAATAGTTCCTTTAATAT TTAGGG
          * * * * *
Rora10      GCCCCTGA-TATAGCTTTTCCTGGAATAAATAATAAAGATTCTGACTTTTACCTCCATC
Rora20      GCCCCTGA-TATAGCTTTTCCTGGAATAAATAATAAAGATTCTGACTTTTACCTCCATC
Nei250      GCCCCTGA-TATAGCTTTTCCTGGAATAAATAATAAAGATTCTGACTTTTACCTCCATC
Truj120     GCCCCTGA-TATAGCTTTCCCGGAATAAATAATAAAGTTCTGACTTTTACCTCCATC
Buca900     GCCCCTGA-TATAGCTTTCCCGGAATAAATAATAAAGTTCTGACTTTTACCTCCATC
Truj100     GCCCCTGA-TATAGCTTTTCCTGGAATAAATAATAAAGTTCTGACTTTTACCTCCATC
Libe630     GCCCCTGAATAATAGCTTTTCCTGGAATAAATAATAAAGTTCTGACTTTTACCTCCATC
Buca860     GCCCCTGAATAATAGCTTTTCCTGGAATAAATAATAAAGTTCTGACTTTTACCTCCATC
Pava10      GCCCCTGA-TATAGCTTTTCCTGGAATAAATAATAAAGTTCTGACTTTTACCTCCATC
Cura10      GCCCCTGA-TATGGCATTCCACGAATAAATAATAAAGATTCTGACTTTTACCCCTTC
Cura20      GCCCCTGA-TATGGCATTCCACGAATAAATAATAAAGATTCTGACTTTTACCCCTTC
Cura60      GCCCCTGA-TATGGCATTCCACGAATAAATAATAAAGATTCTGACTTTTACCCCTTC
Lapi530     GCCCCTGA-CATGGCTTTCCCTGGAATAAATAATAAAGTTTCTGACTTTTACCCCATC
Baturo      GCCCCTGA-CATGGCTTTCCCTGGAATAAATAATAAAGATTCTGACTTTTACCCCATC
Salva0      GCCCCTGA-CATGGCTTTCCCTGGAATAAATAATAAAGATTCTGACTTTTACCCCATC
Jacob0      GCCC--A-CATGGCTTTCCCTGGAATAAATAATAAAGATTCTGACTTTTACCCCATC
Sant460     GCCCATAAATGGCTTTCCCTTAGAATAAATAATAAGATTCTGACTTTTACCCCATC
Sant490     GCCCATAAATGGCTTTCCCTTAGAATAAATAATAAGATTCTGACTTTTACCCCATC
          * * * * *

```

Figura 19. Fracción del alineamiento en CLUSTALW

En la figura 19 se observa el alineamiento realizado mediante el algoritmo CLUSTALW (Li, 2003)

4.3 Análisis molecular de las secuencias de ADN

DNA Sequences	Translated Protein Sequences
Species/Abbrv	
1. Buca90034	
2. Buca90035	
3. Buca90033	
4. Buca90032	
5. Buca90031	
6. Buca90030	
7. Buca90029	
8. Buca90028	
9. Buca90027	
10. Buca90026	
11. Buca90025	
12. Buca90024	
13. Buca90023	
14. Buca90022	
15. Buca90021	
16. Buca90020	
17. Buca90019	
18. Buca90018	
19. Buca90017	
20. Buca90016	
21. Buca90015	
22. Buca90014	
23. Buca90013	
24. Buca90012	
25. Buca90011	
26. Buca90010	

Figura 20. Imagen de una fracción del alineamiento convertido en un archivo .MEG.

En la figura 20 se observa la conversión del archivo de alineamiento obtenido a través del programa CLUSTALW al programa MEGA versión 5.2 (Tamura y col., 2011).

4.4 Haplotipos

Las 343 secuencias de ADN de la región mitocondrial Citocromo C oxidasa I de 12 localidades estudiadas, correspondieron a 18 haplotipos se distribuyen de la siguiente manera:

Tabla 5. Información de los haplotipos utilizados para estudios del complejo *Lutzomyia longipalpis*, con base en redes de haplotipo.

País	Clado filogenético	Haplotipo	Identificación
Venezuela	Laraensis	Curarigua10	H_1
		Curarigua2	H_2
		Curarigua6	H_3
Brasil	Brazilian	Jacobina	H_4
		Lapinha	H_5
		Santarem46	H_6
		Santarem49	H_7
		Salvaterra	H_8
		Baturité	H_9
Venezuela	Trans-Andino	Trujilla10	H_10
	Cis-Andino	Trujillo12	H_11
Honduras	Trans-Andino	Pavana1	H_12
Costa Rica		Liberia63	H_13
Colombia		Cis-Andino	Bucaramanga86
	Bucaramanga90		H_15
	Neiva25		H_16
Venezuela-Brasil (Amazonía)	Cis-Andino	Roraima1	H_17
		Roraima2	H_18

4.5 Redes de Haplotipos.

4.5.1 Red de Haplotipo con secuencias de *Lu. longipalpis sensu lato* y *Lu. pseudolongipalpis*, usando el programa TCS. 21.

Las tres primeras redes (Figura 21, 22 y 23) utilizaron las 343 secuencias correspondientes a *Lu. longipalpis sensu lato* y *Lu. pseudolongipalpis*. Se puede observar cómo se conectan las especies, con base en argumentos biogeográficos ó ecológicos, sin embargo no muestran relaciones de ancestralidad filogenéticas ó filogeográfica, debido a que las redes no evidencian la ocurrencia de un haplotipo ancestral porque no hay un haplotipo mayoritario (considerado en la redes como el ancestral). Adicionalmente, la construcción de redes de haplotipos con distintos número de cambios mutacionales permitió evaluar el grado de discontinuidad en la red, derivado de la búsqueda de conectividad entre especies filogenéticas con aislamiento reproductivo dentro del complejo *Lu. longipalpis*.

4.5.1a Red de Haplotipo con menos de 35 cambios mutacionales.

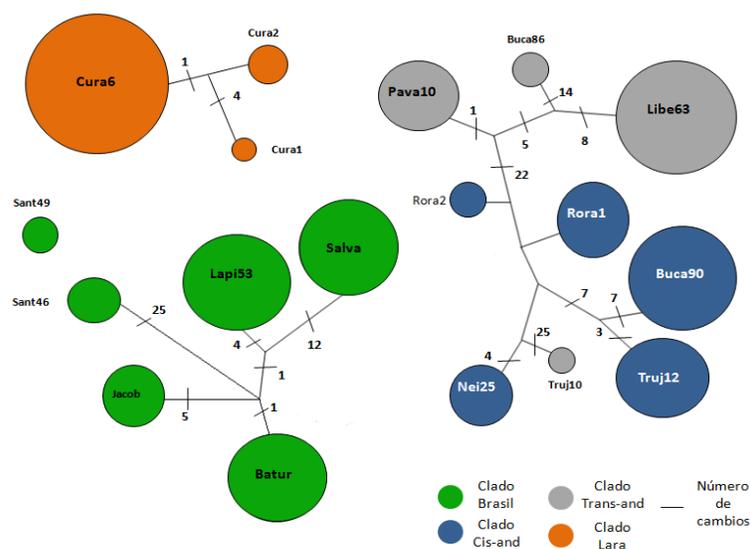


Figura 21. Red haplotípica fragmentada con secuencias de *Lu. longipalpis* y *Lu. pseudolongipalpis* utilizando 30 mutaciones.

Cuando se construyen redes considerando 30 cambios mutacionales (Fig. 21) para conectar las poblaciones-especies dentro del complejo, se observó a una gran red desconectada y conformada por tres subredes e indican a las poblaciones de Brasil, Venezuela-Colombia-

Centro América y la población de Curarigua que corresponde a una especie distinta, descrita por Arrivillaga y col. (2001) como *Lutzomyia pseudolongipalpis*. Este tipo de topología indica que no se pueden asociar parsimoniosamente por ende no se puede encontrar una asociación de ancestralidad-descendencia reciente en tiempo ecológico, pero si separa a las subredes en redes biogeográficas y evidencia a tres grupos de especies diferentes genéticamente.

4.5.1b Red de Haplotipo con 35 cambios mutacionales.

La red haplotípica con 35 cambios mutacionales exactos (Fig. 22), demuestra igualmente, otra red desarmada, pero con la ocurrencia de dos grupos bien definidos: un primer grupo correspondiente a Curarigua, *Lutzomyia pseudolongipalpis*, y un segundo grupo conformado por *Lutzomyia longipalpis sensu lato* correspondiente a las poblaciones de Trujillo en Venezuela, Brasil, Colombia y Centro América. Sin embargo, aunque están unidas algunas poblaciones de *Lu. longipalpis sensu lato*, aún se necesitan un número mayor de cambios para lograr una conectividad total. Se sugiere, que dentro de *Lu. longipalpis s. l.* hay más de un grupo aislado taxonómicamente en un bajo contexto genético.

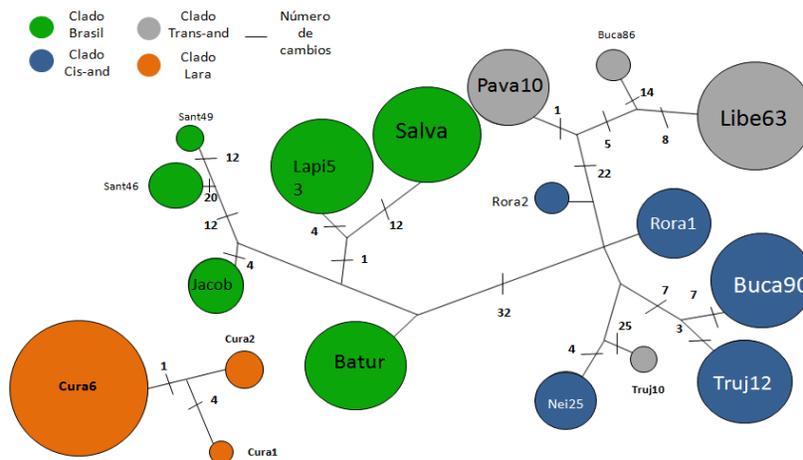


Figura 22. Red haplotípica fragmentada con secuencias de *Lu. longipalpis* y *Lu. pseudolongipalpis* utilizando 35 mutaciones.

Además, esta estructura de red avala la hipótesis que Curarigua es una especie diferente y necesita muchos cambios mutacionales para que conecte con las otras especies genéticas.

4.5.1c Red de Haplotipo con más de 35 cambios mutacionales.

Se necesitaron 48 cambios mutacionales para poder conectar a Curarigua con el resto (fig. 23). El gran número de cambios, interpretado en tiempo, corresponde a los millones de años que han pasado desde que estas poblaciones tuvieron un ancestro común.

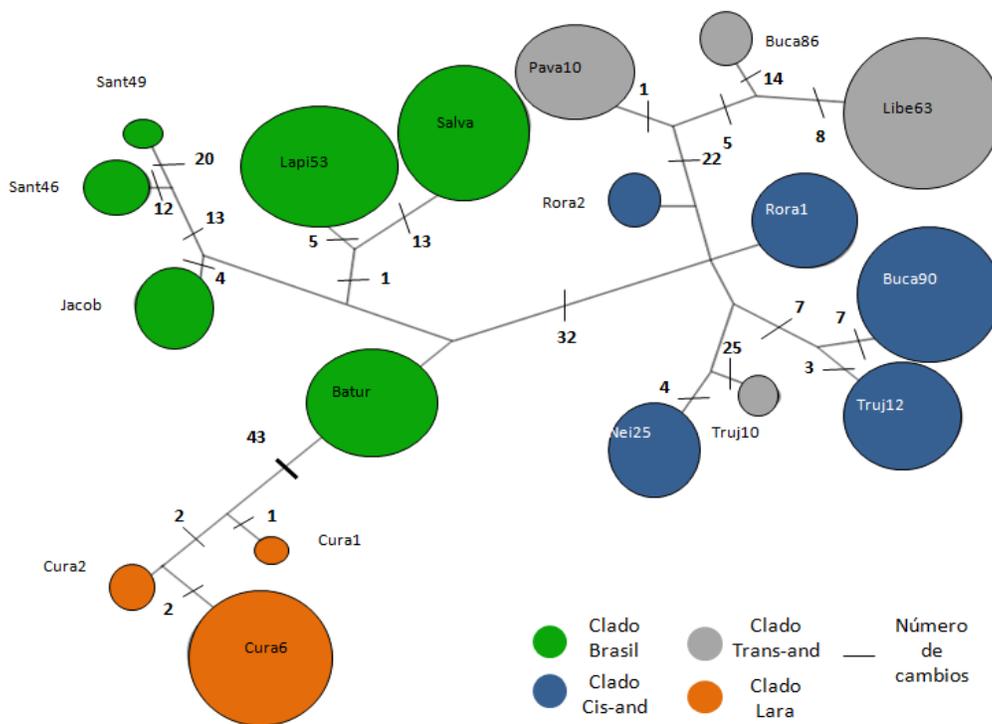


Figura 23. Red haplotípica con secuencias de *Lu. longipalpis* y *Lu. pseudolongipalpis* utilizando 48 mutaciones.

En la figura 23 se observa la conexión existente entre todas las poblaciones genéticas geográficas utilizadas en el estudio, manteniéndose el patrón de tres (3) grupos, a pesar del número en cambios mutacionales (48) y se observó geográficamente, 3 subredes con partición geográfica: Brasil, Venezuela-Colombia-Centro América, y Curarigua.

Al realizar redes de haplotipo con las secuencias de *Lutzomyia longipalpis sensu lato* mediante el programa TCS.21, y utilizando diferentes números de cambios, no se observan diferencias sobresalientes en las topologías, ni un haplotipo común ancestral, porque no hay un haplotipo con una frecuencia significativamente alta. Se mantiene la misma estructura topológica de las redes con la inclusión de *Lu. pseudolongipalpis*, lo que señala que la estructura de conectividad genética espacial entre especies con mayor grado de relación filogenética es independiente de la presencia de otra especie del complejo, con mayor divergencia genética.

4.5.2 Comparación de Redes de Haplotipo con secuencias de *Lu. Longipalpis sensu lato* y *Lu. pseudolongipalpis*, hechas a través de Network, Vs hechas por TCS.21

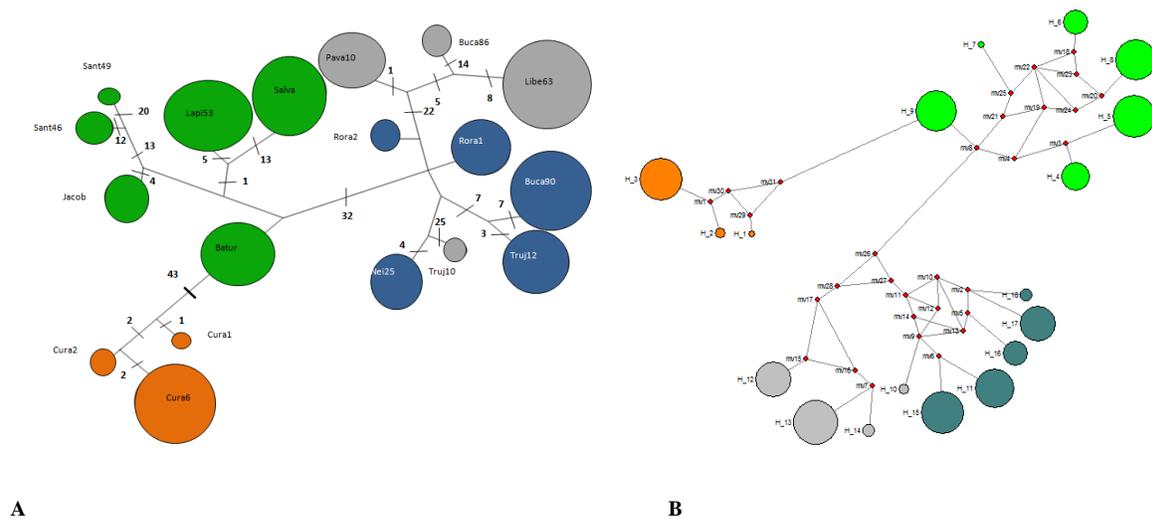


Figura 24. Comparación de redes de haplotipos utilizando especies del complejo *Lu. longipalpis sensu lato* y *Lu. Pseudolongipalpis*. A: Red de haplotipos realizada con TCS.21. B: Red de haplotipos realizada con Network.

Al comparar redes con la misma información pero bajo distintos argumentos de programas se observan similitudes en la estructura, reforzando la separación entre *Lu. pseudolongipalpis* y *Lu. longipalpis sensu lato* (Fig. 24).

4.5.3 Comparación de Redes de Haplotipo con secuencias de *Lu. Longipalpis sensu lato*, hechas a través de Network, Vs hechas por TCS.21

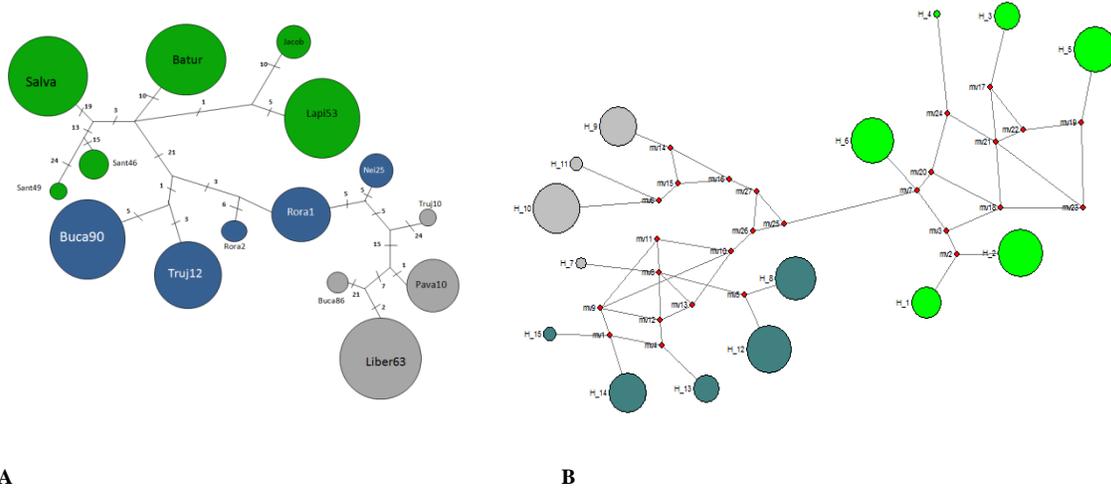


Figura 25. Comparación de redes de haplotipos utilizando especies del complejo *Lu. longipalpis sensu lato*. A: Red de haplotipos realizada con TCS.21. B: Red de haplotipos realizada con Network.

Al realizar las redes con ambos programas, pero excluyendo las poblaciones de *Lu. pseudolongipalpis*, observamos que con el programa Network (Figura 25-B), se pueden diferenciar mejor los dos grupos biogeográficos que conforman a *Lutzomyia longipalpis sensu lato*, representados por Brasil (verde) y el Noroeste de Suramérica (gris y azul). Al observar en la figura 25-A la red realizada con TCS1.21 la estructura no es tan diferenciada, ya que todos los haplotipos están más enraizados, pero hay una tendencia a visualizarse los dos grupos de poblaciones. Por lo cual, se recomienda ilustrar las redes de haplotipos del complejo *Lutzomyia longipalpis* con el programa Network.

4.5.4 Análisis filogeográfico sensu estricto (Arrivillaga y col., 2002) vs análisis filogeográfico mediante Redes de Haplotipo.

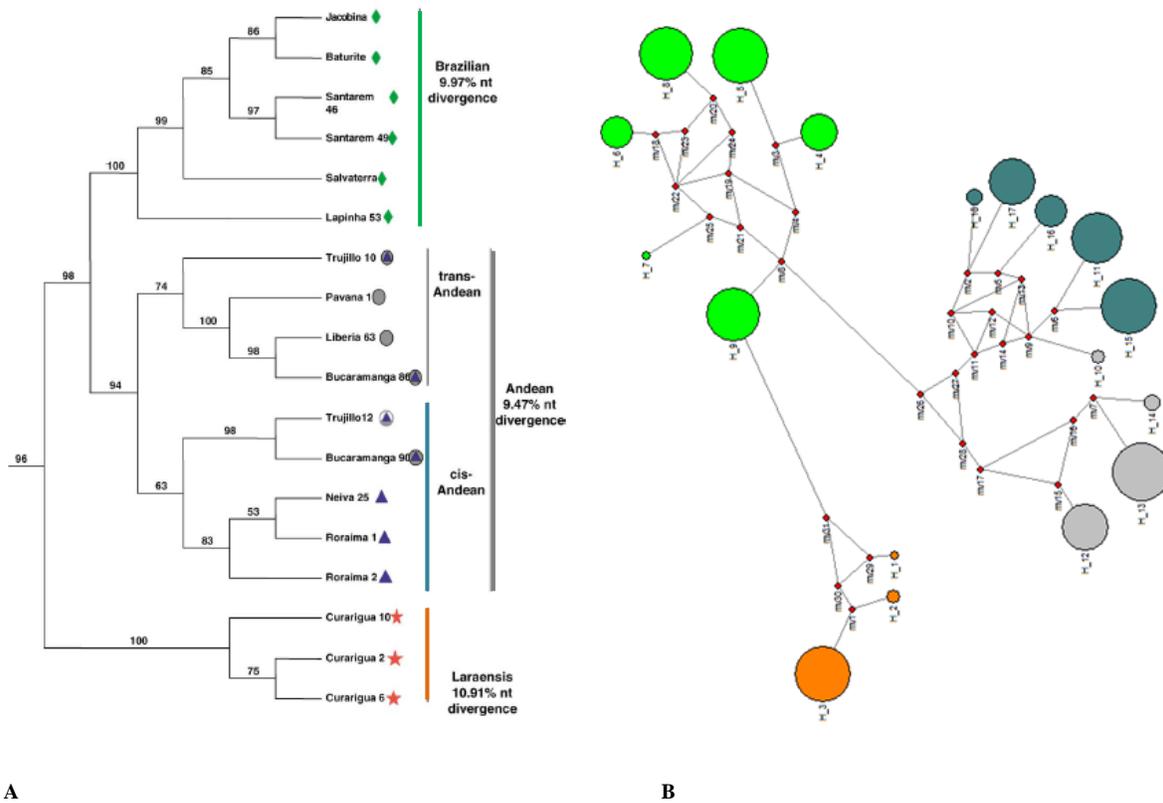


Figura 26. Árbol filogenético (A) vs Red de haplotipos (B) realizados con base en secuencias de ADN del complejo *Lutzomyia longipalpis*.

- **Congruencias entre los métodos.**

Al comparar las dos metodologías utilizadas para el estudio filogeográfico de las poblaciones del complejo *Lutzomyia longipalpis* (Fig. 26), observamos que existen puntos de concordancia:

- 1- La topología del árbol y la red es similar: la estructura filogeográfica en ambas metodologías evidencia, tres grupos discontinuos: grupo Laraensis (Curarigua, *Lu. pseudolongipalpis*, especie B), grupo Brazilian (Brasil, *Lu. longipalpis sensu lato*, especie A), grupo Andino (*Lu. longipalpis sensu lato*, especie C1, C2 y D,

poblaciones de Colombia, Centro América, Venezuela (excepto *Lu. pseudolongipalpis*).

- 2- Los tres grupos discontinuos obtenidos mediante las dos metodologías, están bien soportados tanto por los valores de divergencia nucleotídica, como por el número de cambios mutacionales entre ellos. La divergencia nucleotídica del clado Brazilian (9.8%) y del clado Andino (9.47%), es más reciente que la divergencia del clado Laraensis (10.91%), considerado como el más ancestral y representado por los haplotipos de Curarigua. Esta diferencia entre los grados de divergencia del clado Laraensis con los demás clados, sugiere un largo periodo de inactividad geológica después de eventos vicariantes en el Plioceno-Pleistoceno, mientras que los valores de divergencia del clado Brazilian y el clado Andino, sugieren la existencia de una reserva genética ancestral de origen sub andino amazónico antes de los eventos vicariantes (Arrivillaga y col., 2002) (Fig.26-A). Por otro lado en la red de haplotipos, el número de cambios mutacionales indica el grado de conectividad que hay entre los tres grupos, y se observa que las distancias más largas traducidas en tiempo geológico, se encuentran entre el grupo Brazilian (verde) y el grupo Laraensis (naranja), donde hay 44 cambios mutacionales, y entre el grupo Brazilian y el grupo Andino (Grisés) con 33 mutaciones. Estos valores también nos sugieren que la conexión con el mayor número de cambios es la del grupo Brazilian con el grupo Laraensis, por lo cual es la más antigua.
- 3- La topología del árbol y de la red de haplotipos, en relación al clado Laraensis (*Lutzomyia pseudolongipalpis*) son concordantes. El análisis filogenético muestra una divergencia baja entre los haplotipos colectados para la población de Curarigua, y dichos haplotipos cuentan con la presencia de un solo cambio mutacional entre ellos, lo que evidencia la alta homogeneidad genética dentro de esta especie pudiendo considerarse una misma población genética, lo que apoya que estén en un mismo clado.
- 4- La no separación filogenética entre los dos subclados andinos en el árbol, es concordante con la conectividad genética espacial mostrada en la red de haplotipos, ya que en ambos casos no se observa una agrupación bien diferenciada. En el caso del árbol filogenético se representan las ramas de los subclados Cis (poblaciones de

Colombia, Venezuela y de la Amazonía en Brasil) y Trans andinos (poblaciones de Venezuela, Colombia y Centro América) con bajos valores de bootstrap (menores a 80%) los cuales no son suficientemente fuertes para apoyar la diferenciación concisa de dichos clados (Arrivillaga y col., 2002). Del mismo modo en la red de haplotipos, la agrupación de las poblaciones geográficas del grupo Andino se observan divididas en dos subgrupos no diferenciados, lo que concuerda con el estudio filogenético.

- **Incongruencias entre los métodos.**

Existen algunas diferencias en las topologías internas:

Grupo Brazilian: los análisis de filogeografía *sensu stricta* muestran que la población más ancestral filogenéticamente hablando, es la población de Lapinha, ubicada geográficamente al sur de Brasil (al sur de la región de la cuenca de San Francisco (Arrivillaga y col., 2003), la cual permite la relación de ancestralidad y descendencia con *Lu. pseudolongipalpis* (especie más ancestral dentro del complejo). Mientras, que las del análisis de genética espacial con redes, muestran que la población brasilera de Baturité, es la población más basal y de conectividad con *Lu. pseudolongipalpis* (Curarigua).

Grupo Andino: los análisis filogenéticos muestran claramente dos subgrupos desconectados por valores de divergencia nucleotídica, independientes y discretos, no pudiéndose evaluar las relaciones de ancestralidad y derivación, por lo que se asume que ambos subgrupos se conectan de igual forma con el grupo Brazilian. Los valores de divergencia nucleotídica son altamente significativos (10.8 a 7.4%) entre las poblaciones de los sub clados cis y trans, lo que sugiere una falta de flujo genético (Arrivillaga y col., 2002). Así mismo, las redes de haplotipos muestran que el sub clado filogenético cis andino (poblaciones de Roraima, Neiva, Trujillo y Bucaramanga) se conectan primero al grupo Brazilian. Por otro lado, se observa la conexión del haplotipo 10 (población trans andina de Trujillo) con los haplotipos H11 (población cis andina de Trujillo) y H15 (Población cis andina de Bucaramanga), lo que evidencia que el haplotipo 10 transandino deriva de un pool ancestral cis andino.

Estos resultados evidencian que otros factores no macro biogeográficos podrían determinar la dinámica de la diferenciación genético espacial dentro y entre las poblaciones B, C1, C2, y D.

4.6 Trazo Panbiogeográfico

Al mapa de vegetación de Suramérica se superpuso la red haplotípica Network realizada con *Lu. longipalpis sensu lato* y *Lu. pseudolongipalpis*, y se le dio dirección a la red usando un criterio filogenético derivado de los análisis de Arrivillaga y col. (2002). Como se observa en la figura 27, existe conectividad entre las poblaciones, a pesar de la larga distancia geográfica entre ellas, y esta conectividad puede explicarse mediante un patrón biogeográfico y a través de la historia ecológica de las poblaciones. Su distribución se debe a los efectos ocasionados por los diferentes sucesos geológicos que han venido ocurriendo desde hace miles de millones de años, como ha sido el surgimiento de diferentes barreras geográficas, como son la cordillera de los Andes, de la cordillera de la costa en Venezuela, la incursión del Mar Caribe en Falcón, la formación de la cordillera del este, entre otras. También se observa que las poblaciones no comparten haplotipos entre ellas, lo que puede ser explicado por el aislamiento reproductivo entre las especies.

La direccionalidad del trazo Panbiogeográfico (Fig. 28) fue establecida con base en la interpretación del árbol filogenético (Fig. 15), donde se considera a Curarigua como el grupo ancestral que derivó en el complejo de especies integrado por poblaciones de Brasil, Colombia, Centro América.



Figura 27. Red haplotípica Network proyectada en mapa de localidades del complejo *Lutzomyia longipalpis*.

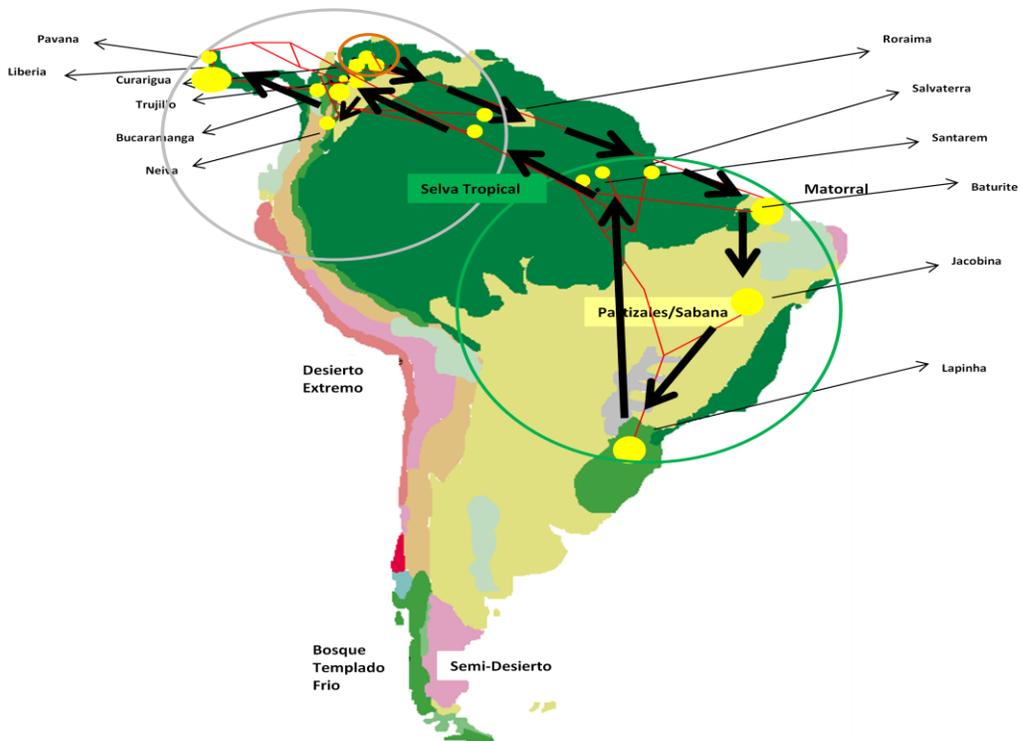


Figura 28. Trazo individual para poblaciones del complejo *Lutzomyia longipalpis*

3.7 Secuencias Consenso

Las secuencias consenso fueron construidas para cada Especie (A, B, C y D), con base en las secuencias óptimas alineadas con el programa ClustalW.

- Secuencia consenso Especie A (Clado Brasil)

TAA*AC*TATTA*AA***GGAG*ATTT**GA**TT*A**AGT*C*TT*AA*ATT**GG*GCCC**
ATGGCTTTCCTA***ATA*T*T*AGATTT*G*CTTT**CCCC**TC*TT*ACTTTATT
ATTAAGTAGTAG*ATAGTAGAACTGG*GCAGGTACAGGTTTGATCCGT*GTAATTACT
GCTGT*CTTTA*TATTATCTCTCCCTGTTTTAGCAGGAGCTATTACTATACTCTTAACT*
ATCGAAATTTAAATACCTCATTTTTTGACCCAGCTGG*GGAGGTGA*CC**T**TT*TACC
AACATGA**TGT*TACCCCCATTATCAAG*AATATTGC*CATAGAGGAGCCTC*GTTGA
TTTAG*TATTTTTTCTCTCCATTTAGCTGGA*TTTCATCTATTTTAGGAGCAGTAAATTT
ATTAC*ACAGT*ATTAATA*ACGATCAACAGGAATT*CTTTAGATCGAAT*CCTTTATTT
GT

- Secuencia consenso Especie B (Clado Lara)

TAATACCTATTATAATTGGAGG*TTTGGAACT*GATTAGT*CCTTTAATACTCGGAGCC
CCTGATATGGCATTCCCACGAATAAATAACATAAGATTTTGACTTTTACCCCTTCTTTA
ACTCTTTTATTAACAAGCAGAATAGTAGAACTGGAGCAGGAACAGGTTTG*TCCGTCG
TAATTACAGCTGTCCTTTTATTATTGTCCCTTCCTGTTTTAGCTGGAGCTATTACTATAC
TTTTAACTGACCGAAATTTAAATACTTC*TTTTTTGACCCGGCTGG*GGAGGAGACCCA
ATTCTTTATCAACATGAAGTGTACC*CTTTATCAAG*AATATTGCCATAGAGGAG
CTTCAGTTGATCTAGC*ATTTTTCTCTTCATTTAGCTGGAATTTCTTCAATTTTAGGGG
TGTAATTTTATTACAAGTGAATTAATATACGATCAACAGGAATTACTTTAGATCGAA
TACCTTTATTTGT

- Secuencia consenso Especie C (Clado Cis-andino)

TAATACCTATTATAATTG**G**T**GGAAATTGATTAGT*CCTTTAATATTAGG*GCCCC
TGATATAGCTTT*CC**GAATAAATAATATAAG*TTCTGACTTTTACCTCCATCTTTAACT
TTATTATTAAGTAGTAGTATAGTAGAACTGG*GCAGGAACAGGT*TGATCTGTTGTAA
T*ACTGCTGTTCTTTTATTATTATCTCTCCCAGTCTAGCAGG*GCTATTACTATACTTTT
*ACTGATCGAAATTTAAATACTTCCTTTTTTTGACCC*GC*GG*GGAGGAGA*CCTCTTTTA
TA*CAACATGAAGTGTATCC*CCATTATC*AGAAATATTGCTCATAGAGGAGCCTCAG
TTGACTTAGCAATTTTTCTCTTCATTTAGCTGGAATTTTCATCTATTTTAGG*GCAGTAA
ATTTTATTACTACAGTAATTAATATACGATCAACAGGAATTAC*TTAGATCGAATACCA
TTATTTGT

- Secuencia consenso Especie D (Clado Trans-andino)

TAA*ACCTAT*A***ATTGG*G*A*T***G*AAATTGATTAGTTCCTTTA**A****GGAGCCC
 CT*A*TATAGCTTTTCC*CGAATA*ATAATATAAGATT*TGACTTTTACC*CCATCTTTAA*
 TTTATTATTAAGTAG*AGTATAGTAG**ACTGG*GCAGGA*CAGG**TGATC*GT*GTAAT
 *ACTGC*GTTCTTTTATTATT*TCTCTCCCTGTTCTAGCAGGAGCTAT*AC*ATACTTTTAA
 CTGAT*GAAATCT*AATACTTC*TTTTTTGACCC*GCTGGAGG*GG*GACCC*ATTTTATA
 *CA**ATGAAC*GTCTA*CC*CC*TTATCTAG*AATATTGCCCATAGAGG*GC*TCAGTTG
 ATTTAGCAAT*TTTC*CTTCATTTAGCTGGAATTTCT*CTATTTTAGG*GCAGTAAATTT
 TATTA*TACAGTAATTAATAT*CGATCA*CAGGAATT*CTTTAGACCGAATACC*TTATTT
 GT

En el alineamiento de estas secuencias consenso por especie se resaltó en rojo las regiones cortas conservadas de diez o más bases, que representan regiones candidatas para la elaboración de cebadores. Esos cebadores flanquean una región variable (resaltada en verde) que puede ser empleada para la identificación de especies o “Barcoding”.

```

especieA--TAAACTATTAAAGGAGAT-----TTGATTAAGTCTTAAATT----GGGCCCAT
especieD--TAAACCTATAATTGGGATG-----AAATTGATTAGTTCCTTTAAG----GAGCCCCT
especieBTAATACCTATTATAAATTGGAGGTTTGGAAACTGATTAGTCCTTTAATACTCGGAGCCCCT
especieC TAATACCTATTATAAATTGGTG-----GAAATGATTAGTCCTTTAATATTAGGG-CCCCT
      :*. *  :*: **:  *.:          *****. * * :*: *:  * . ***.*
  
```

```

especieA G---GCTTTCCTT-----AATATTAGATTTGCTTTC CCTCTT--ACT
especieD ATATAGCTTTTCCCG---AATAATAATATAAGATTTGACTTTTACCCCATCTTT--AAT
especieB GATATGGCATTCCCACGAATAAATAACATAAGATTTGACTTTTACCCCTTCTTTAACT
especieC GATATAGCTTTCCG---AATAAATAATATAAG-TTCTGACTTTTACCTCCATCTTTAACT
      .      .  :* **          *.: * :** ** :  * . ** *.*
  
```

```

especieA TTATTATTAAGTAG-TAGATAGTAGAAACTGGG-CAGGTACAGGTTTGATCCGTGTAATT
especieD TTATTATTAAGTAG-AGTATAGTAG--ACTGGG-CAGGACAGG---TGATCG--TGTAAT
especieB CTTTATTAACAAGCAGAATAGTAGAAACTGGAGCAGGAACAGGTTTGTCGGTCTGTAATT
especieC TTATTATTAAGTAGTAGTATAGTAGAAACTGGG-CAGGAACAGGTTTGATCTGTTGTAAT-
      * :*****: ** :. ***** *****. *****:..* .:          :*:
  
```

```

especieA ACTGCTGTCTTTT--ATATTATCTCTCCCTGTTT TAGCAGGAGCTATTACTATACTCTTA
especieD ACTGCGTCTTTT--ATTATTCTCTCCCTGTTCTAGCAGGAGCTAT--ACATACTTTTA
especieB ACAGCTGTCCCTTTATTATTGTCCCTTCTGTTT TAGCTGGAGCTATTACTATACTTTTA
especieC ACTGCTGTCTTTTATTATTATCTCTCCAGTTCTAGCAG--GGCTATTACTATACTTT-T
      **: ** *  *** :*: * ** ** * :* ** ***** * .***** . ***** * :
  
```

```

especieA AACT-ATCGAAATTTAAATACCTCATT TTTT TGACCCAGCTGGGGAG-GTGACCTTTTACCA
especieD AACT-GATGAAAT-CTAATACTTCT TTTT TGACCGCTGGAGGGGG----ACCCATTTTAT
especieB AACTGACCGAAATTTAAATACTTCT TTTT TGACCCGGCTGGGGAGGAGACCCAATTCTTTA
especieC AACTGATCGAAATTTAAATACTTCT TTTT TGACCCGGGGGAG--GAGACCTCTTTTAT
*** . ***** :***** ** ***** ..* **.. .*. * : :

```

```

especieA ACATGAT----GTTACCCCCCATTATCAAGAATATTGCCATAGAGGAG--CCTCGTTGA
especieD ACAATGA----ACGTCTACCCCTTATCTAGAATATTGCCATAGAGGG--CTCAGTTGA
especieB TCAACATGAACGTGTTTACCCCTTATCAAGAATATTGCCATAGAGGAGCTTCAGTTGA
especieC ACAACATGAACGTGTTTATC CCCATTATCAGAAATATTGCTCATAGAGGAGCCTCAGTTGA
:***: .: . :. .*** *****:..***** .:.....*.. .*****

```

```

especieA TTTAGTATT-TTTTCTCTCATTAGCTG-GATTTCACTATTTTAGGAGCAGTAAATTT
especieD TTTAGCAAT-TTTTC-CTTCATTAGCTG-GAATTTCTCTATTTTAG-GGCAGTAAATTT
especieB TCTAGCATT TTTT-CTCTTCATTAGCTGGAATTTCTTCAATTTTAGGGGCTGTAAATTT
especieC CTTAGCAATTTTTTCTCTTCATTAGCTGGAATTTCACTATTTTAGGG-CAGTAAATTT
*** *: * *** * ** ***** .*:** **:***** .*:*****

```

```

especieA TATTAC-ACAGTATTAAT--AACGATCAACAGGAATT-CTTTAGATCGAATCCTTT-ATT
especieD TATTAT-ACAGTAATTAA--TATCGATCACAGGAATT-CTTTAGACCGAATACCTT-ATT
especieB TATTACAACGTGAATTAATATACGATCAACAGGAATTACTTTAGATCGAATACCTTTATT
especieC TATTACTACAGTAATTAATATACGATCAACAGGAATTACTTAG-ATCGAATACCATTATT
***** **:***:***: :* .: .***** ***:.. * *****.* :* ***

```

```

especieA TGT
especieD TGT
especieB TGT
especieC TGT
***

```

Vale destacar que los asteriscos debajo de las bases nitrogenadas indican que en esa posición los residuos son 100% idénticos, los dos puntos (:) indican posiciones en las que se han realizado sustituciones conservativas, y el punto (.) indica sustituciones menos conservativas.

DISCUSIÓN

Los análisis realizados mediante el método de filogeografía no *sensu stricta* o Red de Haplotipos indicaron la existencia de tres grupos conectados pero bien diferenciados, formados por las 4 especies filogenéticas del complejo *Lutzomyia longipalpis*: grupo Laraensis (*Especie B*, Curarigua, *Lu. pseudolongipalpis*), grupo Brazilian (*Especie A*, Brasil, *Lu. longipalpis sensu lato*), y el tercer grupo Andino (*Especies C (C1-C2) y D*, Colombia, Centro América, Venezuela, *Lu. longipalpis sensu lato*), las cuales tienen una conectividad más estrecha producto de una no completa separación filogeográfica.

La filogeografía *sensu stricta* (filogenia) y no *sensu stricta* (Red de haplotipos), muestran concordancia en la distribución de los grupos genéticos geográficos, y sustentan que estos grupos corresponden a especies con aislamiento reproductivo (Lanzaro y col., 1993; Mutebi y col., 1999; Arrivillaga y col., 2009). Por consiguiente, las redes son fragmentadas, los haplotipos no pueden asociarse de forma parsimoniosa, y se sugieren que la alta divergencia proviene desde el Plioceno – Pleistoceno, confirmando lo propuesto por Arrivillaga y col., en 2002.

En el complejo de especies, las diferencias filogenéticas y la separación geográfica entre Brazilian y Laraensis, sugieren al grupo Laraensis como el ancestral y al grupo Andino - Centro América como el reciente; ambos con influencia histórica de la Amazonía (Arrivillaga y col., 2002).

Se supone que el grupo Laraensis comenzó a divergir, de un pool ancestral con los movimientos tectónicos de los Andes en el período de Mioceno, continuó hasta el levantamiento de la Cordillera Andina del Este y manteniendo la divergencia por cuatro barreras geográficas: incursión del Mar Caribe en Falcón, desarrollos incipientes de las Cordilleras Andina, de la Costa, y el Arco El Baúl, causante de la barrera entre la cordillera del este y el sur de los Andes (Arrivillaga, 2003).

Otros eventos que pudieron ocasionar la diferenciación entre los grupos Andino y Laraensis fueron la incursión repetida del Mar Caribe y los cambios en la direccionalidad del Río Orinoco en el Oligoceno temprano hasta el Mioceno tardío. Probablemente, el aislamiento de los linajes principales ocurrió en el Pleistoceno, con el levantamiento del final de la

Cordillera del Este y con el desarrollo del Río Amazonas hacia el Océano Atlántico. El grupo Andino, conformado por poblaciones de Colombia, Venezuela, Centro América y la Amazonía Venezolana-Brasilera, tiene poblaciones en Bucaramanga y Trujillo donde sus haplotipos se encuentran en simpatria, por lo que se consideran grupos monofiléticos, además tienen una historia ecológica que muestra que las relaciones entre los haplotipos se debe a que existía un pool genético que fue afectado por periodos de aislamientos, por las barreras geográficas y posteriormente por períodos de dispersión. La especiación simpátrida se daría desde el lado Trans de la cordillera Andina, lo cual explicaría porque el Haplotipo Trujillo10 en las redes de haplotipo, queda unido a los haplotipos del grupo Cis-Andino. Además, que las poblaciones no compartan haplotipos, evidencia la no existencia de flujo génico contemporáneo entre ellas.

Las diferencias entre los clados Brasiliensis y Andino, pudo estar relacionada con las alteraciones geomorfológicas ocurridas en Sur América central, comenzando con el desarrollo del Río Amazonas en el Mioceno tardío y luego con los cambios de drenajes desde los Andes hasta la Amazonía, entre el Pleistoceno tardío y post-pleistoceno.

Este trabajo encuentra que las diferencias entre las redes de haplotipos y las observadas en la topología del árbol filogenético (Arrivillaga y col., 2002) respecto a la conectividad filogenética vs conectividad ecológica de las poblaciones dentro del clado Brazilian, no son significativas en cuanto a la interpretación de la relación entre las especies del complejo, por lo que se sigue evidenciando una congruencia en este clado. Además, la población de Lapinha es la población filogenéticamente basal dentro del clado Brazilian, estando relacionada con las poblaciones de la Amazonía (Salvaterra y Santarém), siendo las tres de tierras altas del Brasil y las más ancestrales del Clado, mientras que las poblaciones de Jacobina y del sistema de montañas bajas (Baturité) son poblaciones más recientes.

Ecológicamente, el complejo *Lu. longipalpis* está asociado principalmente a ecosistemas terrestres tipo bosque semideciduo, aunque en el 2003, se reportó por primera vez la ocurrencia de *Lu. longipalpis* en un bosque primario en la Amazonia Venezuela - Brasil (Arrivillaga y col., 2002; 2003). En particular, las poblaciones de *Lu. longipalpis sensu lato* y especie *B*, están asociadas a distintos tipos de bosques, como se indica a continuación, con base en el trabajo de ecosistemas terrestres de Santos y col. (2007).

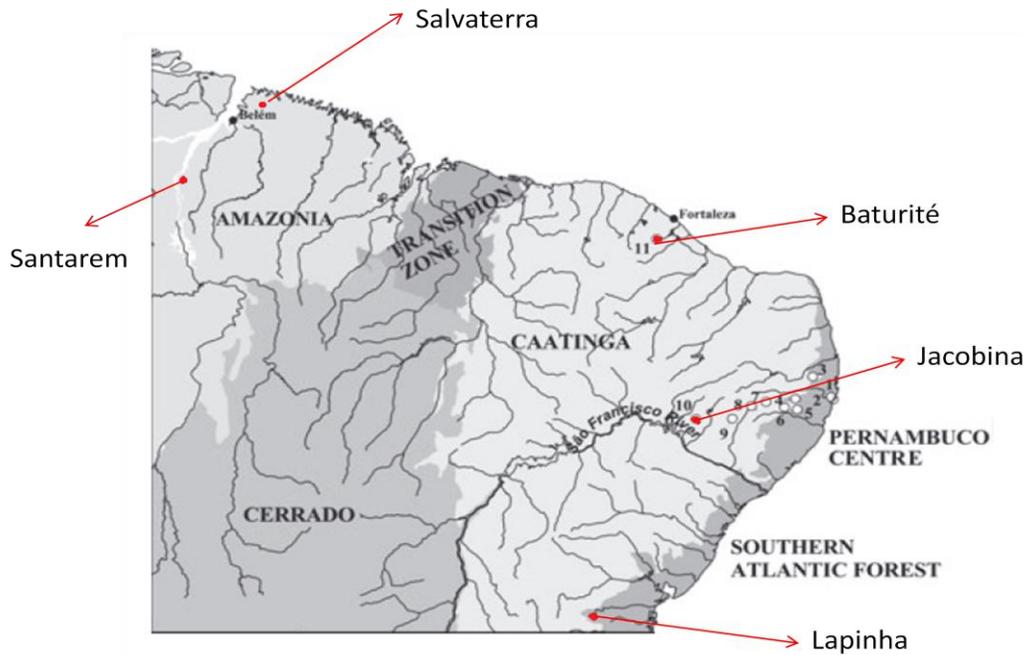


Figura 29. Distribución de los tipos de Bosques asociados a Brasil. Tomada de Santos y col., 2007.

En los estudios de Santos y col. (2007), también basándose en estudios filogenéticos, y considerando tanto las especies de plantas leñosas asociadas a los diferentes tipos de vegetación de Brasil, como la información biológica de los análisis de parsimonia, se determinó, que los bosques sureños del Atlántico son los bosques más ancestrales, mientras que los más derivados pertenecen a los bosques tipo Caatinga, Pernambuco y Amazonia, en donde se ubican geográficamente las poblaciones de Baturité, Jacobina, Lapinha, Salvaterra, Santarém y Roraima, poblaciones analizadas en el presente trabajo de *Lu. longipalpis s. l., especie B y C2*. Estos datos son concordantes con los datos filogeográficos propuestos por Arrivillaga y col. (2003).

Sin embargo, desde un contexto ecológico, autores como Silva y Casteletti (2003), sugieren que la región de Caatinga (donde se ubica geográficamente las poblaciones de Baturité y Jacobina) es una región única biogeográficamente, y ecológicamente más ancestral que los bosques de la Amazonia (donde se ubican las poblaciones de Salvaterra, Santarém y Roraima), lo cual sugiere que los bosques de Caatinga podrían tener un rol clave en la historia filogeográfica de *Lu. longipalpis sensu lato*.

Adicionalmente, la región de Caatinga en Brasil (Sabana) se caracteriza climáticamente como una región semi árida caliente, es decir, con altas temperaturas (aprox. máx. 35°C), constituida de árboles y arbustos espinosos, xerófilos, caducifolios, con presencia de plantas suculentas y estrato herbáceo estacional (De Souza, 1998); la cual tiene un gran parecido ecológico, con la localidad de Curarigua, en el edo. Lara, Venezuela. Esta región se caracteriza por tener un clima árido, con temperaturas poco variantes, siendo 35°C la máxima aproximada, constituida por una vegetación xerófila representada por cujíes, tunas, espinares y cardonales, lo que explica la conectividad ecológica entre estas dos localidades (Fig. 30).

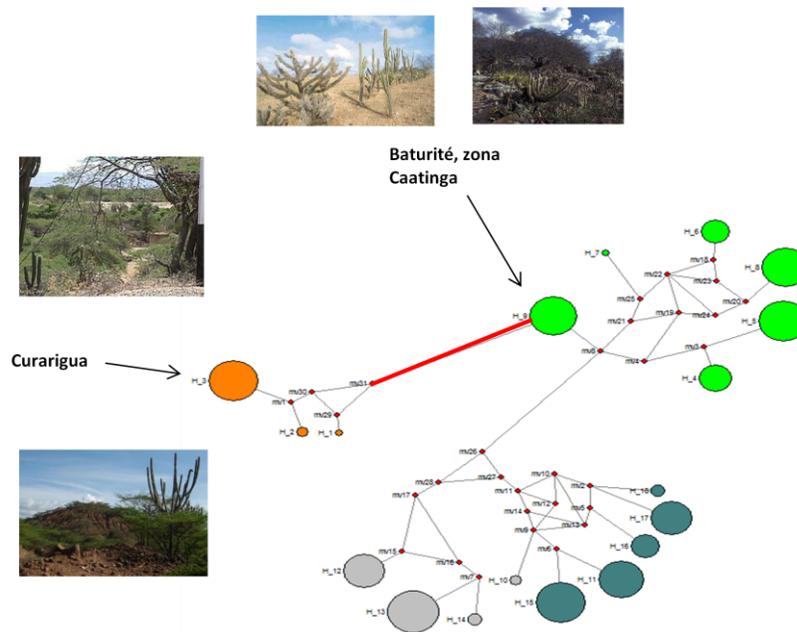


Figura 30. Vegetación de Caatinga y Curarigua sobre la Red haplotípica.

HIPOTESIS FILOGEOGRÁFICA

Hipótesis filogeográfica propuesta en el presente trabajo para explicar la distribución de las especies del complejo *Lutzomyia longipalpis*:

Basados en los resultados de este trabajo de investigación, se planteó una hipótesis filogeográfica (Fig. 31), a partir de modificaciones hechas a la propuesta por Arrivillaga en el año 2003:

1. La separación de las especies del complejo *Lu. Longipalpis* comienza con el levantamiento inicial de la Cordillera Andina del este (CAE), la cual generó la formación del linaje Laraensis (Fig. 31 superior).
2. La formación del Río Amazonas y el levantamiento continuo de la CAE, fue separando la población y generó la formación de dos linajes, uno brasilero, dirigido hacia la Amazonía brasilera, y la zona Caatinga, y el otro Cis-andino, abarcando parte de Colombia por Bucaramanga y Trujillo en Venezuela (Fig. 31 central).
3. El levantamiento máximo de la Cordillera Andina del Este, el cambio de drenaje del Río Amazonas, y la conexión establecida con el istmo de Panamá, resultó en la formación de tres linajes, Brasiliensis, Cis-andino y Trans andino. El linaje Brasiliensis comenzó en Baturité donde hay una vegetación tipo Caatinga, y desde allí se fueron desplazando los individuos hacia la parte sur de Brasil, y hacia la zona de transición y a la Amazonía. En la zona Andina los linajes se dividieron hacia la parte Cis de la CAE, Trujillo, Bucaramanga y Neiva, mientras que la población de la zona Trans, se desplazó hacia Centro América (Fig. 31 inferior).

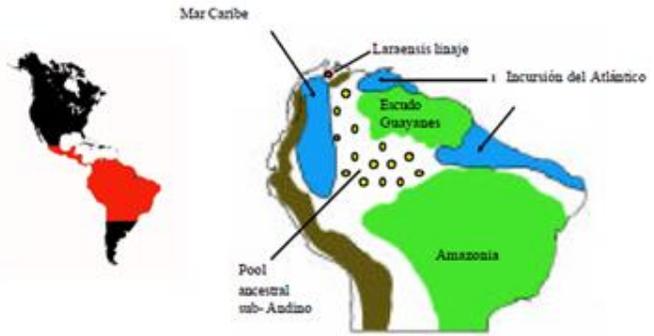


Figura 31. Modificación de la Hipótesis filogeográfica propuesta por Arrivillaga en 2003.

Figura 32. Hipótesis filogeográfica propuesta por Arrivillaga (2003). Eventos vicariantes que explican la formación de los clados monofiléticos.

La hipótesis propuesta por Arrivillaga en 2003 (Fig. 32), planteó que en el período Plioceno-Pleistoceno, los eventos vicariantes explican la formación de los clados monofiléticos actuales de la siguiente manera:

- **Figura superior:** Levantamiento inicial de la Cordillera Andina del este (CAE) resulto en la formación del linaje Laraensis.
- **Figura central:** La formación del Río Amazonas y el levantamiento progresivo del CAE resulto en la formación de un linaje brasilero y otro sub- andino (ambos ancestrales).
- **Figura inferior:** El levantamiento máximo de la CAE, el cambio de drenaje del Río Amazonas y la conexión con el istmo de Panamá resultó en otros tres linajes contemporáneos Brasiliensis, cis- andino y trans-andino.

Finalmente, este estudio de redes de haplotipos representa un estudio complementario a los estudios realizados de la especie *Lu. longipalpis*, los cuales a nivel de genética espacial, permiten tener un nuevo argumento para hablar de *Lutzomyia longipalpis sensu lato* como una especie derivada filogenéticamente de *Lu. pseudolongipalpis*, y dentro de la cual se puede hablar de cuatro especies con valor taxonómico como especies plena, ejemplo las especies A, C1, C2 y D. Por lo tanto, las redes de haplotipo avalan la existencia de las cinco especies morfológicas.

CONCLUSIONES

- Las interpretaciones filogeográficas *no sensu stricta* de los 3 grupos biogeográficos resultantes en el presente estudio, confirman la concordancia con los resultados de los análisis filogenéticos realizados por Arrivillaga y col. (2002), de la existencia de 4 especies filogenéticas: *Especie B* (Curarigua, *Lu. pseudolongipalpis*, grupo Laraensis, *Especie A* (Brasil, *Lu. longipalpis sensu lato*, grupo Brazilian), *Especies C y D* (Colombia, Centro América, Venezuela, *Lu. longipalpis sensu lato*, grupo Andino), estableciéndose un patrón claro de conectividad y de especiación alopátrica, asociada a eventos geológicos ocurridos en el Plioceno-Pleistoceno, aceptando así nuestra hipótesis planteada.
- Estas comparaciones entre las dos metodologías, evidencia que la hipótesis filogenética planteada es aceptada, evidenciando que la historia biogeográfica de las especies de flebotomínos del complejo *Lu. longipalpis*, determina la dinámica de la genética espacial de las poblaciones naturales actuales.
- La distribución y conexión de los haplotipos pertenecientes a los grupos Cis y Trans Andino en la red, demuestran que la especiación simpátrica ocasionada por la formación de Norte a Sur de la Cordillera Andina del Este, se dio en el lado trans.
- La dispersión de las especies del grupo Brazilian está asociada a los ecosistemas terrestres de cada región, lo cual explica que la separación se dio desde la región con Bosques Caatinga (tipo Sabana - Baturité) hacia los bosques del sur (considerados los más ancestrales - Lapinha) y hacia la Amazonía (Salvaterra y Santarém).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Abud, C. 2011. Variación Genética y Estructura Filogeográfica de *Abrothrix olivaceus* en la Patagonia Argentina y el Sur Chileno. Tesis de Maestría. Montevideo, Uruguay. 80pp.

Aguilera, M., Silva, J. 1997. Especies y Biodiversidad. INTERCIENCIA 22(6): 299-306.
URL: <http://www.interciencia.org.ve>

Araki, A., Vigoder, F., Bauzae, L., Ferreira, G., Souza, N., Araujo, I., Hamilton, J., Brazil, R., Peixoto, A. 2009. Molecular and behavioral differentiation among Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). PLoS Negl Trop Dis 3(1): e365.

Arrivillaga, J. 1999. Estudio Morfogenético de *Lutzomyia longipalpis* in Venezuela. MSc. Thesis, Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, Postgrado Entomología Salud Pública, Maracay.

Arrivillaga, J., Rangel, Y., Feliciangeli, M., Oviedo, M., 2000a. Genetic divergence among Venezuela populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). J. Med. Entomol. 37, 325–330.

Arrivillaga, J., Feliciangeli, M. 2001. *Lutzomyia pseudolongipalpis*, the first new species with *Lutzomyia longipalpis* complex from La Rinconada Curarigua Lara state Venezuela. J. Med. Entomol. 38 (6), 783–790.

Arrivillaga, J., Norris, D., Feliciangeli, M., Lanzaro, G. 2002. Phylogeography of the Neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* inferred from mitochondrial DNA sequences. Infection, Genetics and Evolution 2. 83-95.

Arrivillaga, J. 2003. Variabilidad genética y filogenia del complejo de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva 1912), vector de leishmaniasis visceral en América (Díptera: Psychodidae: Phlebotominae). Tesis Doctoral. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, Postgrado Entomología, Maracay.

Arrivillaga, J., Mutebi, J., Piñango, H., Norris, D., Alexander, B., Feliciangeli, M., Lanzaro, G. 2003. The taxonomic status of genetically divergent populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) based on the distribution of mitochondrial and isozyme variation. *J Med Entomol* 40: 615-27.

Arrivillaga, J., Salerno, P., Rangel, Y. 2009. Aislamiento reproductivo asimétrico entre *Lutzomyia pseudolongipalpis* y *Lutzomyia longipalpis* (especie C2) vectores neotropicales de leishmaniasis visceral (Díptera: Psychodidae). *Rev. Biol. Trop.* Vol. 57 (1-2); 23-31.

Arrivillaga, J. 2009b. Identificación isoenzimática de *Lutzomyia pseudolongipalpis*, nueva especie vector de leishmaniasis visceral en Venezuela. *Revista Científica* 19 (4): 339 – 342.

Arrivillaga, J., Marrero, R. 2009. Dos Nuevas Poblaciones de *Lutzomyia pseudolongipalpis* Arrivillaga y Feliciangeli (Diptera: Phlebotominae) Vector de Leishmaniasis Visceral en Venezuela. *Neotropical Entomology* 38(4):556-559.

Avise, J., Arnold, J., Ball, R., Bermingham, E., Lamb, T., Niegel, J., Reeb, C., Lauders, N. 1987. Intraspecific Phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Ann. Rev. Ecol Syst.* 18: 489-522.

Avise, J. 2000. *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press, Londres. Harvard Univ. Press, Cambridge.

Avise, J., 2008. Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*, 36: 3–15.

Bandelt, H., Forster, P., Röhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16: 37-48.

Bauzer, L., Souza, N., Ward, R., Kyriacou, C., Peixoto, A. 2002a. The period gene and genetic differentiation between three Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis*. *Insect Molecular Ecology* 11(4): 315-323.

- Bauzer, L., Gesto, J., Souza, N., Ward, R., Hamilton, J., Kyriacou, C., Peixoto, A. 2002b. Molecular Divergence in the period Gene Between Two Putative Sympatric Species of the *Lutzomyia longipalpis* Complex. *Molecular Biology and Evolution* 19(9): 1624-1627.
- Bejarano, E. 2001. Nuevas herramienta para la clasificación taxonómica de los insectos vectores de leishmaniosis: utilidad de los genes mitocondriales. *Biomédica* 21:182-91.
- Bejarano, E. 2006. Subfamilia Trichomyiinae (Psychodidae) en el territorio continental e insular colombiano. *Act Biol. Col*, Vol. 11 N° 1. 37-41.
- Bonfante-Garrido, R.; Urdaneta, R.; Urdaneta, I.; Rodríguez, R., Perdomo, R. 2007. Flebotomíinos en dos focos endémicos de Leishmaniasis Visceral Americana en el municipio Torres, estado Lara, Venezuela. *Rev. Cient.* vol. 17, no.2.
- Brenière, S., Barnabé. C., Brèmond, P., Buitrago, R. 2012. Sistema vectorial emergente debido a las poblaciones salvajes de *Triatoma infestans*: la enfermedad de Chagas en Bolivia, proyecto TiBo. *BIOFARBO*, 20 (1). 1-7.
- Caldera, S., Jaramillo, M., Cochero, S., Pérez-Doria, A., Bejarano, E. 2013. Diferencias genéticas entre poblaciones de *Aedes aegypti* de municipios del norte de Colombia, con baja y alta incidencia de dengue. *Biomédica*. 33(Supl. 1): 89-98.
- Confalonieri, V. Procedimiento estadístico para el análisis filogeográfico: principios del método.
- Congrains, C. 2010. Ayudando a descifrar el enigma taxonómico, el código de barras de ADN de *Megalobulimus*spp. (Mollusca, Gastropoda) del departamento de San Martín, Perú. Tesis de Pregrado. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- Contreras-Medina, R. 2006. Los métodos de análisis biogeográfico y su aplicación a la distribución de las gimnospermas en México. INCI v.31 n.3 Caracas.

Corredor, A., Gallego, J., Tesh, R., Morales, A., Ferro de Carrasquilla, C., Young, D., Kreutzer, R., Boshell, J., Paláu, M., Cáceres, E., Peláez, D. 1989. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 40: 480-486.

Cuellar, V. 20014. Variación Morfométrica y Genética de *Diaphorinacitri* (Hemiptera: Liviidae) en Rutáceas de Veracruz, México. Tesis de Maestría. Texcoco, México.

Da Silva, C. 2011. Filogeografía del género *Eligmodontia* (Rodentia:Cricetidae) en la Patagonia Argentina. Tesis de Maestría. Montevideo, Uruguay. 101 pp.

De Souza, C. 1998. Estudio Florístico e Fitossociológico de umremanescente de Caatinga à Margem do Rio Sao Francisco, Petrolina-Pernambuco. Tesis de Maestría.

Delgado, P., Piñero, D. 2002. Sistemática filogeográfica y sus aplicaciones a la evolución y conservación de los bosques de coníferas en México: El caso de *PinusMontezumae* y *P. pseudostrobus*. *Dep. Ecol. Evol.* Vol. 12. N° 2.

Depaquit, J. 2014. Molecular systematics applied to Phlebotomine sandflies: Review 4 and perspectives. *Infection, Genetics and Evolution.* 12 pp.

Domínguez-Domínguez, O., Vázquez-Domínguez, E. 2009. Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación. *Animal Biodiversity and Conservation* 32.1, pag 48.

Espinosa, D., Morrone, J., Llorente, J., Villela, O. 2005. Introducción al Análisis de Patrones en Biogeografía Histórica. UNAM. 133Pp.

Fu, Y., Li, W. 1999. Coalescing into the 21st Century: An Overview and Prospects of Coalescent Theory. *TheoreticalPopulationBiology* 56:1-10.

Golczer, G., Arrivillaga, J. 2010. Gen periodo no construye filogenias dentro del complejo de especie, *Lutzomyia longipalpis* (Díptera: Phlebotominae). *Mét. Ecol. Sist.* Vol.5 (2):10-26.

Golczer, G. 2011. Diferenciación y Divergencia filogenética en tres especies crípticas del grupo Verrucarum (Díptera: Psychodidae). Tesis de Maestría. Universidad Simón Bolívar. Postgrado en Ciencias Biológicas. Caracas, Venezuela.

González, N., Valenzuela, J., Ribeiro, J., Cuervo, P., Brazil, R. 2013. Transcriptome exploration of the sex pheromone gland of *Lutzomyia longipalpis* (Díptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Parasit Vectors*, 7; 6:56.

Hamilton, J., Ward, R. 1994. Chemical analysis of a putative sex pheromone from *Lutzomyiapessoai* (Díptera: Psychodidae). *Ann Trop Med Parasitol*. 88(4): 405-12.

Hamilton, J., Ward, R., Dougherty, M. 1996. Comparison of the sex-pheromone components of *Lutzomyia longipalpis* from areas of visceral and atypical cutaneous leishmaniasis in Honduras and Costa Rica. *Ann. Trop. Med. Parasitol*. 90: 533-541.

Hodgkinson, V., Birungi, J., Quintana, M., Deiteze, R., Munstermann, L. 2003. Mitochondrial Cytochrome B variation in populations of the visceral leishmaniasis vector *Lutzomyia Longipalpis* across Eastern Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 69(4), pp. 386-392.

Hoyos, R., Uribe, S., Vélez, I. 2012. Tipificación e especímenes colombianos de *Lutzomyia longipalpis* (Díptera: Psychodidae) mediante “Código de Barras”. *Rev. Colomb. Entomol*. Vol. 38 (1): 134-140.

Kambhampati, S., Smith, P. 1995. PCR primers for the amplification of four insect mitochondrial gene fragments. *Insect. Mol. Biol*. 4: 223-236.

Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J MolEvol* 15: 111–120. doi: 10.1007/bf01731581.

Lainson, R. Ward, R. Shaw, J. 1977. Experimental transmission of *Leishmania chagasi* causative agent of neotropical visceral leishmaniasis, by the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Nature (London)* 266: 628 – 630.

Lanteri, A., Confalonieri, V., 2003. Filogeografía: objetivos, métodos y ejemplos. In: *Una perspectiva latinoamericana de la biogeografía*. Editores J. J. Morrone & J. Llorente, Eds.). 185–194. CONABIO, México.

Lanteri, A. 2007. Código de barras del ADN y sus posibles aplicaciones en el campo de la Entomología. *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 66 (3-4): 15-25.

Lanzaro, G., Ostrovska, K., Herrero, M., Lawyer, P., Warburg, A. 1993. *Lutzomyia longipalpis* is a species complex: genetic divergence and interspecific hybrid sterility among three populations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 48, 839–847

Li, K. 2003. ClustalW-MPI: ClustalW analysis using distributed and parallel computing. *Bioinformatics* 19(12): 1585-1586.

Librado, P., Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.

Lins, R., Souza, N., Brazil, R., Maignon, R., Peixoto, A. 2012. Fixed Differences in the paralytic Gene Define Two Lineages within the *Lutzomyia longipalpis* Complex Producing Different Types of Courtship Songs. *PLOS one*. Vol. 7. Issue 9.

Llorente, J., Morrone, J. 2000. Introducción a la Biogeografía en Latinoamérica: Teorías, Conceptos, Métodos y Aplicaciones. 283 Pp.

Lutz, A. y Neiva, A. 1912. Contribuição para o conhecimento das espécies do género *Phlebotomus* existentes no Brasil.

Mangabeira, O. 1969. Sobre a sistemática e biología dos *Phlebotomus* do Ceará. *Rev. Bras. Malariol. DOENCAS TROP.* 21: 3-26.

Marín, J., Zapata, B., González, B., Bonanic, C., Wheeler, J., Casey, C., Bruford, M., Palma, E., Poulin, E., Alliende, M., Spotorno, A. 2007. Sistemática, taxonomía y domesticación de alpacas y llamas: nueva evidencia cromosómica y molecular. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 80:121-140.

Moraga, M., De Saint Pierre, M., Torres, F., Ríos, J. 2010. Vínculos de parentesco por vía materna entre los últimos descendientes de la etnia Kawésqar y algunos entierros en los canales patagónicos: evidencia desde el estudio de linajes mitocondriales. *Magallania*. Vol. 38(2): 103-114.

Morrone, J., Crisci, J. 1995. Historical biogeography: Introduction to methods. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 26: 373-401.

Mutebi, J., Alexander, B., Sherlock, I., Wellington, J., Souza, A., Shaw, J., Rangel, E., Lanzaro, G. 1999. Breeding structure of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Lutz y Neiva) in Brazil. *J. Trop. Med. Hyg.* 61: 149- 157

Nei, M., Kumar, S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York. 333 pp.

Oliveira, S., Bottecchia, M., Bauzer, L. Souza, N., Ward, R., Kyriacou, C., Peixoto, A. 2001. Courtship song genes and speciation in sand flies. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Vol. 96(3): 403-405.

Pérez-Doria, A., Bejarano, E., Vélez, I. 2008. Descripción del ARN de transferencia mitocondrial para Serina (UCN) de *Lutzomyia columbiana* (Díptera: Psychodidae). *Revista Brasileira de Entomología* 52(4): 591-594.

Porter, C., Collins, F. 1991. Species-diagnostic differences in a ribosomal DNA internal transcribed spacer from the sibling species *Anopheles freeborni* and *Anopheles hermsi* (Diptera: Culicidae). *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 45(2), 271-279.

Quiñones, A. 2011. Estandarización de las condiciones de PCR para la amplificación de Citocromo Oxidasa C, subunidad I (COI) y evaluación de su contenido informativo en dos poblaciones de *Urotrygon aspidura* el pacífico Vallecaucano. Tesis de grado. Universidad del Valle. Santiago de Cali, Colombia.

Quintero, L., Navarro, J. 2012. Filogenia intraespecífica y variabilidad genética de *Culex quinquefasciatus* Say (Díptera. Culicidae) con los genes mitocondriales ND5 y COI. Bol. Malar. Sal. Amb. Vol. I, II. N° 1.

Romero, P. 2008. Diversidad y estructura genética de *Bostryx californis* (Mollusca, Gastropoda) en base a polimorfismos del gen mitocondrial 16S rRNA. Tesis de grado. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

Santos, A., Cavalcanti, D., Cardoso, J. Tabarelli, M. 2007. Biogeographical relationships among tropical forest in north-eastern Brazil. Journal of Biogeography 34, 437-446.

Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H. Flook, P. 1994. Evolution weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and compilation of conserved polymerase chain reaction primers. Ann. Entomol.Soc. Am., 87: 651- 700.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution 28: 2731-2739.

Uribe, S. 1999. The status of the *Lutzomyia longipalpis* species complex and possible implications for Leishmania transmission. Mem Inst Oswaldo Cruz 94: 729 – 734.

Valencia, S. 1991. El problema de la especie. Informe de la comisión de desarrollo y medio ambiente de América Latina y el Caribe. N° 24. 22 Pp.

Vázquez, E., Castañeda, S., Garrido, T., Gutiérrez, T. 2009. Avances metodológicos para el estudio conjunto de la información genética, genealógica y geográfica en análisis evolutivos y de distribución. Rev. Chil. Hist. Nat. 82: 277-297.

Velasco, J., Araujo, R., Basset, J., Toledo, C. Machordom, A. 2006. Primeros datos sobre la presencia de Margaritifera margaritifera (L.) (Bivalvia, Unionoida) en la cuenca del Tajo (España). Iberus, 24 (2): 69-79.

Villanueva, D., Saldamando, C. 2013. *Tecia solanivora*, Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae): una revisión sobre su origen, dispersión y estrategias de control biológico. Ing. Cienc., vol. 9, nº. 18, pp. 197-214.

Ward, R., Ribeiro, A., Ready, P., Murtagh. 1983. Reproductive isolation between different forms of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae), the vector of *Leishmania donovani chagasi* Cunha & Chagas and its significance to kala-azar distribution in South America. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 78:269-280.

Ward, R., Ribeiro, A., Ryan, L., Falcão, A., Rangel, E. 1985. The distribution of two morphological forms of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae). Mem Inst Oswaldo Cruz 80: 145-148.

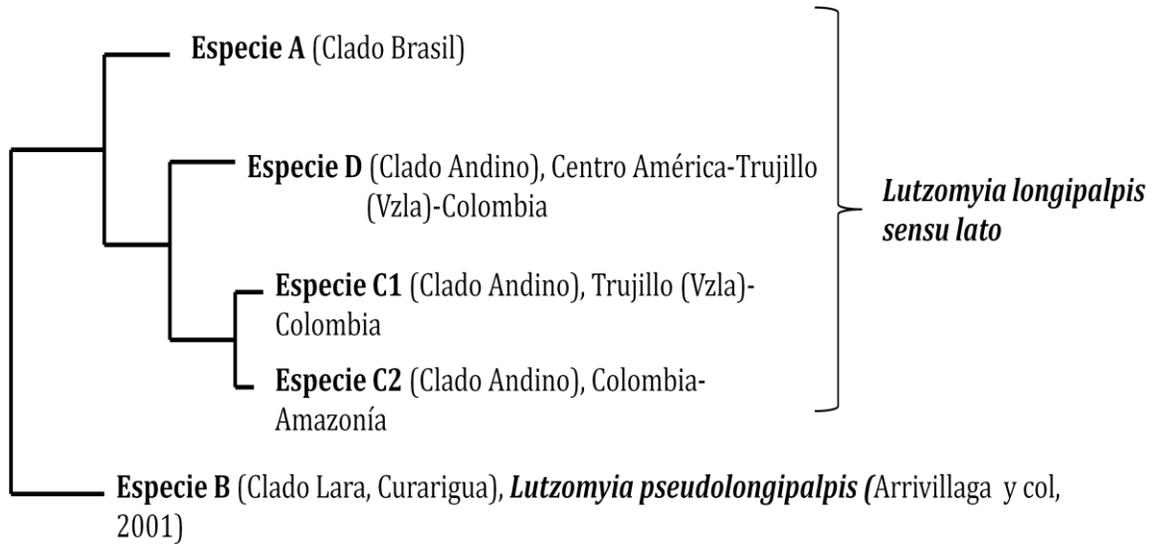
Ward, R., Phillips, A., Burnet, B., Marcondes, C. 1988. The *Lutzomyia longipalpis* complex reproduction and distribution. In: Biosystematics of hematophagous insects. Service. M. W. (Ed). Claredon Press, Oxford, p. 257- 269.

Yin, H., Mutebi, J., Marriott, S., Lanzaron, G. 1999. Metaphase karyotypes and G-banding in sandflies of the *Lutzomyia longipalpis* complex. Medical and Veterinary Entomolog. 13, 72-77.

Young, D., Duncan, M. 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyiasandflies* in Mexico, The West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae) Mem Am. Entomol. Inst. No. 54.

ANEXO 1

- Separación de especies



Especies genéticas del complejo *Lutzomyia longipalpis sensu lato* y *Lutzomyia pseudolongipalpis*

ANEXO 2

GLOSARIO

- **ADN (Ácido desoxirribonucleico):** Ácido nucleico de los cromosomas, que contiene la información genética codificada.
- **Coalescencia:** Propiedad de las cosas de unirse o fundirse (RAE) // Es un proceso estocástico que describe la forma en que los eventos genéticos poblacionales determinan la forma de la genealogía de las secuencias de genes muestreados, y se basa en la hipótesis de que todos los individuos de una población natural coalescen en un ancestro común (Dominguez-Dominguez y col., 2009).
- **Gen:** Es una región de ADN que codifica para ARN.
- **Haplotipo:** Es una combinación de alelos de diferentes loci de un cromosoma que son transmitidos juntos. Un haplotipo puede ser un locus, varios loci, o un cromosoma entero dependiendo del número de eventos de recombinación que han ocurrido entre un conjunto dado de loci. En un segundo significado, un haplotipo es un conjunto de polimorfismo de un solo nucleótido (SNPs) en un cromosoma particular que están estadísticamente asociados.
- **Polimorfismo de un solo nucleótido o SNP (Single Nucleotide Polymorphism):** Es una variación en la secuencia de ADN que afecta a una sola base (adenina (A), timina (T), citosina (C) o guanina (G)) de una secuencia del genoma.
- **Teoría de coalescencia:** se basa en la genética de poblaciones, al tomar en cuenta las fuerzas que producen y mantienen la variación genética, pero a diferencia de los procedimientos tradicionales, se apoya en un marco matemático, estadístico y probabilístico (Avise, 2000). Por lo tanto, la teoría de la coalescencia tendrá dos componentes: el primero, corresponde a los procesos estocásticos que conducen al último ancestro común de la muestra, por medio de diferentes modelos genético-poblacionales; y segundo, las propiedades estadísticas de los métodos de inferencia obtenidas de la muestra, que pueden detallar patrones de polimorfismo (Fu y Li, 1999).