

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



REGISTROS DE MOSQUITOS XVII: LOS MOSQUITOS (DIPTERA:
CULICIDAE) ANTROPOFÍLICOS DE LOCALIDADES DEL SUR DE QUINTANA
ROO, MÉXICO

Tesis

Que presenta RAHUEL JEREMÍAS CHAN CHABLÉ

como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

Torreón, Coahuila

Julio 2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO




REGISTROS DE MOSQUITOS XVII USANDO UN ENFOQUE INTEGRATIVO: MOSQUITOS (DIPTERA: CULICIDAE) ANTROPOFÍLICOS DE LOCALIDADES DEL SUR DE QUINTANA ROO, MÉXICO


Tesis

Que presenta RAHUEL JEREMÍAS CHAN CHABLÉ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA



Dr. Aldo Iván Ortega Morales
Director UAAAN



Ph.D. Luis M. Hernández Triana
Director Externo (APHA)

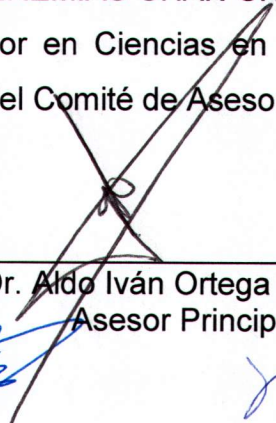
Torreón, Coahuila

Julio 2021

REGISTROS DE MOSQUITOS XVII USANDO UN ENFOQUE INTEGRATIVO:
MOSQUITOS (DIPTERA: CULICIDAE) ANTROPOFÍLICOS DE LOCALIDADES
DEL SUR DE QUINTANA ROO, MÉXICO

Tesis

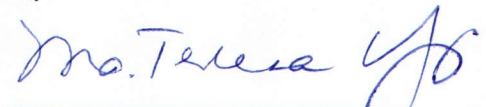
Elaborada por RAHUEL JEREMÍAS CHAN CHABLÉ como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias en Producción Agropecuaria con la supervisión y aprobación del Comité de Asesoría




Dr. Aldo Iván Ortega Morales
Asesor Principal




Dr. Francisco Javier Sánchez Ramos
Asesor



Dra. Ma. Teresa Valdés Perezgasga
Asesor




Dr. Javier Alfonso Garza Hernández
Asesor



Ph.D. Luis Miguel Hernández Triana
Asesor



Dra. Leticia Romana Gaytán Alemán
Jefe del Departamento de Postgrado



Dr. Marcelino Cabrera De La Fuente
Subdirector de Postgrado

Agradecimientos

A Dios, por la bendición de poder estudiar un Doctorado; por las fuerzas, salud y sabiduría brindadas durante mi estancia en el posgrado. Gracias Padre Eterno.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), por abrirme sus puertas y permitirme formarme profesionalmente en el nivel Doctorado.

Al Museo de Zoología de El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Unidad Chetumal, en particular a la Maestra Noemí Salas Suárez por facilitarme el equipo de laboratorio para el trabajo de entomología, y por permitirme revisar la Colección de Culicidae durante mi estancia en ECOSUR.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada para realizar estos trabajos.

A la red mexicana de Códigos de Barras de la Vida (MEXBOL), por el apoyo en el procesamiento de las muestras.

A los Servicios Estatales de Salud (SESA) de Quintana Roo, en particular al Dr. Pedro C. Mis Ávila, por su apoyo con los materiales y equipos para las colectas de campo.

A mi asesor principal, Dr. Aldo Iván Ortega Morales, por su apoyo y tiempo dedicado en mi formación académica. Muchas gracias.

A mi Comité Particular de Asesoría: Dr. Aldo Iván Ortega Morales, Dr. Francisco Javier Sánchez Ramos, Dra. Ma. Teresa Valdés Perezgasga, Dr. Javier Alfonso Garza Hernández y PhD. Luis Miguel Hernández Triana. Gracias por sus recomendaciones para hacer mejor este trabajo.

Mi más sincero agradecimiento a la MC. Arely Martínez Arce y al PhD. Luis M. Hernández Triana, por las revisiones, sugerencias y observaciones valiosas hechas a los artículos generados en el este trabajo.

A Rubén Castañeda, Edgardo Balam, Gemma Macías, Vanessa Contreras, Walter Puc, Guillermo Escalante, Gonzalo Pérez, Irving Ramírez, Nancy Cupul e Isaías Cauich Kúk por su valioso apoyo en las salidas a campo.

Al Biol. Humberto Bahena Basave, por su apoyo con las fotografías de las especies identificadas. Al MC. Holger Weissenberger por su apoyo en la elaboración de los mapas del área de estudio y puntos de muestreos.

Al MSP. Rafael Vázquez Marroquín, por por todo el apoyo durante mi estancia en el Doctorado. Muchas gracias mi estimado.

A todos los profesores y compañeros alumnos del Posgrado en Ciencias en Producción Agropecuria, muchas gracias por la amistad y el apoyo brindado.

A Aurelia Nájera Cruz, por su amistad y su invaluable apoyo con los trámites en el Postgrado.

A José Antonio Chan por su apoyo económico en los momentos cuando más lo necesité.

A mis pastores y a todos mis hermanos que estuvieron orando por un servidor para que Dios me guardara durante mis estudios de doctorado.

A mi amada esposa Elia L. Cauich Gerónimo, por todo su apoyo (en Laboratorio entomológico, emocional, etc.), muchas gracias amor. A mi hijita Yaeli Chan por su paciencia y amor durante todo este tiempo, gracias princesita.

A todos ustedes ¡MUCHAS GRACIAS!...

Dedicatoria

Al Eterno que siempre esta conmigo.

A mis padres Fernando Chan y Juana Chablé.

A mi esposa Elia Cauich, a mi hijita Yaeli Chan y a mi bebé que viene en camino.
Ustedes son mi motivación para seguir adelante.

CARTAS DE ACEPTACIÓN Y ENVÍO DE ARTÍCULOS

Aceptación de artículo 1

← Ecology and Evolution - Decision on Manuscript ID ECE-2018-09-01140.R1 [email ref: DL-RW-1-a]



WOA Admin <onbehalf@manuscriptcentral.com

>



Vie 22/02/2019 08:23 AM

Para: Usted; armartarce@ecosur.mx; pedro.mis@salud.qroo.gob.mx; agrortega@hotmail.com

CC: cfoote@wiley.com

22-Feb-2019

Dear Dr. Martínez-Arce:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "DNA Barcodes and Evidence of Cryptic Diversity of Anthropophagous Mosquitoes in Quintana Roo, Mexico" in its current form for publication in Ecology and Evolution.

We appreciate your efforts and attention to detail in responding to the points raised by the referees and associate editor. You have treated them with the care and attention we expect.

Do be sure to update your Data Accessibility statement during the production process to include your Genbank accession numbers (which I assume you will now have).

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of Ecology and Evolution, we look forward to your continued contributions to the Journal. Enjoy the benefits of an OA paper.

Sincerely,
Dr. Chris Foote
Editor in Chief, Ecology and Evolution
cfoote@wiley.com

Aceptación de artículo 2

Your Submission albopictus Mexico

From: **JOURNAL OF THE AMERICAN MOSQUITO CONTROL ASSOCIATION** <em@editorialmanager.com>

Date: Wed, 5 Aug 2020 at 10:19

Subject: Your Submission

To: Luis Miguel Hernandez-Triana <lhernandt@gmail.com>

CC: edjamca@csusb.edu

Ref.: Ms. No. 20-6935R1

New distribution records of *Aedes albopictus* in Quintana Roo, Mexico and its importance in public health
Journal of the American Mosquito Control Association

Dear Dr Hernandez-Triana,

I am pleased to tell you that your work has now been accepted for publication in Journal of the American Mosquito Control Association.

It was accepted on Aug 05, 2020

Comments from the Editor and Reviewers can be found below.

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards,

Lal S Mian, Ph.D.

Journal Editor

Journal of the American Mosquito Control Association

Aceptación de artículo 3

← Your Submission

De: em.jamca.0.6f2db6.6c256a47@editorialmanager.com <em.jamca.0.6f2db6.6c256a47@editorialmanager.com> en nombre de JOURNAL OF THE AMERICAN MOSQUITO CONTROL ASSOCIATION <em@editorialmanager.com>

Enviado: domingo, 8 de noviembre de 2020 06:07 a. m.

Para: Arely Martínez Arce <armartarce@ecosur.mx>

Asunto: Your Submission

CC: edjamca@csusb.edu

Ref.: Ms. No. 20-6941R1

NEW RECORDS AND UPDATED CHECKLIST OF MOSQUITOES (DIPTERA: CULICIDAE) IN QUINTANA ROO, MEXICO, USING COI DNA BARCODING

Journal of the American Mosquito Control Association

Dear Ms. Martínez-Arce,

I am pleased to inform you that your manuscript has now been accepted for publication in Journal of the American Mosquito Control Association. You will be next hearing from Allen press regarding galley proofs and page charges in a couple of weeks.

It was accepted on Nov 08, 2020

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards,

Lal S Mian, Ph.D.


Journal Editor


Journal of the American Mosquito Control Association


Comprobante de envío de artículo 4


← Manuscrito para someter 05 ✓


AA Arely Martínez Arce
Vie 02/04/2021 02:25 PM
Para: lromero@unmsm.edu.pe
CC: Usted



 Chan-Chable et al. 2021Rev.P...
63 KB

 Figura 2, Árbol NJ Mosquitos ...
774 KB

 Tablas MS mosquitos Chetum...
46 KB

 Carta_presentacion_RPB.pdf
148 KB

[5 archivos adjuntos \(2 MB\)](#) [Descargar todo](#) [Guardar todo en OneDrive](#)


Estimado Dr. Leonardo Romero

Es un gusto saludarle,
Por este medio envío a usted nuestro trabajo titulado "Código de Barras de ADN y nuevos registros de culicidos en la ciudad fronteriza de Chetumal, México" esperamos lo puedan considerar para publicar en su prestigiosa revista.

Saludos cordiales

Arely Martínez

Arely Martínez Arce
Estructura y función del bentos
Av. Centenario Km 5.5
Col. Pacto Obrero, Campesino
Chetumal, Quintana Roo, México
Ext. 4795

 EL COLEGIO DE LA FRONTERA SUR
ECOSUR

← [Rev peru biol] Envío recibido

De: Leonardo Romero <revistasinvestigacion@unmsm.edu.pe>

Enviado: jueves, 15 de abril de 2021 04:56 p. m.

Para: Arely Martínez Arce <armartarce@ecosur.mx>

Asunto: [Rev peru biol] Envío recibido

Arely MartinezArce:

Gracias por enviarnos su manuscrito "Código de Barras de ADN y nuevos registros de culícidos en la ciudad fronteriza de Chetumal, México" a Revista Peruana de Biología. Gracias al sistema de gestión de revistas online que usamos podrá seguir su progreso a través del proceso editorial identificándose en el sitio web de la revista:

URL del manuscrito: <https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/rpb/authorDashboard/submission/20146>

Nombre de usuaria/o: arely

Si tiene cualquier pregunta no dude en contactar con nosotros/as. Gracias por tener en cuenta esta revista para difundir su trabajo.

Leonardo Romero

Índice General

Contenido

Lista de figuras.....	ii
Lista de tablas.....	iii
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	v
INTRODUCCIÓN.....	1
Hipótesis general.....	4
Hipótesis específicos.....	4
Objetivo general.....	5
Objetivos específicos.....	5
REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
Familia Culicidae.....	6
Características y biología general.....	6
Clasificación taxonómica.....	7
Morfología externa.....	8
Ciclo de vida.....	15
Importancia en salud pública.....	17
Taxonomía integrativa.....	19
El CB-ADN en el estudio de la biodiversidad.....	19
La implementación del CB-ADN en la identificación de culícidos.....	22
Registros históricos de mosquitos en el estado de Quintana Roo.....	24
LITERATURA CITADA.....	26
ESTUDIO 1.....	¡Error! Marcador no definido.
ESTUDIO 2.....	53
ESTUDIO 3.....	58
ESTUDIO 4.....	64
CONCLUSIONES GENERALES.....	90

Lista de figuras

Figura 1. Huevos de mosquitos, mostrando variaciones en la forma y la escultura coriónica.....	9
Figura 2. Anatomía externa de larvas de mosquito, (A) <i>Anopheles maculipennis</i> , (B) <i>Aedes cinereus</i>	10
Figura 3. Vista postero-ventral de la cabeza de la larva de mosquito.....	11
Figura 4. Pupa de mosquito. Vista lateral de <i>Aedes aegypti</i> en posición de reposo en la superficie del agua; presencia de estructuras adultas visibles dentro de la cutícula de la pupa.....	12
Figura 5. Anatomía externa de mosquito adulto. (A) Estructuras generales en vista dorsal. (B) Ala, mostrando la típica venación y su nomenclatura.....	14
Figura 6. Genital en Culicidae mostrando las principales estructuras copulatorias utilizadas en la identificación taxonómica de los adultos machos.....	15
Figura 7. Ciclo de vida de un mosquito.....	16
Figura 8. ADN mitocondrial de la tortuga marina <i>Chelonia midas</i>	21

Lista de tablas

Tabla 1. Clasificación de Culicidae.....	8
Tabla 2. Principales Alfavirus y Flavivirus, especies de mosquitos vectores, y reservorios vertebrados.....	18-19

RESUMEN

Los mosquitos son vectores potenciales de patógenos que afectan a la salud humana. La correcta identificación de las especies, así como el descubrimiento y descripción de especies crípticas, son importante en salud pública para el control y manejo de vectores específicos. En el presente estudio se evaluó la diversidad de mosquitos antropofílicos en localidades (Chetumal, Sacxan, Palmar y Ramonal) del sur de Quintana Roo, utilizando datos morfológicos y moleculares (Código de Barras de ADN). Se colectó un total de 2,607 especímenes hembras adultas, pertenecientes a ocho géneros y 42 especies. Ocho especies (*Anopheles gabaldoni*, *An. darlingi*, *Psorophora columbiae*, *Culex inflicus*, *Cx. eastor*, *Cx. trifidus*, *Cx. lactator* y *Wyeomyia guatemala* s.l.) son nuevos registros para Quintana Roo. La mayoría de las especies formaron clados bien soportados en el árbol Neighbour-Joining (NJ). No se encontró una división genética clara entre *Cx. interrogador* y *Cx. nigripalpus*, y entre dos especies estrechamente relacionadas, *Aedes angustivittatus* y una especie no descrita del género *Aedes* (*Ae. n. sp.*). Se observaron distancias K2P intraespecífica máximas > 2.2 % en: *An. apicimacula* (8.10 %), *An. crucians* s.l. (4.4 %), *An. albimanus* (3.90 %), *Ae. cozumelensis* (3.40 %), *Ae. serratus* (3.9 %), *Haemagogus equinus* (3.9 %), *Ps. ferox* (4.5 %), *Cx. erraticus* (5.0 %), *Cx. taeniopus* (3.7 %) y *Limatus durhamii* (4.80%), en estas especies se muestra evidencia de diversidad críptica. El Código de Barras de ADN es una herramienta confiable para la identificación de especies de mosquitos en Quintana Roo. En algunas especies estrechamente relacionadas se recomienda utilizar marcadores genéticos adicionales con una mayor tasa mutacional.

Palabras claves: Código de Barras de DNA, distribución de mosquitos, diversidad críptica, México, nuevos registros, Quintana Roo, vigilancia de mosquitos.

ABSTRACT

Mosquitoes are potential vectors of pathogens that affect human health. The correct identification of species, as well as the discovery and description of cryptic species, are important in public health for the control and management of specific vectors. In the present study, the diversity of anthropophilic mosquitoes in localities (Chetumal, Sacxan, Palmar and Ramonal) of southern Quintana Roo, Mexico was evaluated using morphological and molecular data (DNA barcoding). A total of 2,607 adult female specimens were collected, belonging to eight genera and 42 species. Eight species (*Anopheles gabaldoni*, *An. darlingi*, *Psorophora columbiae*, *Culex inflicus*, *Cx. eastor*, *Cx. trificus*, *Cx. lactator*, and *Wyeomyia guatemala* s.l.) are new records for Quintana Roo. Most species formed well-supported clades in the Neighbour-Joining (NJ) tree. No clear genetic division was found between *Cx. interrogador* and *Cx. nigripalpus*, and between two closely related species, *Aedes angustivittatus* and an undescribed species of the genus *Aedes* (*Ae.* n. sp.). Maximum intraspecific K2P distances > 2.2 % were observed in: *An. apicimacula* (8.10 %), *An. crucians* s.l. (4.4 %), *An. albimanus* (3.90 %), *Ae. cozumelensis* (3.40 %), *Ae. serratus* (3.9 %), *Haemagogus equinus* (3.9 %), *Ps. ferox* (4.5 %), *Cx. erraticus* (5.0 %), *Cx. taeniopus* (3.7 %), and *Limatus durhamii* (4.80 %), these species show evidence of cryptic diversity. DNA Barcoding is a reliable tool for the identification of mosquito species in Quintana Roo. In some closely related species it is recommended to use additional genetic markers with a higher mutational rate.

Keywords: cryptic diversity, DNA barcodes, Mexico, mosquitoes distribution, mosquito surveillance, new records, Quintana Roo.

INTRODUCCIÓN

La familia Culicidae es un grupo diverso de insectos que pertenecen al orden Diptera y suborden Nematocera. Actualmente, existen 3,583 especies descritas en el mundo (Harbach, 2021) agrupadas dentro de dos subfamilias, Anophelinae y Culicinae, las cuales incluyen 11 tribus divididas en 41 géneros (WRBU, 2005; Foster y Walker, 2019). La mayoría de las especies habitan en regiones tropicales y subtropicales del mundo (Harbach, 2021), y presentan un desarrollo holometábolo completo en dos ambientes diferentes, acuático (inmaduros) y terrestre (adultos) (Burkett-Cadena, 2013).

Aunque los mosquitos se han estudiado más que otros grupos de insectos debido a su importancia en la salud pública, su conocimiento taxonómico está lejos de ser completo (Delgado-Serra *et al.*, 2020). La identificación de especies, en su mayoría, es por el método tradicional mediante el uso de claves dicotómicas que describen los caracteres morfológicos de una determinada etapa de vida, principalmente larva o imago (Versteirt *et al.*, 2015; Batovska *et al.*, 2016; Delgado-Serra *et al.*, 2020). Pero este método regularmente presenta limitaciones, por ejemplo requiere de conocimiento especializado en taxonomía de Culicidae, puede ser problemático cuando se trata de identificar especies morfológicamente similares o especímenes dañados durante la recolección o almacenamiento inadecuados que propician la pérdida de caracteres diagnósticos (Wang *et al.*, 2012; Batovska *et al.*, 2016; Talaga *et al.*, 2017; Weeraratne *et al.*, 2018). Además, la presencia de especies crípticas reveladas mediante herramientas moleculares ponen de manifiesto que la diversidad real de los mosquitos está lejos de ser completada (Versteirt *et al.*, 2015; Ruiz-Arrondo *et al.*, 2020).

Por otra parte, la correcta identificación de especies de vectores como los mosquitos es un paso fundamental para el diseño de estrategias de control eficaces (Bueno-Marí *et al.*, 2010; Delgado-Serra *et al.*, 2020). Durante los últimos 15 años, el uso de herramientas moleculares (ADN) como el “Código de barras de ADN” (CB-ADN) usando el gen Citocromo Oxidasa Subunidad I (COI)

como marcador molecular, ha dado la pauta para incluir esta herramienta en los estudios de identificación de mosquitos en diversas regiones del mundo (Rozo-Lopez y Mengual, 2015; Weeraratne *et al.*, 2018; Hernández-Triana *et al.*, 2019; Young *et al.*, 2020; Maekawa *et al.*, 2021). A la fecha, con los CB-ADN se ha logrado la identificación molecular de 1590 especies de culícidos (<http://www.boldsystems.org>), lo que corresponde a un 44.38 % de su riqueza específica conocida. El uso combinado del ADN y la morfología permite una identificación más precisa en la vigilancia de vectores y en el estudio de su diversidad genética (Ruiz-Arrondo *et al.*, 2020; Delgado-Serra *et al.*, 2020).

En México, el CB-ADN se ha utilizado para confirmar la presencia de *Psorophora (Janthinosoma) albipes* (Theobald) y *Anopheles (Anopheles) veruslanei* Vargas en el estado de Quintana Roo (Chan-Chable *et al.*, 2016, 2018b), para apoyar la evidencia de diversidad críptica dentro de la especie *Aedes (Ochlerotatus) taeniorhynchus* (Wiedemann) (Chan-Chable *et al.*, 2018a); también se ha utilizado para caracterizar la diversidad de culícidos presentes en el centro del país (Adeniran *et al.*, 2021) y, recientemente para reportar y confirmar la presencia de cinco especies, *Mansonia (Mansonia) dyari* Belkin, Heinemann, y Page, *Ae. (Howardina) guatemala* Berlin, *Ae. (Protomacleaya) insolitus* (Coquillett), *Limatus asulleptus* (Theobald) y *Trichoprosopon pallidiventer* (Lutz), en el territorio mexicano (Hernández-Guevara *et al.*, 2020; Hernández-Triana *et al.*, 2021).

Se ha señalado la correspondencia entre afecciones arbovirales y el movimiento migratorio de personas (Romaña *et al.*, 2003; Mora-Covarrubias *et al.*, 2010; Arredondo-García *et al.*, 2016, 2020). Los movimientos migratorios en la frontera sur de México influyen, en gran medida, en la incidencia de casos de chikungunya, dengue y paludismo la cual termina extendiéndose al resto del país (SSA, 2001; Arredondo-García *et al.*, 2020).

Bajo este contexto, nuestro objetivo fue identificar con datos morfológicos y genéticos los mosquitos de cuatro localidades (Chetumal, Sacxan, Palmar y Ramonal) en la frontera con Belice, a partir de claves de identificación taxonómica

y CB-ADN. Por su ubicación fronteriza, Chetumal es catalogada como un punto de llegada de migrantes, en su paso hacia Estados Unidos, provenientes de diversos lugares de Centroamérica, zonas consideradas endémicas de dengue y paludismo (SSA, 2001), Sacxan, Palmar y Ramonal son consideradas como zona endémica de dengue y paludismo por la Secretaría de Salud de Quintana Roo. Por otra parte en la zona limítrofe México-Belice, Ramonal es un punto donde existe tráfico de mercancías entre habitantes de ambos países, dicha actividad puede favorecer el desplazamiento de los mosquitos y las enfermedades que estos transmiten. Lo anterior recalca el alcance que tiene el monitoreo de los vectores en localidades fronterizas (Mora-Covarrubias *et al.*, 2010; Sinti-Hesse *et al.*, 2019).

Hipótesis general

Debido a la falta de estudios taxonómicos y de distribución de culícidos en el Estado de Quintana Roo, se encontrará registros nuevos y especies nuevas.

Hipótesis específicos

1. La distancia genética interespecífica en especies de mosquitos es mayor al 2 % y este valor permitirá separar a las especies analizadas.
2. La distancia genética intraespecífica en mosquitos es menor al 2 % y permite agrupar a los especímenes con base en sus secuencias y contrastar la morfología.

Objetivo general

Identificar morfológicamente y mediante Código de Barras de ADN los mosquitos Culicidae colectados durante este estudio.

Objetivos específicos

1. Identificar a los mosquitos hasta el nivel de especie con el uso de claves de identificación taxonómica.
2. Obtener los CB-ADN de las diferentes especies de mosquitos identificadas morfológicamente.
3. Comparar los CB-ADN vs la identificación morfológica y aquellas secuencias disponibles en las bases de datos Genbank y BOLD Systems.
4. Actualizar la lista de especies de mosquitos presentes en Quintana Roo.

REVISIÓN DE LITERATURA

Familia Culicidae

Características y biología general

En etapa adulta son insectos delgados y de patas largas que se distinguen de otros Nematoceros (Ceratopogonidae, Chaoboridae, Chironomidae, Dixidae) por su larga probóscide y la presencia de escamas en la mayor parte del cuerpo especialmente sobre las venas de las alas (Harbach, 2021). Las larvas se distinguen de otros insectos acuáticos por la ausencia de patas, la presencia de una cabeza distintiva con cerdas bucales y antenas, un tórax bulboso más ancho que la cabeza y el abdomen, papilas anales posteriores y un par de aberturas respiratorias (subfamilia Anophelinae) o un sifón alargado (subfamilia Culicinae) que nace cerca del extremo del abdomen (Foster y Walker, 2019; Harbach, 2021). Las especies de mosquitos se identifican normalmente, y de forma más fiable, como larvas de cuarto estadio y adultos (Harbach, 2021).

Las larvas de los mosquitos se desarrollan en ambientes acuáticos de agua dulce y salobre, utilizan sus cerdas del aparato bucal para alimentarse de los detritos del agua (Harbach, 2021). En especies del género *Toxorhynchites*, las larvas se alimentan de larvas de otras especies de mosquitos, los cuales poseen piezas bucales modificadas para tal fin (Rueda y Debboun, 2020; Harbach, 2021). Algunas larvas recurren al carroñeo o al canibalismo cuando escasea el alimento (Harbach, 2021).

En etapa adulta, los mosquitos se encuentran principalmente en sitios de reposo, como cuevas, espacios entre rocas, en el envés de las plantas, etc. (Harbach, 2021). Se encuentran principalmente en el dosel del bosque, la distribución vertical depende en gran medida de las preferencias de alimentación; los machos se alimentan del néctar, melaza, zumos y exudados de las plantas (Harbach, 2021); mientras que las hembras ingieren sangre de vertebrados principalmente. Los vertebrados son una fuente común de sangre para la mayoría de las especies, pero muchas de ellas también atacan a otros animales como los de sangre fría (serpientes, tortugas, sapos, ranas y lagartos) y a otros insectos (ninfas de cigarras, larvas de lepidópteros y mantis) (Harbach, 2021). Está

documentado que *Uranotaenia sapphirina* se alimenta de lombrices y sanguijuelas (Reeves *et al.*, 2018). La hora de vuelo y la actividad de alimentación suelen ser bastante específicas para la mayoría de las especies, algunas especies son activas durante la noche (nocturnas) o el crepúsculo (crepusculares), mientras que otras son activas durante las horas de luz (diurnas) (Harbach, 2021).

Clasificación taxonómica

La familia Culicidae pertenece al filo Arthropoda, clase Insecta (Hexapoda), orden Diptera, suborden Nematocera e infraorden Culicomorpha. Esta última categoría taxonómica consta de dos superfamilias: Chironomoidea y Culicoidea. La superfamilia Chironomoidea agrupa a las familias Chironomidae y Thaumaleidae, las cuales poseen piezas bucales no perforadoras, y Simuliidae y Ceratopogonidae, que perforan vertebrados o invertebrados. La superfamilia Culicoidea agrupa a las familias Dixidae, Corethrellidae, Chaoboridae y Culicidae, de los cuales el segundo y el cuarto se alimentan de sangre de vertebrados (Foster y Walker, 2019).

Culicidae constan de 3,583 especies (Harbach, 2021). La clasificación actual de los culícidos reconoce dos subfamilias: Anophelinae y Culicinae. Existen 41 géneros de mosquitos, 3 de los cuales pertenecen a la subfamilia Anophelinae y 38 pertenecen a Culicinae. Los culicinos están organizados en 11 tribus, siendo Aedini y Sabethini las más diversas en términos de número de géneros y especies en todo el mundo (WRBU, 2005) (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de Culicidae. Esta clasificación está basada en Knight y Stone (1977), y modificada según las actualizaciones del WRBU. Entre paréntesis las abreviaturas genéricas de dos letras reconocidas por la American Mosquito Control Association y utilizadas en varias revistas y libros (Adaptado de WRBU, 2021).

Subfamilia	Tribu	Género
Anophelinae		<i>Anopheles</i> (An.), <i>Bironella</i> (Bi.), <i>Chagasia</i> (Ch.)
Culicinae	Aedeomyiini	<i>Aedeomyia</i> (Ad.)
	Aedini	<i>Aedes</i> (Ae.), <i>Armigeres</i> (Ar.), <i>Eretmapodites</i> (Er.), <i>Haemagogus</i> (Hg.), <i>Heizmannia</i> (Hz.), <i>Opifex</i> (Op.), <i>Psorophora</i> (Ps.), <i>Udaya</i> (Ud.), <i>Verrallina</i> (Ve.), <i>Zeugomyia</i> (Ze.)
	Culicini	<i>Culex</i> (Cx.), <i>Deinocerites</i> (De.), <i>Galindomyia</i> (Ga.), <i>Lutzia</i> (Lu.)
	Culisetini	<i>Culiseta</i> (Cs.)
	Ficalbiini	<i>Ficalbia</i> (Fi.), <i>Mimomyia</i> (Mi.)
	Hodgesiini	<i>Hodgesia</i> (Ho.)
	Mansoniini	<i>Coquillettidia</i> (Cq.), <i>Mansonia</i> (Ma.)
	Orthopodomyiini	<i>Orthopodomyia</i> (Or.)
	Sabethini	<i>Isostomyia</i> (Is.), <i>Johnbelkinia</i> (Jb.), <i>Kimia</i> (Km.), <i>Limatus</i> (Li.), <i>Malaya</i> (Ml.), <i>Maorigoeldia</i> (Mg.), <i>Onirion</i> (On.), <i>Runchomyia</i> (Ru.), <i>Sabethes</i> (Sa.), <i>Shannoniana</i> (Sh.), <i>Topomyia</i> (To.), <i>Trichoprosopon</i> (Tr.), <i>Tripteroides</i> (Tp.), <i>Wyeomyia</i> (Wy.)
	Toxorhynchitini	<i>Toxorhynchites</i> (Tx.)
Uranotaeniini	<i>Uranotaenia</i> (Ur.)	

La familia Culicidae es monofilético, pero las relaciones más profundas dentro de ella aún no están resueltas. La subfamilia Anophelinae es un linaje monofilético y basal a todos los demás Culicidae, y dentro de Anophelinae el género *Chagasia* es un linaje monofilético basal. La subfamilia Culicinae no es demostrable como grupo monofilético en relación con el género *Toxorhynchites*. Las tribus Aedini, Culicini y Sabethini son monofiléticas, pero la monofilia de las otras tribus no ha sido probada y sus relaciones filéticas son inciertas (Harbach, 2021).

Morfología externa

En cuanto a la morfología que presenta la familia Culicidae, los huevos de la mayoría de las especies son alargados, ovoides o fusiformes; otros son esféricos o romboides. El corion de los huevos, suele tener estructuras superficiales

intrincadas y patrones que diagnostican a la especie o género en particular (Harbach y Knight, 1980; Foster y Walker, 2019) (Figura 1), por ejemplo en las especies del género *Anopheles* los huevos tienen unos compartimentos transparentes llenos de aire que los flanquean y le sirven de flotadores (Figura 1A). En el género *Culex*, los huevos tienen una corola en forma de copa en uno de sus extremos (Figura 1B) que les permite asentarse verticalmente en la superficie del agua en forma de balsa, los extremos superiores tienen gotas apicales con una sustancia química que se cree mantiene la balsa en posición vertical (Foster y Walker, 2019).

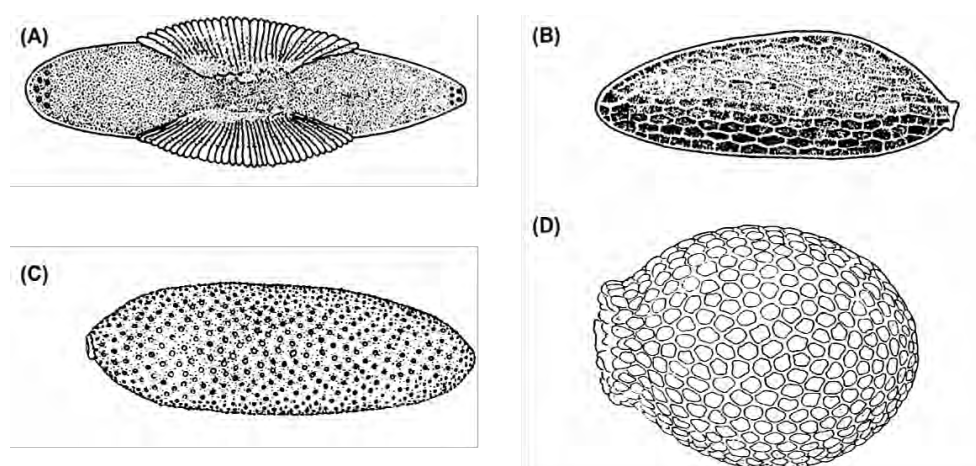


Figura 1. Huevos de mosquitos, mostrando variaciones en la forma y la escultura coriónica. (A) *Anopheles*, (B) *Culex*, (C) *Aedes aegypti*, y (D) *Toxorhynchites brevipalpis* (Adaptado de Foster y Walker, 2019).

Las larvas de los mosquitos presentan muchos caracteres taxonómicos que son fáciles de observar en los especímenes montados en laminillas (Figura 2). Las larvas pasan por cuatro estadios o instares, que se parecen mucho entre sí, excepto por su tamaño.

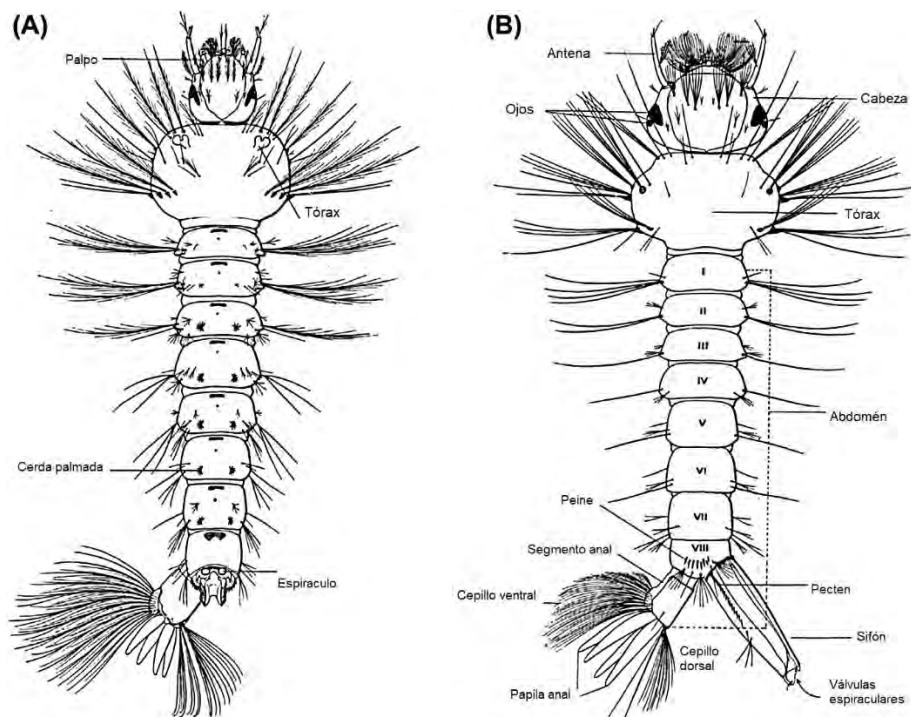


Figura 2. Anatomía externa de larvas de mosquito, (A) *Anopheles maculipennis*, (B) *Aedes cinereus* (Adaptado de Foster y Walker, 2019).

La cabeza de las larvas está definida por una cápsula que contiene un par de ojos, un par de antenas de forma y longitud variables, y piezas bucales masticadoras que llevan una variedad de cepillos, peines y barredores utilizados en la alimentación (Harbach y Knight, 1980) (Figura 3). Los cepillos palatinos laterales del labrum crean corrientes de agua que atraen las partículas flotantes o en suspensión hacia la boca, se cree que los barredores y cepillos de las mandíbulas, así como los cepillos de los maxilares, recogen y empaquetan las partículas para crear un bolo alimenticio en la faringe (Foster y Walker, 2019). En las larvas depredadoras (*Toxorhynchites* spp), las mandíbulas y los maxilares están fuertemente dentados lo cual les sirve para sujetar a la presa. El tórax es ancho, con tres segmentos indistintos y sin patas.

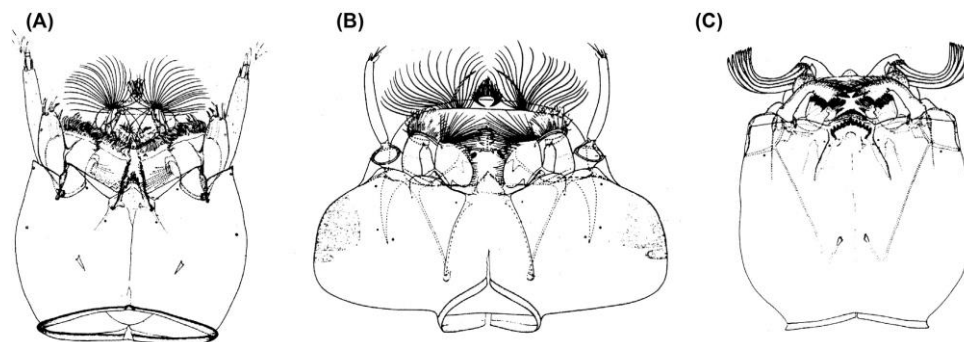


Figura 3. Vista postero-ventral de la cabeza de la larva de mosquito. (A) *Anopheles*, (B) *Aedes*, y (C) *Toxorhynchites* (Adaptado de Harbach y Knight, 1980).

El abdomen larval es más estrecho que el tórax, de forma cilíndrica y esta compuesta por ocho segmentos, siendo el penúltimo un compuesto de los segmentos 8 y 9. En la parte dorsal de este segmento se abre un par de espiráculos (Figura 2). En los Culicinae los espiráculos se abren en el extremo del sifón respiratorio, un tubo alargado que se extiende dorsalmente. El sifón de *Coquillettidia* y *Mansonia* es corto y termina en una punta fuertemente esclerotizada con un borde dorsal en forma de sierra que se utiliza para perforar y permanecer alojado en el tejido vegetal de las plantas acuáticas (Foster y Walker, 2019; Harbach, 2021). En los anofelinos el sifón es ausente, y los espiráculos se encuentran en una placa espiracular corta (Figura 2). El abdomen, también suele tener cuatro papilas anales utilizadas principalmente para la osmorregulación. La región terminal de la larva presenta varias estructuras útiles para su identificación, éstas incluyen las escamas del peine en el segmento ocho, espinas del pecten en el sifón, un esclerito en forma de silla de montar que rodea el segmento anal y varios mechones y cepillos de cerdas (Figura 2).

Las pupas de mosquito tienen forma de coma, con la cabeza y el tórax unidos para formar un cefalotórax y el abdomen enroscado debajo de éste (Figura 4). Del mesotórax dorsal sobresalen un par de tubos respiratorios o trompetas de aire, a través de los cuales la pupa obtiene oxígeno en la superficie del agua. Dentro del cefalotórax, los apéndices en desarrollo de la cabeza y el tórax del adulto suelen verse enroscados ventralmente; envuelven una bolsa de aire, el

espacio aéreo ventral, que proporciona flotabilidad para ayudar a mantener a la pupa en la superficie del agua cuando está en reposo (Rossi y Almirón, 2004; Foster y Walker, 2019). Al final del abdomen hay dos paletas anchas unidas al octavo segmento (Figura 4).

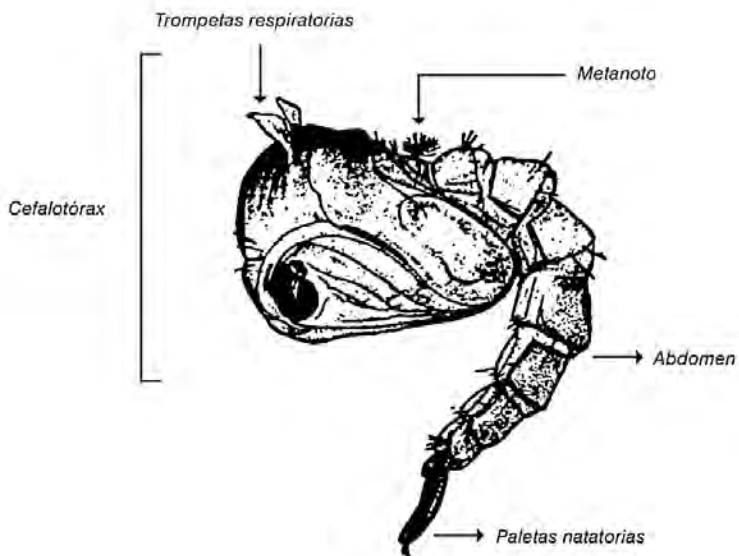


Figura 4. Pupa de mosquito. Vista lateral de *Aedes aegypti* en posición de reposo en la superficie del agua; presencia de estructuras adultas visibles dentro de la cutícula de la pupa. (Tomado de Rossi y Almirón, 2004).

Los culícidos en etapa adulta, como ocurre con otros dípteros, su cuerpo está dividido en tres regiones (cabeza, tórax y abdomen), tienen un par de antenas, dos pares de alas y tres pares de patas muy alargadas (Rossi y Almirón, 2004) (Figura 5). La superficie del cuerpo está cubierta de escamas y numerosas cerdas que forman los patrones y colores característicos de cada especie (Harbach y Knight, 1980). Presentan un par de ojos compuestos, cada uno con 350 a 900 lentes ommatidiales, que envuelven la parte delantera y los lados de la cabeza (Foster y Walker, 2019). Las antenas son largas y filamentosas, y suelen ser sexualmente dimórficas; el pedicelo en la base de la antena es una gran estructura globular (Foster y Walker, 2019). Además de las largas fibrillas, la antena tiene una variedad de estructuras sensoriales, incluyendo aquellas para detectar los olores del huésped (Rossi y Almirón, 2004).

La probóscide del mosquito es prominente y se proyecta en la parte anterior al menos dos tercios de la longitud del abdomen (Figura 5). Está formada por el complemento básico de las piezas bucales de los insectos: el labrum, las mandíbulas, la hipofaringe, las maxilas y el labio (Harbach y Knight, 1980). Las cuatro primeras estructuras han evolucionado hasta convertirse en finos estiletos, formando un fascículo ajustado que en las hembras se utiliza para penetrar en la piel del huésped (Foster y Walker, 2019). En el género *Toxorhynchites*, las mandíbulas y los maxilares están atrofiados, por lo que no pueden perforar la piel.

Los palpos maxilares surgen en la base de la probóscide y contienen varios tipos de sensilas. Los palpos suelen ser cortos en las hembras de Culicinae, pero largos en la mayoría de los machos de Culicinae y ambos sexos de Anophelinae (Foster y Walker, 2019).

El tórax del mosquito forma una unidad locomotora relativamente rígida y llena de músculos. Tiene tres segmentos: el protórax, el mesotórax y el metatórax. Cada segmento tiene un par de patas articuladas unidas por coxas en la parte inferior del tórax; además, el mesotórax tiene un par de alas funcionales, y el metatórax un par de estructuras nudosas llamadas halterios que sirven para controlar el vuelo, situados justo detrás de las inserciones de las alas; los tarsos están provistos de dos garras y una almohadilla central, el empodio; las alas son estrechas y tienen un patrón distintivo de venas que presentan escamas (Rueda y Debboun, 2020).

El abdomen está claramente segmentado y tiene la capacidad de expansión y cierto movimiento, debido a las zonas membranosas entre cada tergito y esternito (Foster y Walker, 2019). Esto permite la expansión de la pared abdominal para dar cabida a grandes cantidades de sangre y a las puestas de huevos en desarrollo. Los segmentos abdominales 5 a 8 son progresivamente más pequeños, de modo que el abdomen se estrecha hacia el extremo posterior (Figura 5).

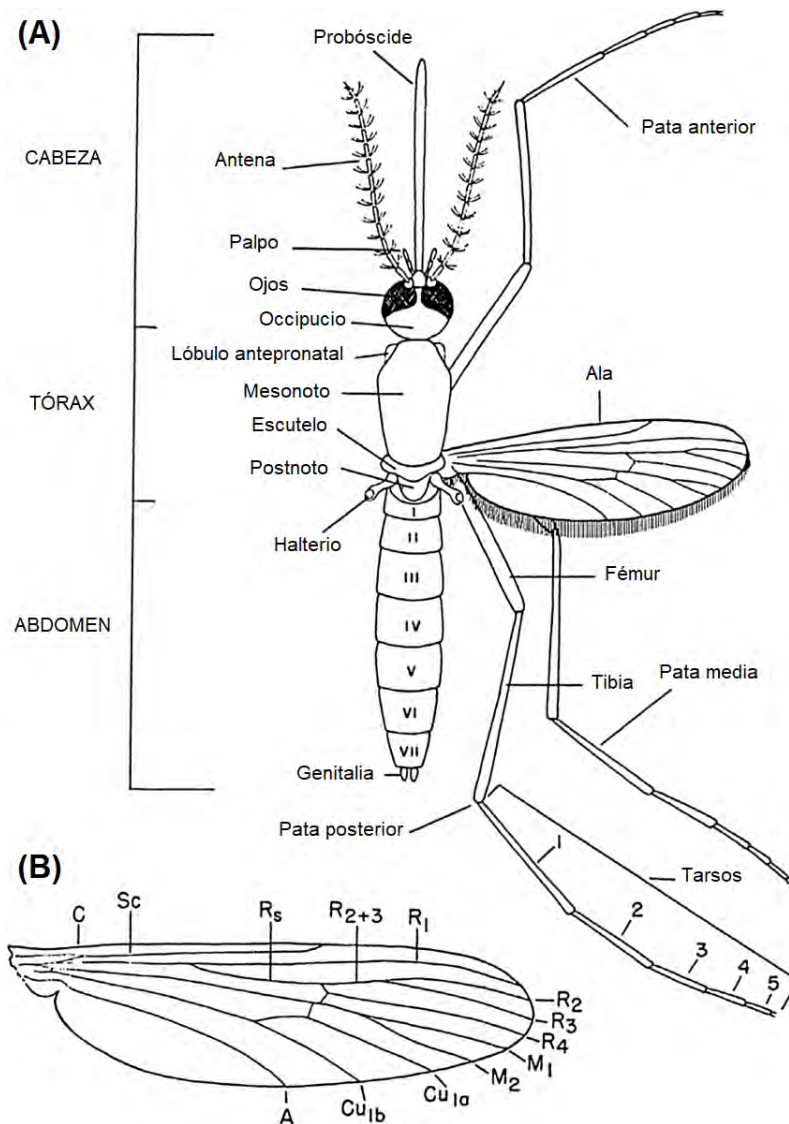


Figura 5. Anatomía externa de mosquito adulto. (A) Estructuras generales en vista dorsal. (B) Ala, mostrando la típica venación y su nomenclatura (Adaptado de Ross y Horsfall, 1965).

El segmento nueve contiene los cercos, el lóbulo postgenital de la hembra, los ganchos y otras estructuras genitales del macho. Los complejos y variados genitales en el macho proporcionan una fuente útil de caracteres para la identificación de las especies (Harbach y Knight, 1980) (Figura 6).

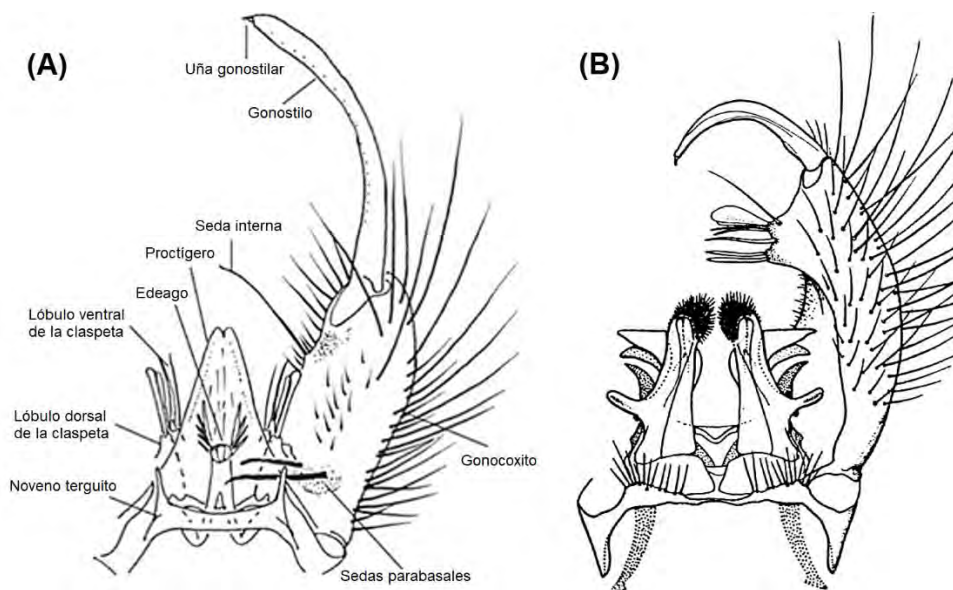


Figura 6. Genital en Culicidae mostrando las principales estructuras copulatorias utilizadas en la identificación taxonómica de los adultos machos. (A) Terminalia de *Anopheles walkeri*. (B) Genitalia de *Culex quinquefasciatus*, se han omitido el gonocoxito y el gonóstilo del lado izquierdo (superior). (Adaptado de Ross y Roberts, 1943 y Carpenter y LaCasse, 1955).

Ciclo de vida

El ciclo de vida de los mosquitos es holometábolo y se completa en dos entornos diferentes, uno acuático y otro terrestre (Rueda y Debboun, 2020) (Figura 7). Las larvas y pupas se desarrollan en una amplia gama de hábitats acuáticos: aguas superficiales temporales (charcos de lluvia y aguas de inundación), aguas superficiales permanentes (arroyos, pantanos y lagos) y recipientes naturales (huecos de árboles, axilas de hojas, cáscaras de frutas, cáscaras de moluscos, etc.) y artificiales (piletas, botes y neumáticos). Cada especie en particular tiende a ovipositar y desarrollarse en lugares con propiedades estructurales y químicas específicas (Rossi y Almirón, 2004).

Los huevos se depositan sobre o en el agua, y en sustratos susceptibles de ser inundados. En los trópicos y subtropicos los huevos suelen completar el desarrollo embrionario en los 2 a 3 días después de la puesta, pero pueden tardar hasta una o varias semanas en climas fríos; los huevos pueden tolerar períodos

de frío y desecación y pueden permanecer viables durante años (Foster y Walker, 2019).

En el caso de *Aedes aegypti*, en condiciones ideales de alimentación y temperatura (26-28 °C), la fase larvaria puede durar tan sólo 5 a 6 días, los tres primeros estadios se completan en aproximadamente 1 día cada uno y el cuarto dura hasta 3 días (Foster y Walker, 2019). El desarrollo larval es variable entre las especies y géneros, por ejemplo *Toxorhynchites* spp. suelen tardar de 2 a 3 semanas. A temperaturas más frías o cuando el alimento escasea, el crecimiento se vuelve más lento y puede prácticamente cesar con las larvas permaneciendo vivas durante meses (Rueda y Debboun, 2020).

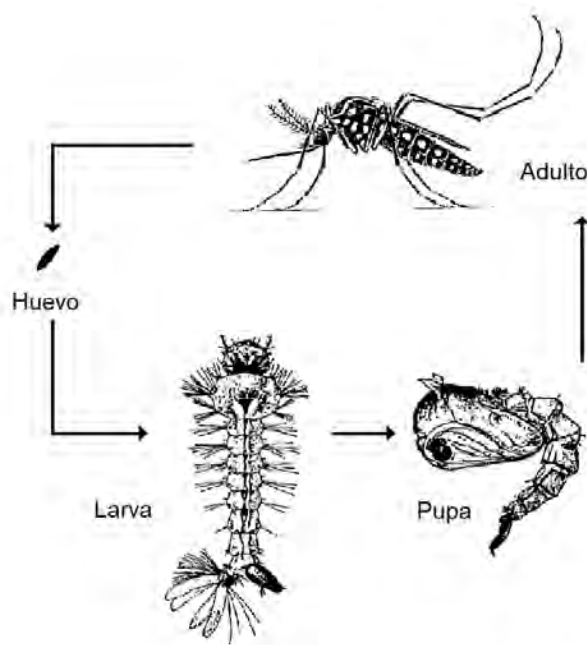


Figura 7. Ciclo de vida de un mosquito (Adaptado de Rossi y Almirón, 2004).

En en aguas cálidas, la fase de pupa suele durar unos dos días en ambos sexos, el adulto recién emergido es capaz de realizar vuelos cortos unos minutos después, pero no puede mantener vuelos largos durante muchas horas hasta que la cutícula este esclerotizada por completo. Durante los primeros 3 a 5 días de vida adulta ambos sexos en la mayoría de las especies obtienen azúcar del néctar de las plantas, hasta alcanzan la madurez sexual y se aparearse. En algunas especies como *Culiseta inornata* y *Deinocerites cáncer* la maduración

sexual se completa en el momento de la emergencia o sólo unas horas después, y el apareamiento se produce casi inmediatamente (Foster y Walker, 2019). Las hembras suelen aparearse una sola vez, mientras que los machos pueden inseminar varias hembras antes de que se agoten sus reservas de esperma.

Sólo las hembras se alimentan de sangre de vertebrados. En la mayoría de los mosquitos, la ingestión y la digestión de sangre inician el desarrollo de los huevos mediante la estimulación de una cascada de hormonas procedentes del cerebro y los ovarios (Foster y Walker, 2019; Rueda y Debboun, 2020).

Importancia en salud pública

Los mosquitos son importantes en la salud pública debido a que las hembras de varias especies se alimentan de sangre (hematófagas) humana, y durante esta alimentación pueden transmitir patógenos que causan infecciones y enfermedades en humanos, animales domésticos y silvestres (Burkett-Cadena, 2013; Rueda y Alarcón-Elbal, 2020; Villarreal-Treviño *et al.*, 2020). Las enfermedades transmitidas por los mosquitos son causadas por tres grupos de patógenos: los virus, los protozoos de la malaria y los nematodos de la filaria (Foster y Walker, 2019; Harbach, 2021). Por lo anterior, los mosquitos son la causa indirecta de más morbilidad y mortalidad en los humanos que cualquier otra plaga de artrópodos en el mundo (Rueda y Debboun, 2020; Harbach, 2021).

Estas enfermedades son transmitidas al ser humano a través de la picadura de un mosquito infectado por un parásito, como en el caso de la malaria, o por un virus, como en el caso del Dengue, la fiebre amarilla, el Chikungunya, el virus del Nilo Occidental, el virus del Zika, etc (Burkett-Cadena, 2013). Además, los mosquitos no sólo transmiten enfermedades que afectan a los seres humanos, sino que también pueden transmitir patógenos graves a los que son susceptibles los perros y los caballos, como el gusano del corazón del perro, la Encefalitis Equina del Este y la Encefalitis Equina Occidental (Foster y Walker, 2019; Duguma *et al.* 2020; Rueda y Debboun, 2020). A continuación se presenta una tabla (Tabla 2) que enlista a los principales Arbovirus y Flavivirus, las especies de mosquitos vectores, y sus reservorios vertebrados.

Tabla 2. Principales Alfavirus y Flavivirus, especies de mosquitos vectores, y reservorios vertebrados (Adaptado de Foster y Walker, 2019).

Virus		Mosquito(s) vector(es)	Reservorio vertebrado
Encefalomiелitis Equina del Este		<i>Culiseta melanura</i> , <i>Ae. sollicitans</i> , <i>Coquillettidia perturbans</i> , <i>Cx. nigripalpus</i> , <i>Cx. (Melaniconion) spp.</i>	Aves
Encefalomiелitis Occidental	Equina	<i>Cx. tarsalis</i> , <i>Cx. (Melaniconion) spp.</i> , <i>Ae. albifasciatus</i> , <i>Ae. melanimon</i> , <i>Ae. dorsalis</i>	Aves
Encefalomiелitis Venezolana	Equina	<i>Cx. (Mel.) spp.</i> , <i>Aedes</i> , <i>Psorophora</i> , <i>Anopheles</i> y <i>Mansonia spp.</i>	Roedores
Chikungunya		<i>Ae. aegypti</i> , <i>Ae. africanus</i>	Primates incluido el hombre
Rio Ross		<i>Cx. annulirostris</i> , <i>Ae. vigilax</i> , <i>Ae. polynesiensis</i>	Humanos y roedores
Fiebre amarilla		<i>Ae. aegypti</i> , <i>Ae. africanus</i> , <i>Ae. bromeliae</i> , <i>Ae. furcifer</i> , <i>Ae. luteocephalus</i> , <i>Ae. metallicus</i> , <i>Ae. taylori</i> , <i>Ae. vittatus</i> , <i>Haemagogus</i> y <i>Sabethes spp.</i>	Humanos en ambientes urbanos, monos en la serval.
Dengue		<i>Ae. aegypti</i> , <i>Ae. albopictus</i> , <i>Ae. niveus</i> , <i>Ae. africanus</i> , <i>Ae. furcifer</i> , <i>Ae. taylori</i> , <i>Ae. luteocephalus</i> , <i>Ae. opok</i> , <i>Ae. scutellaris</i> , <i>Ae. polynesiensis</i> , <i>Ae.</i>	Humanos y monos

	<i>pseudoscutellaris</i> , <i>Ae. rotumae</i>	
Encefalitis japonesa	<i>Cx. tritaeniorhynchus</i> , <i>Cx. gelidus</i> , <i>Cx. vishnui</i> complex	Aves y cerdos
Encefalitis de San Luis	<i>Cx. pipiens</i> , <i>Cx. quinquefasciatus</i> , <i>Cx. tarsalis</i> , <i>Cx. nigripalpus</i>	Aves
Encefalitis del Valle de Murray	<i>Cx. annulirostris</i>	Aves
Oeste de Nilo	<i>Cx. univittatus</i> , <i>Cx. modestus</i> , <i>Cx. spp.</i>	Aves
Zika	<i>Ae. aegypti</i> , <i>Ae. albopictus</i> , <i>Ae. africanus</i> , <i>Ae. luteocephalus</i>	Aves, humanos y monos

Taxonomía integrativa

La taxonomía integrativa es la ciencia que estudia la biodiversidad desde múltiples disciplinas complementarias (Dayrat, 2005). En el estudio de la biodiversidad o de grupos taxonómicos complejos, la taxonomía integrativa se basa en evidencia múltiple (datos morfológicos, moleculares, ecológicos, etológicos, etc.) para delimitar a las especies en cuestión (Ciprandi Pires y Marinoni, 2010; Martínez López, 2015).

El CB-ADN en el estudio de la biodiversidad

La biodiversidad comprende la variedad de ecosistemas, especies (plantas, animales, hongos, microorganismos) y genes (CONABIO, 2021). La biodiversidad es importante para la sobrevivencia de la especie humana, porque de ella se obtienen bienes y servicios, como la madera para las viviendas y el alimento para el sustento diario (Yáñez, 2014). No obstante, las actividades humanas generadoras de contaminación, y la explotación excesiva de estos recursos están llevando a la pérdida de la biodiversidad, por lo que es importante

priorizar su conservación y descripción para tomar medidas de manejo y aprovechamiento de una forma sustentable (Paz *et al.*, 2011).

Ante esta situación, en el 2005 se llevo a cabo la primera conferencia internacional sobre Código de Barras de la Vida (Barcoding life) en el Museo de Historia Natural de Londres (Marshall, 2005). Dicha conferencia tuvo como finalidad, proponer un sistema basado en secuencias de ADN para acelerar la identificación de los seres vivos del planeta (Lanteri, 2007). Así, se propuso usar una secuencia de proximadamente 650 nucleótidos del gen mitocondrial COI (Figura 8), como marcador universal para las especies (Hebert *et al.*, 2003 a, b), de forma análoga a cómo lo hacen los códigos de barras de uso comercial (Lanteri, 2007). La alta tasa de sustitución del gen COI, es traducida en alta variación de las secuencia entre especies del mismo género, lo cual le da utilidad en taxonomía (Hebert *et al.*, 2003 a, b; Luo *et al.*, 2011).

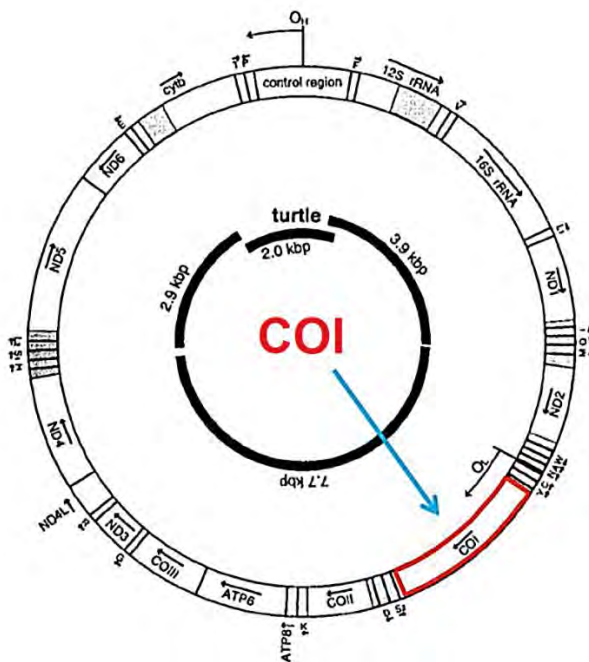


Figura 8. ADN mitocondrial de la tortuga marina *Chelonia mydas*. Se resalta el gen Citocromo Oxidasa Subunidad I (COI) (Adaptado de Kumazawa y Nishida, 1999).

Si bien el CB-ADN usando el marcador COI ha resultado exitoso para la identificación de especies animales como los insectos, no ha sido así en otros grupos como los cnidarios, las esponjas, plantas superiores y hongos (Paz *et al.*, 2011; Moritz y Cicero, 2004). Por ejemplo, en cnidarios y esponjas, el COI presentan una tasa evolutiva más lenta, resultando en una distancia genética entre especies cercanas demasiado pequeña que dificulta la delimitación confiable a nivel de especie (Huang *et al.*, 2008). Para estos casos se ha sugerido utilizar otros marcadores (Moura *et al.*, 2008; Gonzalez *et al.*, 2009; Yao *et al.*, 2010; Hollingsworth, 2011; Eberhardt, 2010; Schoch *et al.*, 2012; Meyer *et al.*, 2019).

De esta forma, la iniciativa de Código de Barras de la Vida con la implementación de la técnica de CB-ADN ha facilitado y permitido avanzar en el trabajo de documentar la biodiversidad del planeta. En los últimos 15 años con los CB-ADN se ha logrado identificar 323,112 especies de organismos vivos, 212,671 animales, 78,734 plantas, 30,679 hongos y 1,028 protistas (<https://www.boldsystems.org>). Muchas de estas especies identificadas consisten en especies que eran desconocidas por la ciencia, complejos de especies y/o especies crípticas. El término “especie críptica”, muchas veces también denominada “especie hermana”, se refiere a especies isomórficas difíciles de identificar a simple vista, pero que son especies diferentes genéticamente (Hebert *et al.*, 2004; Pfenninger y Schwenk, 2007; Zheng, 2020).

Finalmente, las secuencias de CB-ADN generados de los diferentes proyectos se depositan en la base de datos Barcode of Life Data Systems (BOLD), un banco de trabajo en línea que incluye una biblioteca de referencia de CB-ADN que puede utilizarse para asignar identidades a secuencias de origen desconocido (Ratnasingham y Hebert, 2007). BOLD es un repositorio de búsqueda de registros de CB-ADN que almacena datos e imágenes de especímenes, así como secuencias y archivos de rastreo (Ratnasingham y Hebert, 2007). Proporciona un motor de identificación basado en la biblioteca de CB-ADN actual y supervisa el

número de registros de secuencias y la cobertura de especies (<https://www.boldsystems.org>).

La implementación del CB-ADN en la identificación de culícidos

En los últimos 10 años, la técnica del CB-ADN con el gen COI como marcador molecular, ha sido implementada como una herramienta complementaria en los estudios de identificación de mosquitos en diversas regiones del mundo debido a que permite una identificación corroborativa de las especies y la detección de diversidad críptica (Young *et al.*, 2020; Maekawa *et al.*, 2021). A la fecha, con los CB-ADN se ha logrado la identificación molecular de 1590 especies de culícidos (<http://www.boldsystems.org>), lo que corresponde a un 44.38 % de su riqueza específica conocida.

El primer estudio sobre mosquitos en el que se empleó CB-ADN COI fue realizado en Canadá (Cywinska *et al.*, 2006). Cywinska *et al.*, (2006), utilizaron un modelo evolutivo relativamente sencillo, análisis Neighbour-Joining (NJ) con Kimura 2-parametros (K2P) (Kimura, 1980). Ellos identificaron mosquitos de Canadá y generaron los primeros CB-ADN de 37 especies de mosquitos de las provincias de Ontario y Nueva Brunswick. Encontraron que todas las especies poseían un conjunto distinto de secuencias y la mayoría mostró bajas diferencias intraespecíficas, con una distancia genética intraespecífica promedio de 0.5 %, mientras que las distancias genéticas entre congéneres fue en promedio 10.4 %, las distancias genéticas entre especies de diferentes géneros, fueron aún mayores, 16.0 % en promedio.

Los resultados de Cywinska *et al.*, (2006), fueron razonablemente convincentes en el caso de las especies que estaban relacionadas de forma distante dentro de un género y se encontró congruencia en el CB-ADN entre algunas especies estrechamente relacionadas que seguían siendo morfológicamente distintas (Beebe, 2018). Los datos interesantes de ese primer estudio sugieren que el 98 % de las especies de mosquitos presentaban una divergencia inferior al 2 %.

A un año después del trabajo de Cywinska *et al.*, (2006), Kumar *et al.*, (2007) obtuvieron los CB-ADN de varias especies de mosquitos en la India, incluyendo

especies de vectores principales. Un total de 63 especies fueron identificadas morfológicamente; sin embargo, los CB-ADN solo pudieron separar 62. Dos especies estrechamente relacionadas, *Ae. portonovoensis* (Tewari y Hiriyan) y *Ae. wardi* (Reinert) no pudieron ser separadas molecularmente debido a que sus linajes indican una divergencia genética insignificante con el método K2P para la distancia genética (0.43 %).

Subsecuentemente, el uso de esta metodología para la identificación de las especies de mosquitos se difundió por todo el mundo, en diferentes regiones geográficas incluyendo Argentina (Laurito *et al.*, 2013), Australia (Batovska *et al.*, 2016), Austria (Fuehrer *et al.*, 2020), Bélgica (Versteirt *et al.*, 2015), Brasil (Costa dos Santos *et al.*, 2019), Canadá (Cywinska *et al.*, 2006), China (Wang *et al.*, 2012), Colombia (Hoyos-Lopez *et al.*, 2015; Rozo-Lopez y Mengual, 2015), Ecuador (Linton *et al.*, 2013), España (Ruiz-Arrondo *et al.*, 2019, 2020), Estados Unidos (Reeves *et al.*, 2021), Guayana Francesa (Talaga *et al.*, 2017), India (Kumar *et al.*, 2007), Irán (Azari-Hamidian *et al.*, 2009), Italia (Talbalaghi y Shaikevich, 2011), Malasia (Afizah *et al.*, 2019), Nueva Zelanda (Cane *et al.*, 2020), Pakistán (Ashfaq *et al.*, 2014), Puerto Rico (Hopken *et al.*, 2021), Reino Unido (Hernández-Triana *et al.*, 2019), República Democrática del Congo (Tezzo *et al.*, 2021), Singapur (Chan *et al.*, 2014), Sri Lanka (Weeraratne *et al.*, 2018), Suecia (Engdahl *et al.*, 2014), Sureste de África (Maekawa *et al.*, 2021) y Turquía (Gunay *et al.*, 2015). En el caso de especies estrechamente relacionadas donde COI no presenta suficiente señal o no encuentra un gap que separa a las especies, se ha sugerido incluir en el análisis otros marcadores moleculares como el Citocromo b, el ITS1, y Nad4 (Ajamma *et al.*, 2016; Beebe, 2018; Ibáñez-Justicia *et al.*, 2020).

En México, el CB-ADN para la identificación de mosquitos fue utilizado por primera vez para confirmar la presencia de *Ps. albipes* y *An. veruslanei* en el estado de Quintana Roo (Chan-Chable *et al.*, 2016, 2018b) y para apoyar la evidencia de diversidad críptica dentro de *Ae. taeniorhynchus* (Chan-Chable *et al.*, 2018a). Recientemente, además de los trabajos presentados en este

documento, se ha utilizado para caracterizar la diversidad de especies de mosquitos presentes en el estado de México (Adeniran *et al.*, 2021) y, para reportar/confirmar la presencia de cinco especies, *Ma. dyari*, *Ae. guatemala*, *Ae. insolitus*, *Li. asulleptus* y *Tr. pallidiventer* en el territorio mexicano (Hernández-Guevara *et al.*, 2020; Hernández-Triana *et al.*, 2021).

Registros históricos de mosquitos en el estado de Quintana Roo

En Quintana Roo, desde 1950 hasta 2020 se han realizado 14 trabajos relacionados con registros y distribución de especies de mosquitos, en los que se reportan 15 géneros, 21 subgéneros y 82 especies (Vargas y Martínez-Palacios, 1950; Vargas, 1956; Vargas, 1958; Pletsch, 1977; Vargas, 1979; Pletsch, 1986; Ibáñez-Bernal *et al.*, 1990; Ortega-Morales *et al.*, 2010; Salomón-Grajales *et al.*, 2012; Mis Ávila *et al.*, 2013; Ordóñez-Sánchez *et al.*, 2013; Chan-Chable *et al.*, 2016; Ortega-Morales *et al.*, 2018; Chan-Chable *et al.*, 2019). La lista más reciente publicada que incluye 76 especies fue elaborado por Ortega-Morales *et al.*, (2010). Ellos colectaron 41 especies de dos subfamilias (Anophelinae y Culicinae) y 13 géneros entre los cuales dos géneros (*Shannoniana* y *Toxorhynchites*), tres subgéneros (*Anoedioporpa*, *Grabhamia* y *Sabethes*) y 12 especies fueron nuevos registros para Quintana Roo.

Posterior al trabajo de Ortega-Morales *et al.*, (2010), Salomón-Grajales *et al.*, (2012) registraron *Ae. albopictus* para Quintana Roo, cuya colecta fue en la ciudad de Cancún; después, Ordóñez-Sánchez *et al.*, (2013) registraron *Cx. mutator* Dyar y Knab, colectado en la localidad Tomás Garrido; Chan-Chable *et al.*, (2016) registraron *Ps. albipes*, colectado en la ciudad de Chetumal; Ortega-Morales *et al.*, (2018) registraron *Ps. cilipes* (Fabricius) y *Cx. theobaldi* (Lutz). Recientemente, Chan-Chable *et al.*, (2019) registraron *Trichoprosopon digitatum* (Rondani) en el Estado.

Específicamente en la ciudad de Chetumal, se han reportado 22 especies dentro de 6 géneros (Vargas y Martínez-Palacios, 1956; Mis Ávila *et al.*, 2013; Chan-Chable *et al.*, 2016, 2018a, 2019). En la localidad de Sacxan han sido reportadas seis especies (*An. crucians* s.l., *An. vestitipennis*, *An. albimanus*, *Cx. nigripalpus*,

Ma. dyari y *Ps. ferox* (Ortega-morales et al. 2010). Y de las localidades Palmar y Ramonal sólo se conoce *An. veruslanei* (Chan-Chable et al., 2018b).

LITERATURA CITADA

- Adeniran, A. A., Hernández-Triana, L. M., Ortega-Morales, A. I., Garza-Hernández, J. A., de la Cruz-Ramos, J., Chan-Chable, R. J., & Rodríguez-Pérez, M. A. (2021). Identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) from Mexico State, Mexico using morphology and COI DNA barcoding. *Acta Tropica*, 213, 105730. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105730>
- Afizah, A. N., Torno, M. M., Jannah, J. N., Azahari, A. H., Asuad, M. K., Nazni, W. A., & Lee, H. L. (2019). DNA barcoding complementing morphological taxonomic identification of mosquitoes in Peninsular Malaysia. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 50(1), 36–46.
- Ajamma, Y. U., Villinger, J., Omondi, D., Salifu, D., Onchuru, T. O., Njoroge, L., & Masiga, D. K. (2016). Composition and genetic diversity of mosquitoes (Diptera: Culicidae) on islands and mainland shores of Kenya's Lakes Victoria and Baringo. *Journal of medical entomology*, 53(6), 1348–1363. <https://doi.org/10.1093/jme/tjw102>
- Arredondo-García, J. L., Aguilar-López, C. G., Lugo-Gerez, J. J. A., Osnaya-Romero, N., Pérez-Guillé, G., & Medina-Cortina, H. (2020). Panorama epidemiológico de dengue en México 2000-2019. *Revista Latinoamericana de Infectología Pediátrica*, 33(2), 78–83.
- Arredondo-García, J. L., Méndez-Herrera, A., & Medina-Cortina, H. (2016). Arbovirus in Latin America. *Acta pediátrica de México*, 37(2), 111–131.
- Ashfaq, M., Hebert, P. D., Mirza, J. H., Khan, A. M., Zafar, Y., & Mirza, M. S. (2014). Analyzing mosquito (Diptera: Culicidae) diversity in Pakistan by DNA barcoding. *PLoS One*, 9(5), e97268. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097268>
- Azari-Hamidian, S., Yaghoobi-Ershadi, M. R., Javadian, E., Abai, M. R., Mobedi, I., Linton, Y. M., & Harbach, R. E. (2009). Distribution and ecology of mosquitoes in a focus of dirofilariasis in northwestern Iran, with the first finding of filarial larvae in naturally infected local mosquitoes. *Medical and*

veterinary entomology, 23(2), 111–121. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2009.00802.x>

- Batovska, J., Blacket, M. J., Brown, K., & Lynch, S. E. (2016). Molecular identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in southeastern Australia. *Ecology and Evolution*, 6(9), 3001–3011. <https://doi.org/10.1002/ece3.2095>
- Beebe, N. W. (2018). DNA barcoding mosquitoes: Advice for potential prospectors. *Parasitology*, 145(5), 622–633. <https://doi.org/10.1017/S0031182018000343>
- Bueno-Marí, R., Corella-López, E., & Jiménez-Peydró, R. (2010). Culícido-fauna (Diptera: Culicidae) presente en los distintos enclaves hídricos de la ciudad de Valencia (España). *Revista Colombiana de Entomología*, 36, 235–241.
- Burkett-Cadena, N. (2013). *Mosquitoes of the Southeastern United States*. The University of Alabama Press, Tuscaloosa.
- Cane, R. P., Li, D., Turbitt, E., & Chambers, G. K. (2020). Molecular phylogenetic analysis of New Zealand mosquito species. *New Zealand Journal of Zoology*, 47(4), 324–349. <https://doi.org/10.1080/03014223.2020.1770305>
- Chan, A., Chiang, L. P., Hapuarachchi, H. C., Tan, C. H., Pang, S. C., Lee, R., & Lam-Phua, S. G. (2014). DNA barcoding: complementing morphological identification of mosquito species in Singapore. *Parasites & vectors*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0569-4>
- Chan-Chable, R. J., Bahena-Basave, H., Vázquez-Marroquín, R. (2019). Nuevo registro de distribución para *Trichoprosopon digitatum* (Rondani) (Diptera: Culicidae) en Quintana Roo, México. *Revista Chilena de Entomología*, 45(4), 669–672. <https://doi.org/10.35249/rche.45.4.19.20>
- Chan-Chable, R. J., Martínez-Arce, A., & Mis-Ávila, P. C. (2018a). Especies crípticas en *Ochlerotatus taeniorhynchus* mediante revelación de código de barras. *Salud Quintana Roo*, 11(38), 7–11.

- Chan-Chable, R. J., Martínez-Arce, A., Mis-Avila, P. C., & Ortega-Morales, A. I. (2018b). Confirmation of occurrence of *Anopheles (Anopheles) veruslanei* Vargas in Quintana Roo, Mexico using morphology and DNA barcodes. *Acta Tropica*, 188(2018), 138–141. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.08.036>
- Chan-Chable, R. J., Ortega-Morales, A. I., & Martínez-Arce, A. (2016). First Record of *Psorophora albipes* in Quintana Roo, Mexico. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 32(3), 237–239. <http://dx.doi.org/10.2987/16-6580.1>
- Ciprandi Pires, A., & Marinoni, L. (2010). DNA barcoding and traditional taxonomy unified through Integrative Taxonomy: a view that challenges the debate questioning both methodologies. *Biota Neotropica*, 10(2), 339–346. <https://doi.org/10.1590/S1676-06032010000200035>
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). (2021). Biodiversidad. <https://www.biodiversidad.gob.mx/biodiversidad/>. Accessed 18/05/ 2021.
- Costa dos Santosa, C. A. C., da Silvab, L. R., Meirelesb, A. C. A., Simplíciob, M. F., Gilc, L. H. S., da Silva Araújo, M., & Juliãob, R. (2019). Identification of some Amazonian species of *Culex (Culex)* and *Culex (Melanoconion)* by morphotyping and barcoding. *Acta Brasiliensis*, 3(2), 82-88. <http://dx.doi.org/10.22571/10.22571/2526-4338177>
- Cywinska, A., Hunter, F. F., & Hebert, P. D. N. (2006). Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. *Medical and Veterinary Entomology*, 20(4), 413–424. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2006.00653.x>
- Dayrat, B. (2005). Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*, 85(3), 407–415. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2005.00503.x>
- Delgado-Serra, S., Viader, M., Ruiz-Arrondo, I., Miranda, M. Á., Barceló, C.,

- Bueno-Marí, R., Hernández-Triana, L. M., Miquel, M., Lester, K., Jurado-Rivera, J. A., & Paredes-Esquivel, C. (2020). Molecular characterization of mosquito diversity in the Balearic Islands. *Journal of Medical Entomology*, *58*(2), 608–615. <https://doi.org/10.1093/jme/tjaa217>
- Duguma, D., Rueda, L. M., & Debboun, M. (2020). Mosquito-Borne Diseases. In *Mosquitoes, Communities, and Public Health in Texas* (pp. 319–337). Academic Press.
- Eberhardt, U. (2010). A constructive step towards selecting a DNA barcode for fungi. *New Phytologist*, *187*(2), 265–268. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03329.x>
- Engdahl, C., Larsson, P., Näslund, J., Bravo, M., Evander, M., Lundström, J. O., & Bucht, G. (2014). Identification of Swedish mosquitoes based on molecular barcoding of the COI gene and SNP analysis. *Molecular Ecology Resources*, *14*(3), 478–488. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12202>
- Foster, W. A., & Walker, E. D. (2019). Mosquitoes (Culicidae). In *Medical and Veterinary Entomology*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814043-7.00015-7>
- Fuehrer, H. P., Schoener, E., Weiler, S., Barogh, B. S., Zित्रा, C., & Walder, G. (2020). Monitoring of alien mosquitoes in Western Austria (Tyrol, Austria, 2018). *PLoS neglected tropical diseases*, *14*(6), e0008433. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008433>
- Gonzalez, M. A., Baraloto, C., Engel, J., Mori, S. A., Pétronelli, P., Riéra, B., & Chave, J. (2009). Identification of Amazonian trees with DNA barcodes. *PLoS one*, *4*(10), e7483. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007483>
- Gunay, F., Alten, B., Simsek, F., Aldemir, A., & Linton, Y. M. (2015). Barcoding Turkish *Culex* mosquitoes to facilitate arbovirus vector incrimination studies reveals hidden diversity and new potential vectors. *Acta Tropica*, *143*, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.10.013>

- Harbach, R. E. (2021). *Mosquito Taxonomic Inventory*. Culicidae Meigen, 1818. <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/simpletaxonomy/term/6045>. Accessed 18/05/ 2021.
- Harbach, R. E., & Knight, K. L. (1980). *Taxonomists' glossary of mosquito anatomy* (p. 415). Plexus Publishing.
- Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L., & Dewaard, J. R. (2003a). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1512), 313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Hebert, P. D., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H., & Hallwachs, W. (2004). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(41), 14812–14817. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406166101>
- Hebert, P. D., Ratnasingham, S., & De Waard, J. R. (2003b). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(suppl_1), S96–S99. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0025>
- Hernández-Guevara, L. F., Sánchez-Rámos, F. J., Chan-Chable, R. J., Hernández-Triana, L. M., Valdés-Perezgasga, M. T., González-Acosta, C., & Correa-Morales, F. (2020). First Record of *Mansonia dyari* in the State of Morelos, Mexico, Based on Morphology and COI DNA Barcoding. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 36(1), 33–36. <https://doi.org/10.2987/19-6909.1>
- Hernández-Triana, L. M., Brugman, V. A., Nikolova, N. I., Ruiz-Arrondo, I., Barrero, E., Thorne, L., & Fooks, A. R. (2019). DNA barcoding of British mosquitoes (Diptera, Culicidae) to support species identification, discovery of cryptic genetic diversity and monitoring invasive species. *ZooKeys*, 832, 57–76. <https://doi.org/10.3897/zookeys.832.32257>

- Hernández-Triana, L. M., Garza-Hernández, J. A., Morales, A. I. O., Prosser, S. W., Hebert, P. D., Nikolova, N. I., & Rodríguez-Pérez, M. A. (2021). An Integrated Molecular Approach to Untangling Host–Vector–Pathogen Interactions in Mosquitoes (Diptera: Culicidae) From Sylvan Communities in Mexico. *Frontiers in veterinary science*, 7, 564791. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.564791>
- Hollingsworth, P. M. (2011). Refining the DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(49), 19451–19452. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116812108>
- Hopken, M. W., Reyes-Torres, L. J., Scavo, N., Piaggio, A. J., Abdo, Z., Taylor, D., & Yee, D. A. (2021). Temporal and Spatial Blood Feeding Patterns of Urban Mosquitoes in the San Juan Metropolitan Area, Puerto Rico. *Insects*, 12(2), 129. <https://doi.org/10.3390/insects12020129>
- Hoyos-López, R., Pardo, S. R., Castaño, J. C., & Gallego-Gómez, J. C. (2015). Código de barras para la tipificación de culícidos inmaduros de Armenia y Circasia (Quindío, Colombia). *Revista Colombiana de Entomología*, 41(2), 218–227.
- Huang, D., Meier, R., Todd, P. A., & Chou, L. M. (2008). Slow mitochondrial COI sequence evolution at the base of the metazoan tree and its implications for DNA barcoding. *Journal of Molecular Evolution*, 66(2), 167–174.
- Ibáñez-Bernal, S., Canul, O., & Camal, J. F. (1990). Los Dípteros de la reserva de la biosfera de Sian Ka'an, Quintana Roo, México. *D. Navarro y Robinson, JG (Eds.). Diversidad Biológica de Sian kaan, Quintana Roo., México. Centro de Investigaciones de Quintana Roo y Program for Studies in Tropical Conservation. University of Florida, Gainesville, USA*, 305–316.
- Ibáñez-Justicia, A., Smitz, N., den Hartog, W., van de Vossenbergh, B., De Wolf, K., Deblauwe, I., & Stroob, A. (2020). Detection of exotic mosquito species (Diptera: Culicidae) at international airports in Europe. *International journal of environmental research and public health*, 17(10), 3450.

<https://doi.org/10.3390/ijerph17103450>

- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16, 111–120.
- Kumar, N. P., Rajavel, A. R., Natarajan, R., & Jambulingam, P. (2007). DNA barcodes can distinguish species of Indian mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology*, 44(1), 01-07.
<https://doi.org/10.1093/jmedent/41.5.01>
- Kumazawa, Y., & Nishida, M. (1999). Complete mitochondrial DNA sequences of the green turtle and blue-tailed mole skink: statistical evidence for archosaurian affinity of turtles. *Molecular Biology and Evolution*, 16(6), 784–792. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026163>
- Lanteri, A. A. (2007). Código de barras del ADN y sus posibles aplicaciones en el campo de la Entomología. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 66(4), 15–25.
- Laurito, M., de Oliveira, T. M., Almiron, W. R., & Sallum, M. A. M. (2013). COI barcode versus morphological identification of *Culex* (*Culex*) (Diptera: Culicidae) species: a case study using samples from Argentina and Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108, 110–122.
<https://doi.org/10.1590/0074-0276130457>
- Linton, Y. M., Pecor, J. E., Porter, C. H., Mitchell, L. B., Garzón-Moreno, A., Foley, D. H., & Wilkerson, R. C. (2013). Mosquitoes of eastern Amazonian Ecuador: biodiversity, bionomics and barcodes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108, 100–109. <https://doi:10.1590/0074-0276130440>
- Luo, A., Zhang, A., Ho, S. Y., Xu, W., Zhang, Y., Shi, W., & Zhu, C. (2011). Potential efficacy of mitochondrial genes for animal DNA barcoding: a case study using eutherian mammals. *BMC genomics*, 12(1), 1–13.
- Maekawa, Y., Pemba, D., Kumala, J., Gowelo, S., Higa, Y., Futami, K., & Tsuda,

- Y. (2021). DNA barcoding of mosquitoes collected through a nationwide survey in 2011 and 2012 in Malawi, Southeast Africa. *Acta Tropica*, 213, 105742. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105742>
- Marshall, E. (2005). Will DNA bar codes breathe life into classification? Biologists hope that a simple tag on all forms of life, and even a hand-held reader, will make classification a 21st century science. *Science*, 307(5712), 1037–1038.
- Martínez López, O. G. (2015). La taxonomía integral y su importancia para la conservación. *Ciencia & Conservación*, 6, 54–64.
- Meyer, W., Irinyi, L., Hoang, M. T. V., Robert, V., Garcia-Hermoso, D., Desnos-Ollivier, M., & Isham Barcoding of Pathogenic Fungi Working Group. (2019). Database establishment for the secondary fungal DNA barcode translational elongation factor 1 α (TEF1 α). *Genome*, 62(3), 160–169. <https://doi.org/10.1139/gen-2018-0083>
- Mis Ávila, P. C., Canul Amaro, G. J., & Domínguez Galera, M. A. (2013). Determinación taxonómica de mosquitos (Culicinae: Culicidae) de la zona urbana de Chetumal, Quintana Roo. *Salud Quintana Roo*, 6(23), 8–13.
- Mora-Covarrubias, A. D. L., Jiménez-Vega, F., & Treviño-Aguilar, S. M. (2010). Distribución geoespacial y detección del virus del dengue en mosquitos *Aedes (Stegomyia) aegypti* de Ciudad Juárez, Chihuahua, México. *Salud Pública de México*, 52(2), 127–133.
- Moritz, C., & Cicero, C. (2004). DNA barcoding: promise and pitfalls. *PLoS Biol*, 2(10), e354. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020354>
- Moura, C. J., Harris, D. J., Cunha, M. R., & Rogers, A. D. (2008). DNA barcoding reveals cryptic diversity in marine hydroids (Cnidaria, Hydrozoa) from coastal and deep-sea environments. *Zoologica Scripta*, 37(1), 93–108. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6409.2007.00312.x>
- Ordóñez-Sánchez, F., Sánchez-Trinidad, A., Mis-Ávila, P., Canul-Amaro, G.,

- Fernández-Salas, I., & Ortega-Morales, A. I. (2013). Nuevos registros de mosquitos (Diptera: Culicidae) en algunas localidades de Campeche y Quintana Roo. *Entomología Mexicana*, 12(1), 850–854.
- Ortega-Morales, A. I., Casas-Martínez, M., Bond, J. G., & Harbach, R. E. (2018). First records of *Psorophora cilipes* and *Culex theobaldi* in Quintana Roo state, Mexico. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 34(2), 124–127. <https://doi.org/10.2987/18-6743.1>
- Ortega-Morales, A. I., Mis Avila, P., Elizondo-Quiroga, A., Harbach, R. E., Siller-Rodríguez, Q. K., & Fernández-Salas, I. (2010). Los mosquitos del estado de Quintana Roo, México (Diptera: Culicidae). *Acta zoológica mexicana*, 26(1), 33–46.
- Paz, A., Gonzalez, M., & Crawford, A. J. (2011). Códigos de barras de la vida: introducción y perspectiva. *Acta biológica colombiana*, 16(3), 161–175.
- Pfenninger, M., & Schwenk, K. (2007). Cryptic animal species are homogeneously distributed among taxa and biogeographical regions. *BMC evolutionary biology*, 7(1), 1–6.
- Pletsch, D. J. (1977). Mosquito Investigation and Control in Tourist Development Areas in Mexico. III. Species densities and associations of mosquitoes found in Cancun, Quintana Roo from december, 1972 through december, 1975. *Mosquito News*, 37(2), 222–226.
- Pletsch, D. J. (1986). A comparison of faunal lists of mosquito species in Florida, in Cuba and in the state of Quintana Roo, Yucatan peninsula, Mexico. *Journal of the Florida Anti-Mosquito Association*, 57(1), 29–32.
- Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. N. (2007). BOLD: The barcode of life data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Notes*, 7(3), 355–364. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x>
- Reeves, L. E., Holderman, C. J., Blosser, E. M., Gillett-Kaufman, J. L., Kawahara, A. Y., Kaufman, P. E., & Burkett-Cadena, N. D. (2018).

- Identification of *Uranotaenia sapphirina* as a specialist of annelids broadens known mosquito host use patterns. *Communications biology*, 1(1), 1–8.
<https://doi.org/10.1038/s42003-018-0096-5>
- Reeves, L. E., Medina, J., Miqueli, E., Sloyer, K. E., Petrie, W., Vasquez, C., & Burkett-Cadena, N. D. (2021). Establishment of *Aedes* (*Ochlerotatus*) *scapularis* (Diptera: Culicidae) in mainland Florida, with notes on the *Ochlerotatus* group in the United States. *Journal of Medical Entomology*, 58(2), 717–729. <https://doi.org/10.1093/jme/tjaa250>
- Romaña, C., Empeaire, L., & Jansen, A. M. (2003). Enfoques conceptuales y propuestas metodológicas para el estudio de las interacciones entre el medio ambiente y la salud: aplicación a un programa de investigación sobre la tripanosomiasis americana. *Cadernos de Saúde Pública*, 19, 945–953.
- Rossi, G. C., & Almirón, W. R. (2004). Clave ilustrada para la identificación de larvas de mosquitos de interés sanitario encontradas en criaderos artificiales en la Argentina. *Publicaciones Mundo Sano, Serie Enfermedades Transmisibles*, 5, 53.
- Rozo-Lopez, P., & Mengual, X. (2015). Mosquito species (Diptera, Culicidae) in three ecosystems from the Colombian Andes: Identification through DNA barcoding and adult morphology. *ZooKeys*, 513: 39–64.
<https://doi.org/10.3897/zookeys.513.9561>
- Rueda, J., & Alarcón-Elbal, P. M. (2020). Mosquitos (Diptera: Culicidae) de lagunas temporales de Costa Rica y Nicaragua. *Limnetica*, 39(2), 579–600.
<https://doi.org/10.23818/limn.39.38>
- Rueda, L. M., & Debboun, M. (2020). Taxonomy, identification, and biology of mosquitoes. In *Mosquitoes, communities, and public health in Texas* (pp. 3–7). Academic Press.
- Ruiz-Arrondo, I., Hernández-Triana, L. M., Nikolova, N. I., Fooks, A. R., & Oteo, J. A. (2020). Integrated approaches in support of taxonomic identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in vector surveillance in Spain. *Vector-*

Borne and Zoonotic Diseases, 20(11), 831–842.

<https://doi.org/10.1089/vbz.2020.2662>

Ruiz-Arrondo, I., McMahon, B. J., Hernández-Triana, L. M., Santibañez, P., Portillo, A., & Oteo, J. A. (2019). Surveillance of mosquitoes (Diptera, Culicidae) in a Northern Central region of Spain: Implications for the medical community. *Frontiers in veterinary science*, 6, 86.

<https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00086>

Salomón-Grajales, J., Lugo-Moguel, G. V., Tinal-Gordillo, V. R., de La Cruz-Velázquez, J., Beaty, B. J., Eisen, L., & García-Rejón, J. E. (2012). *Aedes albopictus* mosquitoes, Yucatan peninsula, Mexico. *Emerging infectious diseases*, 18(3), 525–527.

Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., & Fungal Barcoding Consortium. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6241–6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>

Secretaría de Salud de México (SSA). (2001). Programa de Acción: Enfermedades Transmitidas por Vector. <https://www.gob.mx/salud>. Accessed 18/05/2021.

Sinti-Hesse, C., Díaz-Soria, F., Casanova-Rojas, W., Carey-Ángeles, C., Tello-Espinoza, R., Espinoza, J., & Zevallos, K. (2019). Embarcaciones fluviales como medio de dispersión de *Aedes aegypti* hacia zonas fronterizas de la Amazonia peruana. *Revista peruana de medicina experimental y salud pública*, 36, 392–399.

Talaga, S., Leroy, C., Guidez, A., Dusfour, I., Girod, R., Dejean, A., & Murienne, J. (2017). DNA reference libraries of French Guianese mosquitoes for barcoding and metabarcoding. *PLoS One*, 12(6), e0176993.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176993>

Talbalaghi, A., & Shaikevich, E. (2011). Molecular approach for identification of

mosquito species (Diptera: Culicidae) in Province of Alessandria, Piedmont, Italy. *European Journal of Entomology*, 108(1), 35–40.

Tezzo, F. W. S., Fasine, S., Zola, E. M., del Carmen Marquetti, M., Mbuka, G. B., Ilombe, G., & Vanlerberghe, V. (2021). High *Aedes* spp. larval indices in Kinshasa, Democratic Republic of Congo. *Parasites & vectors*, 14(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04588-7>

Vargas, L. (1956). Especies y distribución de mosquitos mexicanos no anofelinos (Insecta, Diptera). *Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales*, 16(1), 19–36.

Vargas, D. L. (1958). Nuevos datos sobre la distribución de anofelinos mexicanos. *Boletín de Epidemiología*, 22, 33–45.

Vargas, D. L. (1979). *Anopheles (Anopheles) veruslanei* Vargas, n. sp. (Diptera: Culicidae). *Gaceta Médica de México*, 115, 87–88.

Vargas, L., & Martínez-Palacios, A. (1950). *Estudio taxonómico de los mosquitos Anofelinos de México*. Secretaría de Salubridad y Asistencia, México DF.

Vargas, L., & Martínez-Palacios, A. (1956). *Anofelinos mexicanos. Taxonomía y distribución*. Secretaría de Salubridad y Asistencia, Comisión Nacional para la Erradicación del Paludismo, México DF.

Versteirt, V., Nagy, Z. T., Roelants, P., Denis, L., Breman, F. C., Damiens, D., & Van Bortel, W. (2015). Identification of Belgian mosquito species (Diptera: Culicidae) by DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources*, 15(2), 449–457. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12318>

Villarreal-Treviño, C., Ríos-Delgado, J. C., Penilla-Navarro, R. P., Rodríguez, A. D., López, J. H., Nettel-Cruz, J. A., & Fuentes-Maldonado, G. (2020). Composition and abundance of anopheline species according to habitat diversity in Mexico. *Salud pública de México*, 62(4), 388–401. <https://doi.org/10.21149/10111>

- Walter Reed Biosystematics Unit (WRBU)*. (2005). Systematic Catalog of Culicidae. <http://mosquitocatalog.org/default.aspx>. Accessed 18/05/ 2021.
- Wang, G., Li, C., Guo, X., Xing, D., Dong, Y., Wang, Z., & Zhao, T. (2012). Identifying the main mosquito species in China based on DNA barcoding. *PLoS one*, 7(10), e47051. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047051>
- Weeraratne, T. C., Surendran, S. N., & Karunaratne, S. P. (2018). DNA barcoding of morphologically characterized mosquitoes belonging to the subfamily Culicinae from Sri Lanka. *Parasites & vectors*, 11(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2810-z>
- Will, K. W., Mishler, B. D., & Wheeler, Q. D. (2005). The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. *Systematic Biology*, 54(5), 844–851.
- Yáñez, P. (2014). *Ecología y biodiversidad: un enfoque desde el neotrópico* (p. 172). Universidad Iberoamericana del Ecuador.
- Yao, H., Song, J., Liu, C., Luo, K., Han, J., Li, Y., & Chen, S. (2010). Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals. *PLoS one*, 5(10), e13102. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013102>
- Young, K. I., Medwid, J. T., Azar, S. R., Huff, R. M., Drumm, H., Coffey, L. L., & Hanley, K. A. (2020). Identification of mosquito bloodmeals collected in diverse habitats in Malaysian Borneo using COI barcoding. *Tropical medicine and infectious disease*, 5(2), 51. <https://doi:10.3390/tropicalmed5020051>
- Zheng, X. L. (2020). Unveiling mosquito cryptic species and their reproductive isolation. *Insect Molecular Biology*, 29(6), 499–510. <https://doi.org/10.1111/imb.12666>

DNA barcodes and evidence of cryptic diversity of anthropophagous mosquitoes in Quintana Roo, Mexico

Rahuel J. Chan-Chable¹ | Arely Martínez-Arce¹  | Pedro C. Mis-Avila² | Aldo I. Ortega-Morales³

¹Departamento de Sistemática y Ecología Acuática, Unidad Chetumal, El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal, Quintana Roo, México

²Departamento de Enfermedades Transmitidas por Vector y Zoonosis, Servicios Estatales de Salud de Quintana Roo, Chetumal, Quintana Roo, México

³Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Torreón, Coahuila, México

Correspondence

Arely Martínez-Arce, Departamento de Sistemática y Ecología Acuática, Unidad Chetumal, El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal, Quintana Roo, México.
Email: armartarce@ecosur.mx

Funding information

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Grant/Award Number: 271108

Abstract

Culicidae mosquitoes are potential vectors of pathogens that affect human health. The correct species identification, as well as the discovery and description of cryptic species, is important in public health for the control and management of specific vectors. In the present study, the diversity of anthropophagous mosquitoes in Quintana Roo, at the border between Mexico and Belize, was evaluated using morphological and molecular data (COI-DNA Barcoding). A total of 1,413 adult female specimens were collected, belonging to eight genera and 31 morphospecies. Most species formed well-supported clades. Intraspecific Kimura 2 parameters (K2P) distance average was 0.75%, and a maximum distance of 4.40% was observed for *Anopheles crucians* s.l. ABGD method identified 28 entities, while 32 entities were identified with the BIN system. In *Culex interrogator* and *Culex nigripalpus* a low interspecific genetic distance of 0.1% was observed. One undescribed species belonging to the genus *Aedes* (*Aedes* n. sp.) was discovered, but no clear genetic divergence was found between this species and the closely related species *Aedes angustivittatus*. An intraspecific K2P distance greater than 2.7% was observed in *Aedes serratus* (3.9%), *Anopheles crucians* s.l. (4.4%), *Culex taeniopus* (3.7%), *Haemagogus equinus* (3.9%), *Culex erraticus* (5.0%), *Psorophora ferox* (4.5%), and in *Anopheles apicimacula* (8.10%); therefore, evidences of cryptic diversity are shown in these species. This study showed that DNA barcodes offer a reliable framework for mosquito species identification in Quintana Roo, except for some closely related species for which it is recommended to use additional nuclear genetic markers such as ITS2, in order to resolve these small discrepancies.

KEYWORDS

anthropophagous, cryptic diversity, DNA barcodes, Mexico, mosquitoes

1 | INTRODUCTION

Recent studies indicate that it is necessary to keep identifying mosquito species in different regions of the world through the use of

traditional taxonomy and DNA sequences, to achieve a better estimation of mosquito biodiversity (Ashfaq et al., 2014; Azari-Hamidian et al., 2010; Batovska, Blacket, Brown, & Lynch, 2016; Cywinska, Hunter, & Hebert, 2006; Rozo-López & Mengual, 2015; Versteirt et

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2019 The Authors. *Ecology and Evolution* published by John Wiley & Sons Ltd.

al., 2015; Wang et al., 2012; Weeraratne, Surendran, & Parakrama Karunaratne, 2018). The combined use of DNA and morphology allowed to analyze a greater number of species worldwide and to discover cryptic speciation in taxa of medical importance such as culicids (Ashfaq et al., 2014; Hebert & Gregory, 2005; Laurito, Oliveira, Almirón, & Sallum, 2013; Torres-Gutiérrez et al., 2016; Wang et al., 2012). Though, given the diversity of mosquitoes, it is possible to affirm that integrative taxonomy in this group is at its early stages (Beebe, 2018).

For several years, the Cytochrome Oxidase I subunit (COI) gene as a molecular marker for mosquitoes, has evidenced the presence of species complexes and cryptic species within the genera *Aedes*, *Anopheles* and *Culex* (Ashfaq et al., 2014; Wang et al., 2012). These discoveries have been interesting from an ecological point of view, as molecular analyses demonstrated a wide distribution of several genera, and predicted that speciation processes may be occurring at an unobservable rate due to the constant exposure to physical and biological environmental factors. Therefore, molecular information in addition to predicting the presence of a great number of undescribed species also allows analyzing the variation at the genetic level (Weeraratne et al., 2018).

The discovery of cryptic species in Culicidae also entails serious public health implications as it directly impacts the design of vector control and management programs (Bickford et al., 2007). The correct identification of the species is essential for the development of programs for the control and prevention of diseases transmitted by mosquitoes, as it allows focusing only on the control of those species that transmit certain diseases (Azari-Hamidian et al., 2010; Buenomari, Corella-López, & Jiménez-Peydró, 2010; Erlank, Koekemoer, & Coetzee, 2018; Laboudi et al., 2011).

Unlike other groups of insects, Culicidae mosquitoes are widely studied due to their role in human health (Cardoso et al., 2010; Rozo-López & Mengual, 2015). Nevertheless, their knowledge from a taxonomic point of view is still incomplete (Kumar, Rajavel, Natarajan, & Jambulingam, 2007). The difficulties in the correct identification of mosquito species derive from the impossibility to use some diagnostic characters, such as scales and setae, which get often damaged during field collection or storage of specimens, and the presence of other characters which are evident only during some stages of their growth (Kumar et al., 2007). Furthermore, isomorphic species can be often found in mosquitos, grouped in closely related species (sibling species) (Beebe, 2018). These issues cause delays in the correct identification of the species (Ruiz-López et al., 2012), besides the fact that a high taxonomic expertise is needed.

There are 3,554 species of mosquitoes recognized worldwide (Harbach, 2018), of these only 1,254 have been barcoded that is <40% (www.Boldsystems.org) (Ratnasingham & Hebert, 2007). In Mexico, around 250 species belonging to 20 genera are reported (Bond et al., 2014; Ibáñez-Bernal, Strickman, & Martínez-Campos, 1996; Ortega-Morales et al., 2015). For Quintana Roo there of 79 species in 15 genera are recorded (Chan-Chable, Ortega-Morales, & Martínez-Arce, 2016; Ordóñez-Sánchez et al., 2013; Ortega-Morales et al., 2015; Salomón-Grajales et al., 2012). Currently, most

of the nominal species in the region have been identified based on traditional taxonomy and only about 45 species have been barcoded (R. J. Chan-Chable & A. Martínez-Arce, Unpublished data).

Among the important genera reported for Quintana Roo is the genus *Aedes* sensu Wilkerson et al. (2015) potential vector of pathogens causing diseases such as yellow fever, dengue, zika, among other diseases that represent a threat to human and animal health (Ortega Morales et al., 2010; Salomón-Grajales et al., 2012). In the present study, a total of nine species of *Aedes* genus were identified, although the number of species belonging to this genus is present in the State is still unknown if exist more due to the lack of exhaustive studies involving morphology and DNA barcoding, for this and other species of medical importance.

The objectives of this study were to delimit anthropophilic mosquito species using DNA barcodes and traditional taxonomy in the southeastern region of Mexico, an area designated as malarial on the border between southern Quintana Roo and Belize; to find evidences of cryptic species in designated species with wide distribution and, finally, to contribute to GenBank and Bold systems databases with new DNA barcodes.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 | Mosquitoes collection

Adult females were collected in three selected locations of Quintana Roo, Mexico (Sacxan, Palmar, and Ramonal) on the border between Mexico and Belize (two sites per location: Sacxan (A): 18°27'52.76"N-88°30'58.44"W, (B): 18°27'44.61"N-88°31'08.44"W; Palmar (A): 18°26'43.0"N-88°31'27.4"W, (B): 18°26'26.9"W-88°31'37.99"W; Ramonal (A): 18°25'27.7"N-88°31'45.97"W, (B): 18°25'08.1"N-88°31'47.7"W (Figure 1). The collection sites were an altitude of 10–20 m and currently are cataloged as endemic areas of dengue and malaria transmission (SINAVE, 2018). Mosquito collections were conducted in each location from 6:00 to 9:00 and from 18:00 to 21:00 hr during September–December 2015 with the help of the Mexican public health official personnel, taking preventive measures for the collection of Anophelines from southern Mexico and Central America (Méndez-Galván, Betanzos-Reyes, Velázquez-Monroy, & Tapia-Conyer, 2004). Mosquitoes were collected using aspirator tubes while they approached to the collecting personnel. All specimens collected were sacrificed in glass jars with ethyl acetate vapors and transported to the Zoology Laboratory of ECOSUR-Chetumal Unit where they were separated by species, mounted on entomological pins and photographed.

2.2 | Depository and morphological identification

Vouchers were deposited in the Entomology Collection of the Zoology Museum of ECOSUR-Chetumal Unit where they were assigned a reference code (ECO-CH-AR/DP_0285-1697), and lateral view photographs of each voucher were taken. All specimens were identified using different available literature such as books and identification

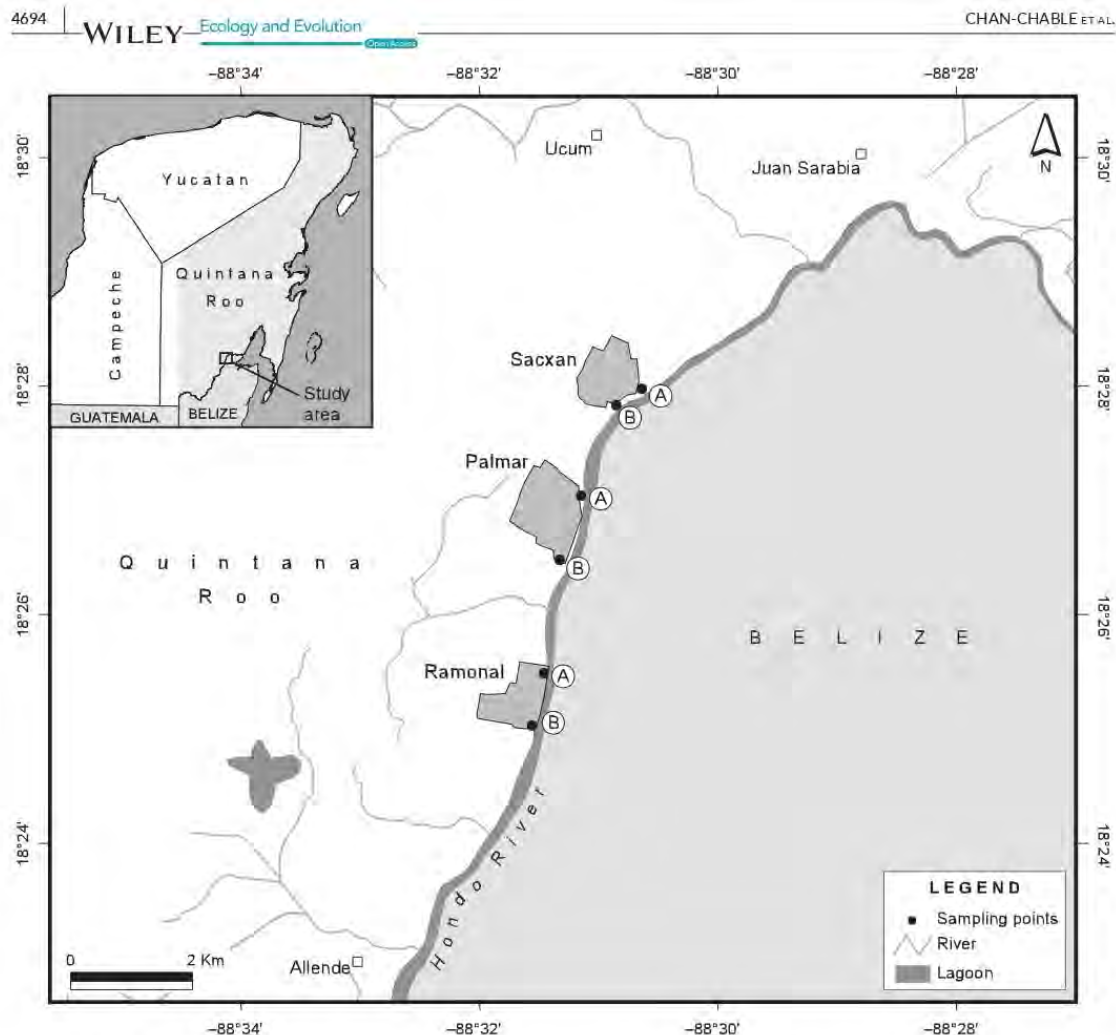


FIGURE 1 Study area. The three sampling locations are shown. A and B are the sampling sites by location

keys, which included Díaz Nájera (1965), Berlin (1969), Arnell (1976), Darsie and Ward (1981), Sirivanakarn (1982), Clark-Gil and Darsie (1983), and Wilkerson and Strickman (1990). The collected data were deposited in the BOLD Systems[®] database (www.boldsystems.org) (Ratnasingham & Hebert, 2007) under the project "Mosquitoes from Rio Hondo, Mexican Caribbean" (MRRO). The Culicidae classification system proposed by Wilkerson et al. (2015) and available in the Walter Reed Biosystematic Unit (www.wrbu.org) was used for this study.

2.3 | DNA isolation, PCR amplification, and sequencing

For the molecular analysis, a total of 272 specimens that represented 31 morphospecies, were selected. Five to thirty specimens per morphospecies were selected. All specimens were processed by removing one hind leg from each individual, which was deposited in

a sterile tube of 0.2 ml with 30 μ l of ethanol (Ashfaq et al., 2014). DNA extraction and PCR amplification were performed following the protocols of Ivanova, deWaard, and Hebert (2006). For the amplification of COI-5' gene, two sets of primers were used LCO1490/HCO2198 and LCO1490_t1/HCO2198_t1 (Folmer, Black, Hoeh, Lutz, & Vrijenhoek, 1994; Foottit, Maw, Havill, Ahern, & Montgomery, 2009). The following thermocycling conditions were used: initial denaturation of 1 min at 94°C, followed by five cycles of 94°C for 40 s, 45°C for 40 s, and 72°C for 1 min; subsequently 35 cycles of 94°C for 40 s, 51°C for 40 s, and 72°C for 1 min, with a final extension at 72°C for 5 min. The PCR mix was made in a final volume of 12.5 μ l, containing 2 μ l of tempered DNA. Successful amplicons were sent for bidirectional sequencing, and BigDye Terminator Cycle Sequencing (v3.1) was used for purification. Sequences were run on an ABI 3730XL DNA sequencer. Forward and reverse sequences were assembled and edited using Codon Code Aligner v 5.0.1.

TABLE 1 List of mosquito species, collection sites, and barcode index numbers. Shows average and maximum intraspecific K2P distances observed among COI sequences of mosquito species sequenced in this study. The BINs number by location is Sacxan = 21, Palmar = 24, and Ramonal = 25

Mosquito species	Collection site	BINs	Number of specimens processed	Average K2P distance (%)	Maximum observed K2P distance among conspecific specimens (%)
<i>Anopheles (Anopheles) apicimacula</i> Dyar & Knab, 1906	Site A, Sacxan	BOLD:ACG8818	5	0.10	0.90
	Site A, Palmar	BOLD:ACG8818			
<i>Anopheles (Anopheles) crucians</i> s.l. Wiedemann, 1828	Site A, Sacxan	BOLD:AAC8253	21	1.40	4.40
	Site A, Palmar	BOLD:AAC8253			
	Site A, Ramonal	BOLD:AAC8253			
	Site A, Ramonal	BOLD:ADG0892			
<i>Anopheles (Anopheles) pseudopunctipennis</i> (Theobald, 1901)	Site A, Palmar	BOLD:AAF5940	1	—	—
<i>Anopheles (Anopheles) veruslanei</i> Vargas, 1979	Site A, Palmar	BOLD:ADF9652	5	0.60	1.40
	Site A, Ramonal	BOLD:ADF9652			
<i>Anopheles (Anopheles) vestitipennis</i> Dyar & Knab, 1906	Site A, Palmar	BOLD:AAN4188	13	0.40	1.10
	Site A, Sacxan	BOLD:AAN4188			
	Site A, Ramonal	BOLD:AAN4188			
<i>Anopheles (Nyssorhynchus) albimanus</i> Wiedemann, 1820	Site A, Sacxan	BOLD:AAA3068	31	0.80	2.00
	Site B, Sacxan	BOLD:AAA3068			
	Site A, Palmar	BOLD:AAA3068			
	Site A, Ramonal	BOLD:AAA3068			
<i>Aedes (Howardina) cozumelensis</i> Díaz-Nájera, 1966	Site A, Ramonal	BOLD:ACO0212	6	0.70	2.10
<i>Aedes (Ochlerotatus) angustivittatus</i> Dyar and Knab, 1907	Site A, Sacxan	BOLD:ACN2972	11	1.00	2.30
	Site A, Palmar	BOLD:ACN2972			
	Site A, Ramonal	BOLD:ACN2972			
	Site B, Ramonal	BOLD:ACN2972			
<i>Aedes (Ochlerotatus) euplocamus</i> Dyar & Knab, 1906	Site A, Palmar	BOLD:ADE4523	11	1.10	2.50
	Site A, Sacxan	BOLD:ADE4523			
	Site A, Ramonal	BOLD:ADE4523			
<i>Aedes (Ochlerotatus) fulvus</i> (Wiedemann, 1828)	Site A, Sacxan	BOLD:ACN9154	2	1.00	1.00
	Site A, Palmar	BOLD:ACN9154			
<i>Aedes (Ochlerotatus) scapularis</i> (Rondani, 1848)	Site A, Sacxan	BOLD:AAH9007	1	—	—
<i>Aedes (Ochlerotatus) serratus</i> (Theobald, 1901)	Site A, Sacxan	BOLD:ACN3711	11	1.80	3.50
	Site A, Palmar	BOLD:ACN3711			
	Site A, Ramonal	BOLD:ACN3711			
<i>Aedes (Ochlerotatus) taeniorhynchus</i> (Wiedemann, 1821)	Site B, Sacxan	BOLD:AAE5975	6	0.80	2.00
	Site A, Palmar	BOLD:AAE5975			
	Site A, Ramonal	BOLD:AAE5975			
<i>Aedes (Ochlerotatus) Scapularis Group species</i>	Site B, Sacxan	BOLD:ACN2972	3	0.50	1.00
	Site A, Ramonal	BOLD:ACN2972			
<i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> (Linnaeus, 1762)	Site A, Sacxan	BOLD:AAA4210	7	0.90	1.90
	Site A, Ramonal	BOLD:AAA4210			
<i>Haemagogus (Haemagogus) equinus</i> Theobald, 1903	Site A, Ramonal	BOLD:ACN9156	7	1.80	3.90
	Site A, Ramonal	BOLD:ADG0616			
	Site A, Ramonal	BOLD:ACN9157			
	Site A, Sacxan	BOLD:ACN9156			

(Continues)

TABLE 1 (Continued)

Mosquito species	Collection site	BINs	Number of specimens processed	Average K2P distance (%)	Maximum observed K2P distance among conspecific specimens (%)
<i>Psorophora (Anthinosoma) albipes</i> (Theobald, 1907)	Site A, Sacxan	BOLD:ACN3418	3	0.70	0.90
	Site B, Sacxan	BOLD:ACN3418			
<i>Psorophora (Anthinosoma) cyanescens</i> (Coquillett, 1902)	Site A, Sacxan	BOLD:AAG3851	11	0.10	1.40
	Site A, Palmar	BOLD:AAG3851			
<i>Psorophora (Anthinosoma) champerico</i> (Dyar & Knab, 1906)	Site B, Sacxan	BOLD:ADE2950	1	—	—
<i>Psorophora (Anthinosoma) ferox</i> (von Humboldt, 1819)	Site A, Sacxan	BOLD:ABZ5766	8	1.50	2.30
	Site A, Palmar	BOLD:ABZ5766			
	Site A, Ramonal	BOLD:ABZ5766			
<i>Psorophora (Anthinosoma) lutzii</i> (Theobald, 1901)	Site A, Sacxan	BOLD:ADE0378	9	0.10	0.90
	Site A, Palmar	BOLD:ADE0378			
	Site A, Ramonal	BOLD:ADE0378			
<i>Psorophora (Psorophora) ciliata</i> (Fabricius, 1794)	Site A, Sacxan	BOLD:AAG3849	7	0.30	1.50
	Site A, Palmar	BOLD:AAG3849			
<i>Culex (Culex) coronator</i> s.l. Dyar & Knab, 1906	Site A, Palmar	BOLD:ADG3686	6	0.30	0.60
	Site A, Ramonal	BOLD:ADG3686			
<i>Culex (Culex) interrogator</i> Dyar & Knab, 1906	Site B, Palmar	BOLD:AAF1735	3	0.00	0.00
	Site A, Ramonal	BOLD:AAF1735			
<i>Culex (Culex) nigripalpus</i> Theobald, 1901	Site A, Sacxan	BOLD:AAF1735	22	0.30	0.70
	Site B, Palmar	BOLD:AAF1735			
	Site A, Ramonal	BOLD:AAF1735			
<i>Culex (Culex) quinquefasciatus</i> Say, 1823	Site A, Sacxan	BOLD:AAA4751	4	0.10	1.00
	Site B, Palmar	BOLD:AAA4751			
<i>Culex (Melanoconion) erraticus</i> (Dyar & Knab, 1906)	Site A, Palmar	BOLD:AAG3848	6	1.80	2.70
	Site A, Ramonal	BOLD:AAG3848			
<i>Culex (Melanoconion) taeniopus</i> Dyar & Knab, 1907	Site A, Palmar	BOLD:AAW1983	7	2.40	3.70
	Site A, Ramonal	BOLD:AAW1983			
<i>Coquillettia (Rhynchotaenia) venezuelensis</i> (Theobald, 1912)	Site B, Sacxan	BOLD:ADE5089	5	0.50	1.30
	Site A, Palmar	BOLD:ADE5089			
	Site A, Ramonal	BOLD:ADE5089			
<i>Limatus durhamii</i> Theobald, 1901	Site B, Sacxan	BOLD:ACN9153	4	0.10	2.40
	Site A, Palmar	BOLD:ACN9153			
	Site B, Palmar	BOLD:ACN9153			
	Site A, Ramonal	BOLD:ACN9153			
<i>Wyeomyia (Wyeomyia) celaenocephala</i> Dyar & Knab, 1906	Site A, Ramonal	BOLD:ACM7671	6	0.00	0.20
	Site A, Palmar	BOLD:ACM7671			

program. The 256 sequences obtained were deposited in the BOLD Systems® database (Ratnasingham & Hebert, 2007) with the following process ID MRRO001-16 to MRRO285-16 and MRRO286-17 to MRRO307-17.

2.4 | Sequences analysis

All sequences obtained in this study were compared with sequences available in the BOLD Systems® using "Identification Engine" and

with sequences available in GenBank with Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). MEGA v 6.06 program (Tamura, Stecher, Peterson, Filipski, & Kumar, 2013) was used for sequences alignment, for searching for stop codons and for the calculation of intra- and interspecific genetic distances using the Kimura two parameters distance model (K2P) (Kimura, 1980; Tamura et al., 2013). To provide a graphic representation of the grouping pattern between the different species a K2P distance similarity tree was constructed using the Neighbor-Joining model (NJ) with

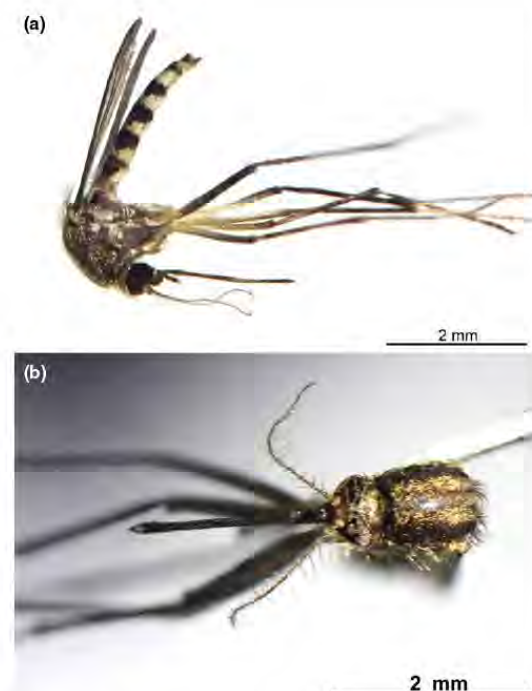


FIGURE 2 Adult female of *Ae. n. sp.*, (a) lateral view (b) dorsal view

Bootstrap support values calculated with 1,000 replicates (Laurito et al., 2013; Rozo-López & Mengual, 2015; Saitou & Nei, 1987).

2.5 | Sequences adding from databases

Seventy-one high-quality public sequences belonging to 13 species were selected from the BLAST and Identification Engine analysis and added for the construction of the tree; specimens were collected in other geographic sites and identified as some of the species reported in Supporting Information Appendix S1. Only sequences belonging to the BOLD Systems database were added to this study, as this database provides information such as collection data, specimen depository, and identifier. For *Hg. equinus* were adding five sequences generated by us from specimens collected in other locality, these sequences are still unpublished but have high quality.

2.6 | Delimitating species

To delimit the Molecular Operational Taxonomic Units (MOTU's), the ABGD (Automatic Barcode Gap Discovery) program was used (Puillandre, Lambert, Brouillet, & Achaz, 2012) with the following parameters: a minimum intraspecific distance (P_{min}) of 0.001, a maximum intraspecific distance (P_{max}) that oscillated from 0.02 to 0.1, the barcode gap width parameter with the default configuration (1.5),

TABLE 2 Abundance of species collected by sampling location

Species	Locality			(n) Total x spp.
	Sacxan	Palmar	Ramonal	
<i>Aedes aegypti</i>	4		5	9
<i>Aedes angustivittatus</i>	16	12	23	51
<i>Aedes cozumelensis</i>			6	6
<i>Aedes euplocamus</i>	48	16	13	77
<i>Aedes fulvus</i>	1	1		2
<i>Aedes scapularis</i>	1			1
<i>Aedes serratus</i>	157	27	57	241
<i>Aedes n. sp.</i>	1		2	3
<i>Aedes taeniorhynchus</i>	145	125	152	422
<i>Anopheles albimanus</i>	46	46	33	125
<i>Anopheles apicimacula</i>	1	5	1	7
<i>Anopheles crucians</i> s.l.	33	16	27	76
<i>Anopheles pseudopunctipennis</i>		1		1
<i>Anopheles veruslanei</i>		4	1	5
<i>Anopheles vestitipennis</i>	3	6	11	20
<i>Coquillettidia venezuelensis</i>		2	3	5
<i>Culex coronator</i> s.l.		5	1	6
<i>Culex erraticus</i>		4	49	53
<i>Culex interrogator</i>		2	1	3
<i>Culex nigripalpus</i>	4	50	5	59
<i>Culex quinquefasciatus</i>	2	2		4
<i>Culex taeniopus</i>		2	13	15
<i>Haemagogus equinus</i>	1		20	21
<i>Limatus durhamii</i>	6	2	1	9
<i>Psorophora albipes</i>	40	9	8	57
<i>Psorophora champerico</i>	1			1
<i>Psorophora cillata</i>	4	3		7
<i>Psorophora cyanescens</i>	29	20		49
<i>Psorophora ferox</i>	25	21	17	63
<i>Psorophora lutzii</i>	4	2	3	9
<i>Wyeomyia celaeocephala</i>		1	5	6
Total specimens by location	572	384	457	

and the K2P and Jukes–Cantor (JC) (Jukes & Cantor, 1969) evolutionary model. In the present study, an extensive comparison of the partitions resulting from different values of P , ranging from 0.010 to 0.045, was performed and a 2.7% threshold value was chosen to delimit each group. The analysis was performed for the sequences

Distance class	n	Taxa	Comparisons	Min (%)	Mean (%)	Max (%)
Intraspecific	240	28	1,479	0.00	0.75	4.40
Congeners	221	4	4,945	0.00	7.75	18.00
Confamilial	243	1	22,979	8.74	13.50	22.40

TABLE 3 K2P sequence divergence of COI barcode region among the mosquito species with >2 specimens, analysis in Culicidae family among the four genera with two or more species

obtained for this study and those downloaded from BOLD systems. The BIN system method was also used to delimit the MOTU's in our dataset (Ratnasingham & Hebert, 2013). *Psorophora champerico* sequence was excluded from the ABGD analysis as this is sensitive to singletons.

3 | RESULTS

3.1 | Morphological identification

A total of 1,413 adult females were collected. Two subfamilies (Anophelinae and Culicinae), four tribes (Aedini, Culicini, Mansoniini, and Sabethini), eight genera (*Anopheles*, *Aedes*, *Haemagogus*, *Psorophora*, *Culex*, *Coquillettia*, *Limatus*, and *Wyeomyia*), and 12 subgenera (*Anopheles*, *Nyssorhynchus*, *Howardina*, *Ochlerotatus*, *Stegomyia*, *Haemagogus*, *Janthinosoma*, *Psorophora*, *Culex*, *Melanoconion*, *Rhynchoaenia*, and *Wyeomyia*). In total, 31 morphospecies were identified (Table 1), within these a new species was discovered *Aedes* n. sp. (Figure 2).

The genus *Aedes* with nine species was the better represented, while *Haemagogus*, *Coquillettia*, *Limatus*, and *Wyeomyia* were represented by a single species (Table 1). The location Palmar presented the highest number of species ($n = 25$) while Sacxan the smallest ($n = 22$). The most abundant species were *Ae. taeniorhynchus* ($n = 422$), *Ae. serratus* ($n = 241$), and *An. albimanus* ($n = 125$), the three species were present in the three sampled localities, but with greater abundance in Sacxan and Ramonal (Table 2).

3.2 | DNA barcodes

From the 272 specimens processed, 243 COI sequences were obtained. 29 sequences were discarded due to their low quality but the 31 morphologically identified species are represented by their corresponding DNA barcode. The size of the sequences obtained was between 570 and 650 bp. The total number of specimens morphological and molecularly analyzed is reported in Table 1.

The match between the sequences obtained in this study and those deposited in the BOLD Systems® database showed that 25 out of the 31 species presented a 98.02%–100% similarity with conspecific sequences, while in Genbank only 14 species showed a 98%–100% identity (Supporting Information Appendix S2). Sequences obtained in this study for the species *Ae. n. sp.*, *Cx. coronator* s.l., *Cx. interrogator*, *Cx. nigripalpus*, and *Cx. quinquefasciatus*, showed ambiguous identification in both databases (Supporting Information Appendix S2). The sequences generated for *An. crucians* s.l., *An. versulanei*, *An. vestitipennis*, *Ae. cozumelensis*, *Ae. fulvus*, *Hg. equinus*,

Ps. albipes, *Ps. lutzii*, *Ps. ciliata*, *Cq. venezuelensis*, and *Wy. celaenophala* are new to GenBank (Supporting Information Appendix S2). The sequence generated in this study for the species *Ps. champerico* is a new contribution to both databases.

3.3 | Genetic distance

In this study, the average K2P intraspecific distance was 0.75%. The maximum observed K2P distance between conspecific specimens was for *An. crucians* s.l. with a value of 4.40% (Tables 1 and 3). The maximum interspecific distance for *Ae. serratus* was 3.90% and the same value for *Hg. equinus* (3.90%); for *Ps. ferox* was 4.5% and an average distance of 3.03% was observed between sequences generated here and sequences downloaded from BOLD; for *Cx. taeniorhynchus* a 3.7% distance was observed (Table 1). In *Cx. erraticus* the average distance was 4.1%; for *An. apicimacula* a maximum distance of 8.10% was observed in sequences generated here and sequences downloaded from BOLD; for *Cx. interrogator* and *Cx. nigripalpus*, the average interspecific K2P distance between the specimens of both species was 0.1%; finally, for *Ae. angustivittatus* and *Ae. n. sp.* the average was 1.1% with a maximum interspecific distance of 1.8%.

3.4 | Neighbor-joining tree

Most species formed well-supported groups in the NJ tree with bootstrap values between 99% and 100%. (Figure 3). The main branches of the NJ tree represented different taxonomic groups such as genera and subgenera. The sequences obtained from BOLD Systems for *An. pseudopunctipennis*, *An. albimanus*, *Ae. euplocamus*, *Ae. scapularis*, *Ae. aegypti*, *Ps. cyanescens*, *Ps. ciliata*, and *Li. durhamii* formed monophyletic groups with the sequences generated in this study, the branches were supported with high bootstrap values (99%–100%) (Figure 3).

Monophyletic clades were observed for *Cx. interrogator* and *Cx. nigripalpus*, and for *Ae. angustivittatus* and *Ae. n. sp.*, with high bootstrap values (99%–100%) (Figure 3). *Ae. serratus* formed well-defined paraphyletic clades (Figure 3) including both the sequences generated in this study (clade QROO) and the sequences from the database belonging to specimens collected by Talaga et al. (2017) in French Guiana (clade FG) (Supporting Information Appendix S1). *Haemagogus equinus* formed a paraphyletic clade, eight sequences (CUL072-13, CUL079-13, CUL078-13, MRRO048-16, MRRO215-16, MRRO216-16, MRRO217-16, and MRRO221-16) formed clade QROO-A supported by a 98% bootstrap value, and other isolated clade (QROO-B) that included the sequences CUL076-13, CUL077-13, and MRRO220-16, and a third clade (QROO-C) formed

by a single sequence MRRO218-16. In *Cx. erraticus*, we also found two well-supported clades, QROO clade with six sequences generated in this study and US clade that include the sequences obtained from the database of specimens collected from Florida (Supporting Information Appendix S1) (Figure 3). For *Ps. ferox* two clades were observed, one consisting of sequences generated in this study mix with sequences downloaded from database and collected in French Guiana, Argentina, and Mexico (Supporting Information Appendix S1) (Figure 3), and a second clade formed by seven sequences belonging to US specimens (Supporting Information Appendix S1); both clades with bootstrap values >60%. Finally, for *An. apicimacula*, were formed two clades, one formed by the sequences generated here and the sequences GBANO930-14 and GBANO931-14 from Colombian specimens, and another clade formed by other sequences from Colombian specimens (Supporting Information Appendix S1) (Figure 3).

3.5 | Delimitation of entities

The ABGD method identified 27 MOTU's for the 31 species (Table 4). *Ae. angustivittatus* and *Ae. n. sp.* were assigned to the same MOTU, in the same way for *Ae. euplocamus* and *Ae. scapularis*; *Cx. interrogator* and *Cx. nigripalpus*; *Ps. albipes* with *Ps. cyanescens*, and *Ps. ferox* with *Ps. lutzii*. On the other hand, the sequences of *An. apicimacula* and *Hg. equinus* were grouped into 2 and 3 different MOTU's, respectively. Derived from the ABGD analysis a distance (K2P) of 2.7% was assigned as a threshold value for assigning each species to its corresponding MOTU, as well as the value for species delimitation.

Unlike 27 MOTUs assigned with ABGD, 32 BINs were assigned by BOLD for the sequences generated in this study (Tables 1 and 2). *Ae. angustivittatus* and *Ae. n. sp.* shared the same BIN (BOLD:ACN2972), as did *Cx. interrogator* and *Cx. nigripalpus* (BOLD:AAF1735) (Table 1). *An. crucians* was divided into two BINs (BOLD:AAC8253 and BOLD:ADG0892) and *Hg. equinus* into three BINs (BOLD:ACN9156, BOLD:ADG0616, and BOLD:ACN9157) (Table 1).

4 | DISCUSSION

4.1 | Distribution of anthropofagous species in the border Mexico-Belize

In the locality of Sacxan, six species of Culicidae had already been reported (Ortega-Morales et al., 2015), and 17 more species are reported in this study (Table 2), recording a total of 23 species in this locality. Of the six species previously reported, the presence of five of them is confirmed (*An. crucians* s.l., *An. vestitipennis*, *An. albimanus*, *Ps. ferox*, and *Cx. nigripalpus*).

Until now, the diversity of mosquitoes in the areas of Palmar and Ramonal was unknown. The 25 and 24 species reported, respectively, in each area, highlight the importance of biodiversity studies and the correct identification of species that have medical importance (Azari-Hamidian et al., 2010).

The most important medical species collected in our study in the border zone between Mexico and Belize are *An. pseudopunctipennis*, *An. vestitipennis*, *An. albimanus*, and *Ae. aegypti*. For *An. pseudopunctipennis*, the last report in Quintana Roo dates back more than 60 years (Vargas & Martínez-Palacios, 1950), and its collection in this study suggests that their distribution in Quintana Roo is wide, this species together with *An. vestitipennis* and *An. albimanus*, are considered the main malaria vector in Mexico (Hiwat & Bretas, 2011; Loyola, Arrendondo, Rodríguez, Browns, & Vasa Marin, 1991; Mijares, Pérez Pacheco, Tomás Martínez, Cantón, & Ambrosio, 1999). By another hand, *Aedes aegypti* is the main vector of Dengue, Chikungunya, and Zika virus in Quintana Roo (Sánchez-Rodríguez et al., 2014; Torres-Avenida et al., 2015). Hence, the importance to continue with the entomological surveillance of these species in the region.

4.2 | Genetic distance

In the present study, the overlap observed between the intra- and interspecific K2P distance in sequences of *Culex* and *Aedes* genera gave rise to ambiguous identifications when using DNA barcoding. Most of the conspecific individuals in those genera showed a genetic distance <2.7%. Species such as *Cx. interrogator* versus *Cx. nigripalpus*, *Ae. angustivittatus* versus *Ae. n. sp.* could not be separated, in both cases we suspect a recent divergence or a high species richness with insufficient sampling.

4.3 | DNA barcodes and delimitation of species

Twenty-eight out of 31 species identified morphologically in this study, showed correspondence between morphology and molecular data. Considering all the criteria for delimiting species in this study, we report 33 taxonomic entities (31 morphospecies, 1 cryptic species in *Hg. equinus*, and 1 cryptic species in *An. crucians* s.l.). For the single sequence of *Hg. equinus* that form an aisled clade, is necessary to collect specimens and add sequences, but we do not discard the possibility of existence of more cryptic specie.

For *Ae. euplocamus* and *Ae. scapularis*; *Ps. albipes* and *Ps. cyanescens*; *Ps. ferox* and *Ps. lutzii* grouped in the same MOTU by the ABGD method, but assigned in a different BIN number for each species by BOLD systems. The discordance between the two MOTUs delimitation methods, might be due to the different threshold values used for separating species, 2.2% by default for the BIN system method, while 2.7% was considered for the ABGD (see Section 2.6). Although has been pointed that the taxonomic performance of RESL in BIN system is stronger than ABGD algorithm, showing better results between species identified and MOTU assigned (Ratnasingham & Hebert, 2013). In ABGD, the results improve when is selected a best partitioning scheme, in the analysis the final partitioning depends to a large extent on the user-defined prior upper limit to intra-specific distance (*P*) as pointed out by Puillandre et al. (2012). Also, it is important to mention that both analyses largely depend on the representation of the species (Pentinsaari, Vos, & Mutanen, 2017).

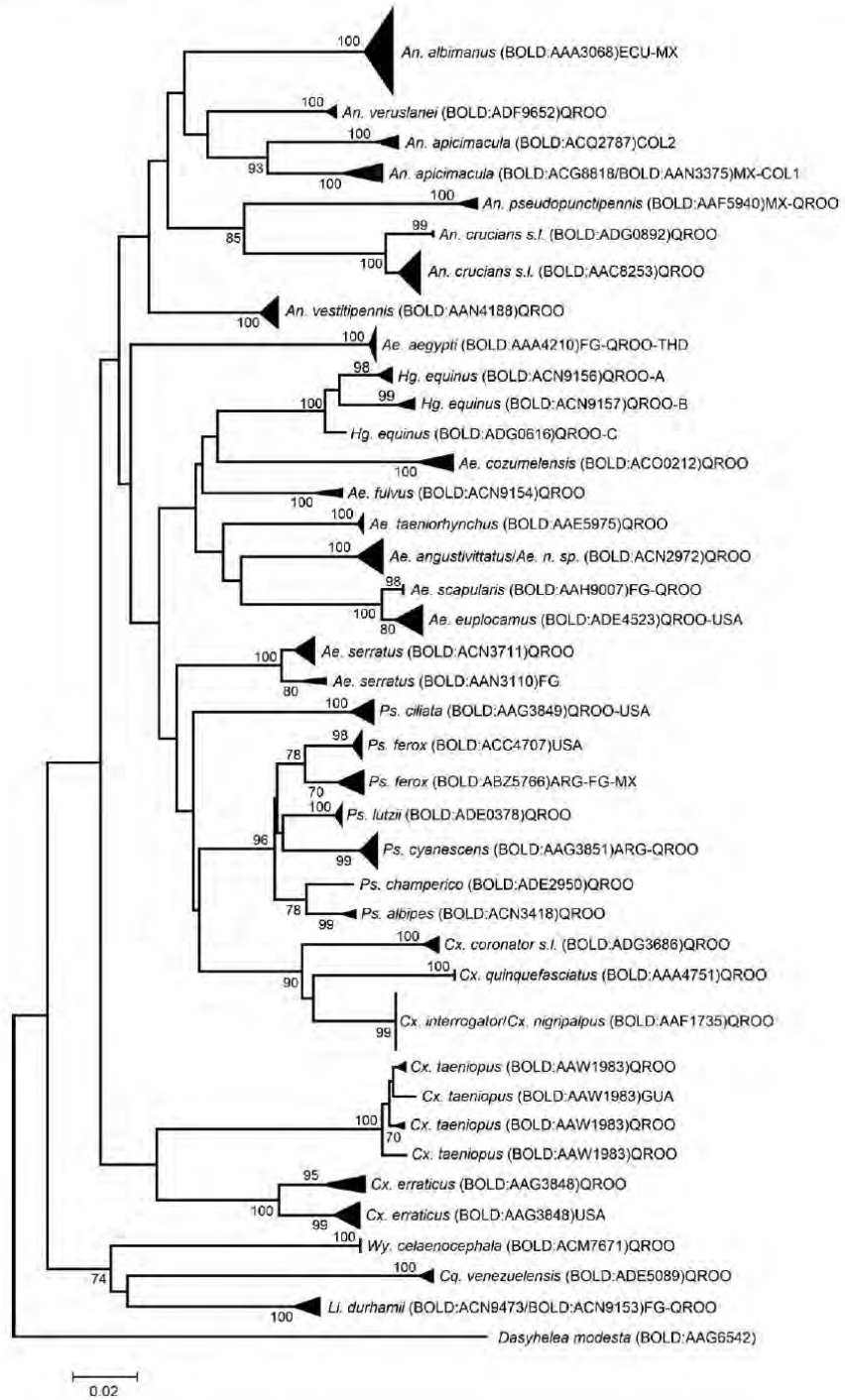


FIGURE 3 Neighbor-joining tree based on the Kimura two-parameter distances among COI sequences (570–650 bp fragment) of 31 Culicidae species. Bootstrap values are shown at the branch points. ARG: Argentina; COL: Colombia; ECU: Ecuador; FG: French Guyana; GUA: Guatemala; MX: mosquito sequences of Quintana Roo and another state of Mexico; QROO: mosquito sequences of this study; THD: Thailand; USA: mosquito sequences of United States of America

TABLE 4 MOTUs recovered from COI of Culicidae by ABGD method in this study

Marker	BIN system	Models	ABGD																	
			0.0200 ^a		0.0210		0.0220		0.0230		0.0240		0.0250		0.0260		0.0270		0.0280	
			I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R
COI	32	K2P	23	27	23	27	23	27	23	27	23	27	23	27	23	27	23	27	23	25
		JC	23	27	23	27	23	27	23	27	23	27	23	27	23	27	23	27	23	25

Note. I: initial partitions; R: recursive partitions.

Number of ABGD partitions obtained by JC and K2P models was the same. Relative gap Width (X) was 1.5.

^aPrior intraspecific divergence (P).

The results obtained with the ABGD method in this study are similar to those obtained by Versteirt et al. (2015) for the culicids of Belgium, where *Cx. pipiens* and *Cx. torrentium*, *Ae. cantans* and *Ae. annulipes*, *Ae. punctor* and *Ae. communis*, and *An. maculipennis* s.s. and *An. messeae* were grouped in the same MOTU. In *Aedes* genera, the intraspecific divergence was between 3.6% and 3.9%, evidencing that the delimitation of species in this genera depends largely on the sampling (Beebe, 2018).

4.4 | Cryptic diversity

4.4.1 | *Anopheles apicimacula*

Our results supported the hypothesis of Gómez, Bickersmith, González, Conn, and Correa (2015), suggesting that *An. apicimacula* is a species complex. In this study, when analyzing the sequences generated here and those of specimens from Colombia, the average intraspecific distance (K2P) was 5.6%. Our sequences formed a clade with sequences of *An. apicimacula* from Antioquia Colombia, while sequences of *An. apicimacula* from Choco and Valle del Cauca Colombia formed another clade. Due to the proximity between our study area (<300 km) and the type locality (Livingston, Guatemala), it is likely that our collected specimens corresponded to *An. apicimacula* s.s. (Dyar & Knab, 1906) (Colombian Caribbean lineage), while the specimens that form the lineage of the Colombian Pacific (Choco and Valle del Cauca) belong to the new species (*An. apicimacula* s.l.).

4.4.2 | *Anopheles crucians* s.l.

In Mexico, two species of this complex have been reported using only morphology, *An. crucians* s.l. which is reported in North America (Massachusetts to New Mexico, USA), Central America (Mexico to Nicaragua) and in the Caribbean islands (Wilkerson, Reinert, & Li, 2004), and *An. bradleyi* which is distributed along the coasts of the Atlantic and Gulf of the USA up to the south of Nicaragua (Floore, Harrison, & Eldridge, 1976). It is necessary to continue studying *An.*

crucians species and contribute with information in order to facilitate the separation of all the species of the complex. The genetic distances of 4.4% reported among the specimens collected in this study, suggested the presence of cryptic speciation. This result was not surprising as *An. crucians* has been previously considered as a complex formed by seven species which are impossible to separate using only adult female characters, and therefore, the use of molecular markers could represent the only way to allow their separation (Wilkerson et al., 2004). However, with the results obtained in this study, we might probably report an eighth species in this complex.

4.4.3 | *Aedes serratus*

This species showed a greater intraspecific genetic distance than the one previously reported (3.50%); furthermore, the distance between specimens collected in this study (*Ae. serratus* QROO) and sequences of individuals collected in French Guiana (*Ae. serratus* FG) showed the existence of two lineages. So far, a wide distribution has been reported for this species from Mexico to Brazil (WRBU, 2018) but it is very likely that this wide distribution will be interrupted by the Andes mountain range that crosses Colombia and Venezuela which is responsible for propitiating the speciation (De-Silva et al., 2017).

4.4.4 | *Hameagogus equinus*

The three clades observed with an average intraspecific distance of 3.05% also suggest cryptic speciation within the genus. No morphological variation has yet been found in the analyzed specimens but we suggest including the observation of immature stages such as eggs, larvae, and pupae, as well as the genitalia of the adult males to find the trait(s) that separate these species (Versteirt et al., 2015). Five specimens of *Hg. equinus* included in this analysis were collected in 2013 in a locality separated by 30 km of actual study area, four on five specimens were grouped with QROO-A clade and one with QROO-B clade, support our hypothesis that there are more than one species within *Hg. equinus*.

4.4.5 | *Psorophora ferox*

An average K2P distance of 3.23% was observed for *Ps. ferox*, which separates specimens from Florida from those from Mexico, Argentina, and French Guiana, forming two well-defined clades. Recently, Mello, Santos-Mallet, Tátıla-Ferreira, and Alencar (2018) found significant differences in the external morphology of the eggs, the exochorion ornamentation, in three populations (the USA, Trinidad and Tobago, and Brazil). These differences were pointed out by Linley and Chadee (1990) in the population of Southeast USA and Trinidad and Tobago; however, they were not considered by the separation of species. Nevertheless, we now show molecular evidences that suggest more than one lineage for *Ps. ferox*. These results imply the necessity to continue with studies including integrative taxonomy of *Ps. ferox* populations throughout the American continent, which would help delimiting new species and establishing their geographic range (Dayrat, 2005; Will, Mishler, & Wheeler, 2005).

4.4.6 | *Culex erraticus*

Mendenhall, Bahl, Blum, and Wesson (2012) identified two main lineages in *Cx. erraticus* from USA and other countries of America, by analyzing sequences of the Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) and the mitochondrial genes from NADH dehydrogenase. The analysis showed that a lineage represents Central and Eastern USA, while the other corresponds to Central America, South America, and West USA. In this study, the generated sequences are grouped in one clade and the sequences of specimens from Florida (USA) in another clade with an average K2P distance of 4.1%. This result showed a strong evidence of the existence of two lineages for *Cx. erraticus*. By this way, our results reinforce the hypothesis of Mendenhall et al. (2012) that there are physical barriers such as the Chihuahuan desert that limit the dispersal of *Cx. erraticus* and is reasonable to think that larvae develop is limited to bodies of semipermanent and permanent waters that include ditches, flood areas, streams (WRBU, 2018).

4.4.7 | *Culex taeniopus*

The usefulness of DNA barcodes for the identification of species of the subgenus *Melanoconion* has been reported, as well as the discovery of cryptic species or new species within the genus *Culex* (Laurito et al., 2013; Torres-Gutiérrez et al., 2016). Values of 3.70% are reported for specimens of *Cx. taeniopus* collected for this study. The specimens were collected in relatively close localities (Palmar and Ramonal), with a distance between localities of 12 km, and no apparent geographic barrier that can lead to speciation was present; therefore, the cryptic speciation could be the result of a sympatric speciation. To clarify the high values of intraspecific divergence, we suggest extend the collection of specimens to increase the number of sequences and represent a greater geographical area, at this moment Guatemala is only represented with one specimen, performing ecological studies and observation of structures such as genitalia (in males) and the morphology of larvae and eggs to find any character

that could separate the species. It is in our interest to rule out the possibility of the presence of a complex of species and not only cryptic speciation.

4.5 | Morphological differences versus low genetic distances

The interspecific distance between *Ae. angustivittatus* and *Ae. n. sp.* of 1.1%, the low average is due that probably both species belong to the Scapularis group. However, morphological characters of *Ae. n. sp.* did not match those of *Ae. angustivittatus*, nor those of *Ae. trivittatus* or the characters of the hybrid reported by Arnell (1976) originating from *Ae. angustivittatus* and *Ae. trivittatus*. *Aedes angustivittatus* and *Ae. n. sp.* species presented differences in the pattern of ornamentation of the scutum. Females of *Ae. angustivittatus* presented two longitudinal lines of pale golden scales along the scutum (Arnell, 1976; Clark-Gil & Darsie, 1983). *Aedes n. sp.* presented three wide lines of golden scales, one covering the acrostichal line and the other two placed each on one side of the acrostichal line, similar to those reported by Arnell (1976) for *Ae. crinifer*. The distribution of *Ae. crinifer* is restricted to South America (Arnell, 1976; WRBU, 2018), and sequences of *Ae. crinifer* from Argentina obtained by Díaz-Nieto et al., (2013) were analyzed and the average intraspecific distance between *Ae. crinifer* and our *Ae. n. sp.* was 8.3%.

Another case of incomplete separation is *Cx. interrogator* and *Cx. nigripalpus*, COI gene did not present enough divergence to separate the two species, as the distance between both species was 0.1%. Though similar cases were observed within species of *Culex* in South America, where 22 species were sequenced but 30% could not be delimited despite using multilocus (COI or ITS2) (Laurito et al., 2013). The same case was reported between *Culex minor* and *Culex spiculosus*, which presented an average K2P interspecific distance of 1.86% (Wang et al., 2012). These results could be explained by an incomplete lineage sorting or introgression events (Beebe, 2018).

Cases like those here reported, where COI does not present enough divergence to separate close species because the lineages are not fully sorted into divergent clades, are not new, but our data increase the lineages record of recent divergence. In this sense, it is important to conduct further studies in order to look for evidence of reproductive isolation. Also, the use of a single gene region is an imperfect tool because will be overlooked recent species because of their low sequence divergence (Ratnasingham & Hebert, 2013). It is necessary to include at the analysis nuclear marker like ITS2 as well as ecological and biological data (Ajamma et al., 2016; Alquezar, Hemmerter, Cooper, & Beebe, 2010; Beebe, 2018; Mardulyn, Othmezzouri, Mikhailov, & Pasteels, 2011; Versteirt et al., 2015; Wang et al., 2012).

5 | CONCLUSIONS

The results in this study contribute to the development of a reference DNA barcode library for Mexican culicids. In addition, our

analysis reported the presence of a certain taxonomic differentiation that needs to be investigated in *An. apicimacula*, *An. crucians* s.l., *Ae. serratus*, *Hg. equinus*, *Ps. ferox*, *Cx. erraticus*, and *Cx. taeniopus*. For the new specie discovered, it is necessary to work on the description during all their life stages (larval exuvia, pupa, and adults), which allow the documentation of the link between morphological and molecular identification standards (Versteirt et al., 2015). Finally, the identification of species is an essential step for monitoring and vectors control. This information is valuable for the Ministry of Health (SS) of Mexico for the contribution in the epidemiological surveillance and the design of programs for the control of vector-borne diseases in the border region with Belize.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Gemma Macías and Edgardo Balam for the support in the collection trips, Holger Weissenberger for building the map of collection sites, Humberto Bahena-Basave for the elaboration of pictures, Noemi Salas for the support in the entomological laboratory. To Dra. Ariane Dor who provided recommendations that improved the paper. Our gratitude to Patrizia Elena Vannucchi and Dr Gerald Islebe by the revision to the English language. As well as the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) Mexico for the master's scholarship provided to Rahuel J. Chan-Chable and the Red MEXBOL project no. 271108 by funding

CONFLICT OF INTEREST

None declared.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

R.J.C.-C. involved in samplings, taxonomic identification, and analysis of genetic distances. A.M.-A. generated the sequence data and its genetic analysis. A.M.-A. P.C.M.-A. designed the study. A.I.O.-M. provided taxonomic support on identification. All authors contributed to the text and approved the final manuscript.

DATA ACCESSIBILITY

The collected data are deposited in the database BOLD Systems® (www.boldsystems.org) in the project "Mosquitoes from Rio Hondo, Mexican Caribbean" (MRRO). Molecular sequences have been submitted to GenBank on June 13.

ORCID

Arelly Martínez-Arce  <https://orcid.org/0000-0002-8482-372X>

REFERENCES

- Ajamma, Y. U., Villinger, J., Omondi, D., Salifu, D., Onchuru, T. O., Njoroge, L., ... Masiga, D. K. (2016). Composition and genetic diversity of

- mosquitoes (Diptera: Culicidae) on Islands and Mainland shores of Kenya's lakes Victoria and Baringo. *Journal of Medical Entomology*, 53, 1348–1363. <https://doi.org/10.1093/jme/tjw102>
- Alquezar, D. E., Hemmerter, S., Cooper, R. D., & Beebe, N. W. (2010). Incomplete concerted evolution and reproductive isolation at the rDNA locus uncovers nine cryptic species within *Anopheles longirostris* from Papua New Guinea. *BMC Evolutionary Biology*, 10, 392. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-392>
- Arnell, J. H. (1976). Mosquitoes studies (Diptera: Culicidae) XXXIII. A revision of the scapularis group of *Aedes* (*Ochlerotatus*). *Contributions of the American Entomological Institute*, 13(3), 1–144.
- Ashfaq, M., Hebert, P. D. N., Mirza, J. H., Khan, A. M., Zafar, Y., & Mirza, M. S. (2014). Analyzing mosquito (Diptera: Culicidae) diversity in Pakistan by DNA barcoding. *PLoS ONE*, 9(5), e97268. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097268>
- Azari-Hamidian, S., Linton, Y. M., Abai, M. R., Ladonni, H., Oshaghi, M. A., Hanafi-Bojd, A. A., ... Harbach, R. E. (2010). Mosquito (Diptera: Culicidae) fauna of the Iranian islands in the Persian Gulf. *Journal of Natural History*, 44(15), 913–925. <https://doi.org/10.1080/00222930903437358>
- Batovska, J., Blacket, M. J., Brown, K., & Lynch, S. E. (2016). Molecular identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in southeastern Australia. *Ecology and Evolution*, 6(9), 3001–3011. <https://doi.org/10.1002/ece3.2095>
- Beebe, N. W. (2018). DNA barcoding mosquitoes: Advice for potential prospectors. *Parasitology*, 145(5), 622–633. <https://doi.org/10.1017/S0031182018000343>
- Berlin, O. G. W. (1969). Mosquito studies (Diptera, Culicidae) XII. A revision of the Neotropical subgenus *Howardina* of *Aedes*. *Contributions of the American Entomological Institute*, 4(2), 1–190.
- Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K. L., Meier, R., Winker, K., ... Das, I. (2007). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 22(3), 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.11.004>
- Bond, J. G., Casas-Martínez, M., Quiroz-Martínez, H., Novelo-Gutiérrez, R., Marina, C. F., Ulloa, A., ... Williams, T. (2014). Diversity of mosquitoes and the aquatic insects associated with their oviposition sites along the Pacific coast of Mexico. *Parasites and Vectors*, 7, 41. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-41>
- Bueno-Mari, R., Corella-López, E., & Jiménez-Peydró, R. (2010). Húlicidofauna (Diptera: Culicidae) presente en los distintos enclaves húlicos de la ciudad de Valencia (España). *Revista Colombiana de Entomología*, 36, 235–241.
- Cardoso, J. C., de Almeida, M. A. B., dos Santos, E., da Fonseca, D. F., Sallum, M. A. M., Noll, C. A., Monteiro, H. A. O., ... Vasconcelos, P. F. C. (2010). Yellow fever virus in *Haemagogus leucocelaenus* and *Aedes serratus* mosquitoes, Southern Brazil, 2008. *Emerging Infectious Diseases*, 16(12), 1918–1924. <https://doi.org/10.3201/eid1612.100608>
- Chan-Chable, R. J., Ortega-Morales, A. I., & Martínez-Arce, A. (2016). First record of *Psorophora albipes* in Quintana Roo, México. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 32(3), 237–239. <https://doi.org/10.2987/16-6580.1>
- Clark-Gil, S., & Darsie, R. F. (1983). The mosquitoes of Guatemala, their identification, distribution and bionomics. *Mosquito Systematics*, 15, 151–284.
- Cywinska, A., Hunter, F. F., & Hebert, P. D. N. (2006). Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. *Medical and Veterinary Entomology*, 20(4), 413–424. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2006.00653.x>
- Darsie, R. F., & Ward, R. A. (1981). Identification and geographical distribution of the mosquitoes of North America, North of México. *Mosquitoes Systematic Supplement*, 1, 1–313.
- Dayrat, B. (2005). Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*, 85(3), 407–415. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2005.00503.x>

- De-Silva, D. L., Mota, L. L., Chazot, N., Mallarino, R., Silva-Brandão, K. L., Gómez Piñeres, L. M., ... Elias, M. (2017). North Andean origin and diversification of the largest ithomiine butterfly genus. *Scientific Reports*, 7, 45966. <https://doi.org/10.1038/srep45966>
- Díaz Nájera, A. (1965). Claves para identificar especies mexicanas de *Mansonia* y *Psorophora* (Diptera: Culicidae). *Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales*, 25(2), 127–137.
- Díaz-Nieto, L. M., Maciá, A., Parisi, G., Farina, J. L., Vidal-Domínguez, M. E., Perotti, M. A., & Berón, C. M. (2013). Distribution of mosquitoes in the South East of Argentina and first report on the analysis based on 18S rDNA and COI sequences. *PLoS ONE*, 8(9), e75516. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075516>
- Dyar, H. G., & Knab, F. (1906). Diagnoses of new species of mosquitoes. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 19, 133–142.
- Erlank, E., Koekemoer, L. L., & Coetzee, M. (2018). The importance of morphological identification of African anopheline mosquitoes (Diptera: Culicidae) for malaria control programmes. *Malaria Journal*, 17, 43. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2189-5>
- Floore, T. G., Harrison, B. A., & Eldridge, B. F. (1976). The *Anopheles* (*Anopheles*) *crucians* subgroup in the United States (Diptera: Culicidae). *Mosquito Systematics*, 8(1), 1–109.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3, 294–299.
- Foottit, R. G., Maw, H. E. L., Havill, N. P., Ahern, R. G., & Montgomery, M. E. (2009). DNA barcodes to identify species and explore diversity in the Adelgidae (Insecta: Hemiptera: Aphidoidea). *Molecular Ecology Resources*, 9, 188–195. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02644.x>
- Gómez, G. F., Bickersmith, S. A., González, R., Conn, J. E., & Correa, M. M. (2015). Molecular taxonomy provides new insights into *Anopheles* species of the neotropical Arribalzaga Series. *PLoS ONE*, 10(3), e0119488. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119488>
- Harbach, R. E. (2018). *Mosquito Taxonomic Inventory*. Retrieved from <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/simpletaxonomy/term/6047>
- Hebert, P. D. N., & Gregory, T. R. (2005). The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic Biology*, 54, 852–859. <https://doi.org/10.1080/10635150500354886>
- Hiwat, H., & Bretas, G. (2011). Ecology of *Anopheles darlingi* root with respect to vector importance: A review. *Parasites & Vectors*, 4, 177. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-177>
- Ibáñez-Bernal, S., Strickman, D., & Martínez-Campos, C. (1996). Culicidae (Diptera). In J. Llorente-Bousquets, A. N. García-Aldrete, & E. González-Soriano (Eds.), *Biodiversidad, taxonomía y biogeografía de artrópodos de México: Hacia una síntesis de su conocimiento* (pp. 591–602). Mexico City, México: CONABIO-IBUNAM.
- Ivanova, N. V., deWaard, J., & Hebert, P. D. N. (2006). An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. *Molecular Ecology Notes*, 6, 998–1002. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01428.x>
- Jukes, T. H., & Cantor, C. R. (1969). Evolution of protein molecules. In H. N. Munro (Ed.), *Mammalian protein metabolism* (pp. 21–132). New York, NY: Academic Press.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16, 111–120.
- Kumar, N. P., Rajavel, A. R., Natarajan, R., & Jambulingam, P. (2007). DNA barcodes can distinguish species of Indian mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 44, 1–7. <https://doi.org/10.1093/jmedent/41.5.01>
- Laboudi, M., Faraj, C., Sadak, A., Harrat, Z., Boubidi, S. C., Harbach, R. E., ... Linton, Y. M. (2011). DNA barcodes confirm the presence of a single member of the *Anopheles maculipennis* group in Morocco and Algeria: *An. sicaulti* is conspecific with *An. labranchiae*. *Acta Tropica*, 118, 6–13. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.12.006>
- Laurito, M., de Oliveira, T. M. P., Almirón, W. R., & Sallum, M. A. M. (2013). COI barcode versus morphological identification of *Culex* (*Culex*) (Diptera: Culicidae) species: A case study using samples from Argentina and Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108, 110–122. <https://doi.org/10.1590/0074-0276130457>
- Linley, J. R., & Chadee, D. D. (1990). Fine structure of the eggs of *Psorophora columbiana*, *Ps. cingulata* and *Ps. ferox* (Diptera: Culicidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 92(3), 497–511.
- Loyola, E. G., Arrendondo, J. I., Rodríguez, M. H., Browns, D. N., & Vasa Marin, M. A. (1991). *Anopheles vestitipennis*, the probable vector of *Plasmodium vivax* in the Lacandon forest of Chiapas, Mexico. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 85, 171–174.
- Mardulyn, P., Othmezzouri, N., Mikhailov, Y. E., & Pasteels, J. M. (2011). Conflicting mitochondrial and nuclear phylogeographic signals and evolution of host-plant shifts in the boreo-montane leaf beetle *Chrysomela lapponica*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61, 686–696. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.09.001>
- Mello, C. F., Santos-Mallet, J. R., Tátala-Ferreira, A., & Alencar, J. (2018). Comparing the egg ultrastructure of three *Psorophora ferox* (Diptera: Culicidae) populations. *Brazilian Journal of Biology*, 78(3), 505–508. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.171829>
- Mendenhall, I. H., Bahl, J., Blum, M. J., & Wesson, D. M. (2012). Genetic structure of *Culex erraticus* populations across the Americas. *Journal of Medical Entomology*, 49, 522–534.
- Méndez-Galván, J. F., Betanzos-Reyes, A. F., Velázquez-Monroy, O., & Tapia-Conyer, R. (2004). *Guía para la implementación y demostración de alternativas sostenibles de control integrado de la malaria en México y América Central*. Mexico City, México: Secretaría de Salud.
- Mijares, A. S., Pérez Pacheco, R., Tomás Martínez, S. H., Cantón, L. E., & Ambrosio, G. F. (1999). The *Romanomermis iyengari* parasite for *Anopheles pseudopunctipennis* suppression in natural habitats in Oaxaca State, Mexico. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 5, 23–28. <https://doi.org/10.1590/S1020-49891999000100004>
- Ordóñez-Sánchez, F., Sánchez-Trinidad, A., Mis-Ávila, P., Canul-Amaro, G., Fernández-Salas, I., & Ortega-Morales, A. I. (2013). Nuevos registros de mosquitos (Diptera: Culicidae) en algunas localidades de Campeche y Quintana Roo. *Entomología Mexicana*, 1, 850–854.
- Ortega Morales, A. I., Mis Avila, P., Elizondo-Quiroga, A., Harbach, R. E., Siller-Rodríguez, Q. K., & Fernández-Salas, I. (2010). The mosquitoes of Quintana Roo State, México (Diptera: Culicidae). *Acta Zoológica Mexicana (n.s.)*, 26, 33–46.
- Ortega-Morales, A. I., Zavortink, T. J., Huerta-Jiménez, H., Sánchez-Ramos, F. J., Valdés-Perezgasga, M. T., Reyes-Villanueva, F., ... Fernández-Salas, I. (2015). Mosquito records from Mexico: The mosquitoes (Diptera: Culicidae) of Tamaulipas State. *Journal of Medical Entomology*, 52, 171–184. <https://doi.org/10.1093/jme/tju008>
- Pentinsaari, M., Vos, R., & Mutanen, M. (2017). Algorithmic single-locus species delimitation: Effects of sampling effort, variation and nonmonophyly in four methods and 1870 species of beetles. *Molecular Ecology Resources*, 17, 393–404. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12557>
- Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S., & Achaz, G. (2012). ABGD, automatic barcode gap discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*, 21, 1864–1877. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05239.x>
- Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. N. (2007). BOLD: The barcode of life data system (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Notes*, 7, 355–364.
- Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. N. (2013). A DNA-based registry for all animal species: The Barcode Index Number (BIN) System. *PLoS ONE*, 8, e66213. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066213>

- Rozo-López, P., & Mengual, X. (2015). Mosquito species (Diptera, Culicidae) in three ecosystems from the Colombian Andes: Identification through DNA barcoding and adult morphology. *ZooKeys*, 513, 39–64. <https://doi.org/10.3897/zookeys.513.9561>
- Ruiz-López, F., Wilkerson, R. C., Conn, J. E., McKeon, S. N., Levin, D. M., Quiñones, M. L., & Linton, Y. M. (2012). DNA barcoding reveals both known and novel taxa in the Albitarsis Group (Anopheles: Nyssorhynchus) of Neotropical malaria vectors. *Parasites & Vectors*, 5, 44. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-44>
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbour-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–425.
- Salomón-Grajales, J., Lugo-Moguel, G. V., Tinal-Gordillo, V. R., de la Cruz-Velazquez, J., Beaty, B. J., Eisen, L., ... García-Rejón, J. E. (2012). *Aedes albopictus* mosquitoes, Yucatán Peninsula, México. *Emerging Infectious Diseases*, 18, 525–527.
- Sánchez-Rodríguez, O. S., Sánchez-Casas, R. M., Laguna-Aguilar, M., Alvarado-Moreno, M. S., Zarate-Nahon, E. A., Ramírez-Jimenez, R., ... Fernandez-Salas, I. (2014). Natural transmission of dengue virus by *Aedes albopictus* at Monterrey, Northeastern Mexico. *Southwestern Entomologist*, 39(3), 459–468. <https://doi.org/10.3958/059.039.0307>
- SINAVE [Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica] (2018). *Vigilancia epidemiológica*. Mexico City, Mexico: Secretaría de Salud. Retrieved from <http://www.sinave.gob.mx>
- Sirivanakarn, S. (1982). A review of the systematics and a proposed scheme of internal classification of the New World subgenus *Melanoconion* of *Culex* (Diptera, Culicidae). *Mosquito Systematics*, 14(4), 265–333.
- Talaga, S., Leroy, C., Guidez, A., Dusfour, I., Girod, R., Dejean, A., & Murielle, J. (2017). DNA reference libraries of French Guianese mosquitoes for barcoding and metabarcoding. *PLoS ONE*, 12(6), e0176993. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176993>
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Torres-Avendaño, J. I., Castillo-Ureta, H., Torres-Montoya, E. H., Meza-Carrillo, E., Lopez-Mendoza, R. L., Vazquez-Martinez, M. G., & Rendon-Maldonado, J. G. (2015). First record of *Aedes albopictus* in Sinaloa, Mexico. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 31(2), 164–166. <https://doi.org/10.2987/14-6461R>
- Torres-Gutiérrez, C., Bergo, E. S., Emerson, K. J., de Oliveira, T. M. P., Greni, S., & Sallum, M. A. M. (2016). Mitochondrial COI gene as a tool in the taxonomy of mosquitoes *Culex* subgenus *Melanoconion*. *Acta Tropica*, 164, 137–149. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.09.007>
- Vargas, L., & Martínez-Palacios, A. (1950). *Estudio taxonómico de los mosquitos Anofelinos de México*. Mexico City, México: Secretaría de Salud.
- Versteirt, V., Nagy, Z. T., Roelants, P., Denis, L., Bream, F. C., Damiens, D., ... Van Bortel, W. (2015). Identification of Belgian mosquito species (Diptera: Culicidae) by DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources*, 15, 449–457. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12318>
- Wang, G., Li, C., Guo, X., Xing, D., Dong, Y., Wang, Z., ... Zhao, T. (2012). Identifying the main mosquito species in China based on DNA barcoding. *PLoS ONE*, 7, e47051. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047051>
- Weeraratne, T. C., Surendran, S. N., & Parakrama Karunaratne, S. H. P. (2018). DNA barcoding of morphologically characterized mosquitoes belonging to the subfamily Culicinae from Sri Lanka. *Parasites & Vectors*, 11, 266. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2810-z>
- Wilkerson, R. C., Linton, Y. M., Fonseca, D. M., Schultz, T. R., Price, D. C., & Strickman, D. A. (2015). Making mosquito taxonomy useful: A stable classification of tribe aedini that balances utility with current knowledge of evolutionary relationships. *PLoS ONE*, 10, e0133602. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133602>
- Wilkerson, R. C., Reinert, J. F., & Li, C. (2004). Ribosomal DNA ITS2 sequences differentiate six species in the *Anopheles crucians* complex (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 41, 392–401. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-41.3.392>
- Wilkerson, R. C., & Strickman, D. (1990). Illustrated key to the female Anopheline mosquitoes of Central America and Mexico. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 6, 7–34.
- Will, K. W., Mishler, B. D., & Wheeler, Q. D. (2005). The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. *Systematic Biology*, 54(5), 844–851. <https://doi.org/10.1080/10635150500354878>
- WRBU [Walter Reed Biosystematics Unit] (2018). *Systematic catalog of Culicidae*. Washington, DC: Smithsonian Institution. Retrieved from <http://www.mosquitocatalog.org/main.asp>

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

How to cite this article: Chan-Chable RJ, Martínez-Arce A, Mis-Avila PC, Ortega-Morales AI. DNA barcodes and evidence of cryptic diversity of anthropophilic mosquitoes in Quintana Roo, Mexico. *Ecol Evol*. 2019;9:4692–4705. <https://doi.org/10.1002/ece3.5073>

ESTUDIO 2

ARTÍCULO 2: New Distribution Record of *Aedes albopictus* in Quintana Roo, Mexico, and its Importance to Public Health.

SCIENTIFIC NOTE

NEW DISTRIBUTION RECORD OF *Aedes albopictus* IN QUINTANA ROO, MEXICO, AND ITS IMPORTANCE TO PUBLIC HEALTH

RAHUEL J. CHAN-CHABLE,¹ EDGARDO BALAM-POOT,² RAFAEL VÁZQUEZ-MARROQUÍN,¹
 ARELY MARTÍNEZ-ARCE,³ PEDRO C. MIS-AVILA² AND LUIS M. HERNÁNDEZ-TRIANA^{4,5}

ABSTRACT. *Aedes albopictus* is an important vector of several arboviruses that affect human health worldwide; thus, knowledge of its distribution is a key factor for the implementation of disease control strategies. In Mexico, *Ae. albopictus* was recorded for the first time in 1988 in Tamaulipas State (northeast), but currently it has been recorded in 14 of the 32 states in the country. In 2012, it was recorded for the first time in a single locality in Quintana Roo (Cancún). In this study, we provide new distribution information for *Ae. albopictus* in the center and south of Quintana Roo State and comment on its medical importance.

KEY WORDS *Aedes albopictus*, arbovirus, distribution, Mexico

Arboviruses are a challenge for humankind because of their potential to cause large disease outbreaks (Betancourt-Cravioto and Falcón Lezama 2020). For example, it is estimated that 96 million human cases and 40,000 deaths are reported annually due to dengue virus (DENV) (WHO 2020). In addition, chikungunya virus (CHIKV) has been recorded in more than 60 countries in Asia, Africa, Europe, and the Americas (WHO 2020). Other arboviruses, such as the yellow fever virus, are endemic in tropical and subtropical areas of Africa and Latin America, while several strains of Japanese encephalitis virus cocirculate in Asia, where more than 3 billion people are at risk of infection (WHO 2020). In Mexico, there were 41,505 cases of DENV, 9 cases of CHIKV, and 138 cases of Zika virus (ZIKV) in 2019 (DGE 2020). For Quintana Roo, there were 1,950 cases of DENV and 2 cases of ZIKV in 2019.

The main vector of these pathogens are mosquitoes belonging to the genera *Aedes* and *Haemagogus*. In countries within the African and European

continents, as well as in India, *Aedes albopictus* (Skuse) has been implicated as the main vector of DENV, CHIKV, and ZIKV (Paupy et al. 2012). In Latin America, *Ae. albopictus* is the secondary vector of DENV, CHIKV, and ZIKV (Medeiros et al. 2018). In Mexico, *Ae. aegypti* (L.) is the main vector of DENV, CHIKV, and ZIKV. However, *Ae. albopictus* has also been found to be infected with DENV and ZIKV in nature (Correa-Morales et al. 2019). Consequently, knowledge about the distribution of this species across the different states in Mexico is paramount for the public health authorities in order to establish the relevant control strategies. In Quintana Roo, *Ae. albopictus* was recorded for the first time in 2012 in the city of Cancún (Salomón-Grajales et al. 2012). More recently, it was found in Tulum City (130 km from Cancún) and Felipe Carrillo Puerto municipality (Ortega-Morales et al. 2018a). Based on morphological evidence, we report here new distribution records of *Ae. albopictus* in Quintana Roo State, southeastern Mexico (Fig. 1).

In June and July 2018, March and December 2019, and January 2020, 10 adult females of *Ae. albopictus* were collected with the use of Centers for Disease Control and Prevention light traps operating consecutively between 1800 h and 2400 h in 5 localities in the State of Quintana Roo: Dzulá, Chetumal, Petcacab, Nicolás Bravo, and Tihosuco (Table 1 and Fig. 1). All traps (2 traps per locality) were baited with CO₂ and hung at 40 cm above ground level. Specimens were killed using triethylamine vapors, labeled, and deposited in the Entomology Collection of the Zoology Museum of El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Chetumal Unit, Mexico, reference code ECO-CH-AR/DP_1698-1707. Morphological identification was performed using a stereomicroscope (Discovery V8; Zeiss, Jena, Germany), and the identification to species was done using the keys of Darsie and Ward (2005). *Aedes albopictus* specimens were collected in association

¹ Postgrado en Ciencias en Producción Agropecuaria, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna, Periférico Raúl López Sánchez y Carretera a Santa Fe, 27054 Torreón, Coahuila, Mexico.

² Departamento de Enfermedades Transmitidas por Vector y Zoonosis, Servicios Estatales de Salud de Quintana Roo, Avenida Chapultepec No. 267, Chetumal, Quintana Roo 77000, Mexico.

³ Departamento de Sistemática y Ecología Acuática, El Colegio de la Frontera Sur, Unidad Chetumal, Avenida del Centenario Km. 5.5, Chetumal, Quintana Roo 77900, Mexico.

⁴ Animal and Plant Health Agency, Virology Department, Rabies and Viral Zoonoses (V11), Building 52, Woodham Lane Addlestone, Surrey KT15 3NB, United Kingdom.

⁵ To whom correspondence should be addressed. Email: luis.hernandez-triana@apha.gov.uk.



Fig. 1. Distribution of *Aedes albopictus* in Quintana Roo, Mexico. The blue dots indicate previous records, and the red dots indicate records from the present study.

Table 1. Collection records of *Aedes albopictus* in Quintana Roo, Mexico.

Collection date	No. mosquitos	Location	County	Latitude (°N)	Longitude (°W)	Elevation (m.a.s.l.) ¹
July 11, 2018	2 females	Chetumal	Othón Pompeyo (P.) Blanco	18°31'17"N	88°18'13"W	14
June 01, 2018	2 female	Dzulá	Felipe Carrillo Puerto	19°36'27"N	88°24'48"W	27
March 01, 2019	1 female	Petcacab	Felipe Carrillo Puerto	19°17'23.4"N	88°13'27.6"W	25
December 14, 2019	3 females	Nicolás Bravo	Othón P. Blanco	18°25'12"N	88°55'14"W	150
January 07, 2020	2 females	Tihosuco	Felipe Carrillo Puerto	20°11'52.5"N	88°22'21"W	35

¹ m.a.s.l., meters above sea level.

with *Anopheles albimanus* Wiedemann, *Ae. euplocamus* Dyar and Knab, *Ae. fulvus* (Wiedemann), *Ae. taeniorhynchus* (Wiedemann), *Ae. aegypti*, *Haemagogus equinus* Theobald, and *Culex nigripalpus* Theobald.

Aedes albopictus was reported for the first time in Mexico in Tamaulipas State in 1988 (Francy et al. 1990), and since then, it rapidly has dispersed into almost all tropical and subtropical regions of the country (Ortega-Morales et al. 2018a). Currently, the distribution of *Ae. albopictus* extends over 14 states: Chiapas, Coahuila, Guerrero, Hidalgo, Mexico City, Morelos, Nuevo León, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz, and Yucatán (Francy et al. 1990; Ibáñez-Bernal and Martínez-Campos 1994; Pesina et al. 2001; Flisser et al. 2002; Casas-Martínez and Torres-Estrada 2003; Villegas-Trejo et al. 2010; Salomón-Grajales et al. 2012; Torres-Avenidaño et al. 2015; Ortega-Morales and Siller-Rodríguez 2016; Ortega-Morales et al. 2016, 2018a, 2018b; González-Acosta et al. 2019).

In Quintana Roo, *Ae. albopictus* was recorded for the first time in 2012 in the northern part of the state (Salomón-Grajales et al. 2012). Recently, it has been found in Tulum City and Felipe Carrillo Puerto municipality (Ortega-Morales et al. 2018a). In this study, *Ae. albopictus* individuals were collected in the rural localities of Dzúlá, Petcacab, and Tihosuco, confirming the establishment of this species in Felipe Carrillo Puerto municipality. We report for the first time its distribution in the urban area of Chetumal and the suburban areas of Nicolás Bravo, all belonging to the Othón Pompeyo Blanco municipality, in the southern part of Quintana Roo (Fig. 1). Because of the proximity of the Nicolás Bravo locality to the border with Campeche State to the east (less than 30 km), it is likely that the species might be present in this state and along the whole Yucatán Peninsula. Moreover, the high adaptability of *Ae. albopictus* to rural, semi-urban, and urban areas, in combination with the presence of *Ae. aegypti*, represents a threat to public health, possibly leading to increased incidence of dengue and Zika fever or other mosquito-borne diseases in the region (González-Acosta et al. 2019).

We thank Isaías Cauich Kúk, Walter Puc, Guillermo Escalante, Vanessa Contreras, and Gonzalo Pérez for their support during the fieldwork. Thanks are due to the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) Mexico for the Ph.D. scholarship (no. 726275) provided to Rahuel J. Chan-Chable. Luis M. Hernández-Triana would like to thank the Department for Environment, Food and Rural Affairs (DEFRA), Scottish government and Welsh government, United Kingdom, through SV3045 and European Union Framework Horizon 2020 Innovation Grant, European Virus Archive (EVAg, grant no. 653316) for funding. We also thank Holger Weissenberger for the map (Fig. 1), and Sean W. Prosser, Center for Biodiversity Genomics,

University of Guelph, Canada, for reviewing the manuscript.

REFERENCES CITED

- Betancourt-Cravioto M, Falcón Lezama JA. 2020. Arbovirus y salud pública. *Ciencia* 71:8–15.
- Casas-Martínez M, Torres-Estrada JL. 2003. First evidence of *Aedes albopictus* (Skuse) in southern Chiapas, Mexico. *Emer Infect Dis* 9:606–607.
- Correa-Morales F, González-Acosta C, Mejía-Zúñiga D, Huerta H, Pérez-Rentería C, Vázquez-Pichardo M, Ortega-Morales AI, Hernández-Triana LM, Salazar-Bueyes VM, Moreno-García M. 2019. Surveillance for Zika in Mexico: naturally infected mosquitoes in urban and semi-urban areas. *Pathog Glob Health* 113:309–314.
- Darsie RF, Ward RA. 2005. *Identification and geographical distribution of the mosquitoes of North America, north of Mexico*. Gainesville, FL: Univ. Press of Florida.
- DGE [Dirección General de Epidemiología]. 2020. *Boletín epidemiológico, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Sistema Único de Información* [Internet]. Ciudad de México, México: DGE [accessed March 8, 2020]. Available from: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/direccion-general-de-epidemiologia-boletin-epidemiologico>.
- Flisser A, Velasco-Villa A, Martínez-Campos C, González-Domínguez F, Briseño-García B, García R, Caballero-Servín A, Hernández-Monroy I, García-Lozano H, Gutiérrez-Cogco L, Rodríguez-Angeles G, López-Martínez I, Galindo-Virgen S, Vázquez-Campuzano R, Balandrano-Campos S, Guzmán-Bracho C, Olivo-Díaz A, de la Rosa JL, Magos C, Escobar-Gutiérrez A, Correa D. 2002. Infectious diseases in Mexico: a survey from 1955–2000. *Arch Med Res* 33:343–350.
- Francy DB, Moore CG, Eliason DA. 1990. Past, present and future of *Aedes albopictus* in the United States. *J Am Mosq Control Assoc* 1:127–132.
- González-Acosta C, Correa-Morales F, Canche-Aguilar I, Silva-Domínguez R, Salgado-Alonzo MC, Muñoz-Urías R, Salazar-Bueyes VM, Moreno-García M. 2019. First report of *Aedes albopictus* in Guerrero State, Mexico. *J Am Mosq Control Assoc* 35:285–287.
- Ibáñez-Bernal S, Martínez-Campos C. 1994. *Aedes albopictus* in Mexico. *J Am Mosq Control Assoc* 10:231–232.
- Medeiros AS, Costa DMP, Branco MSD, Sousa DMC, Monteiro JD, Galvao SPM, Azevedo PRM, Fernandes JV, Jeronimo SMB, Araújo JMG. 2018. Dengue virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in urban areas in the state of Rio Grande do Norte, Brazil: importance of virological and entomological surveillance. *PLoS One* 3:e0194108.
- Ortega-Morales AI, Bond G, Méndez-López R, Garza-Hernández JA, Hernández-Triana LM, Casas-Martínez M. 2018a. First record of invasive mosquito *Aedes albopictus* in Tabasco and Yucatan, Mexico. *J Am Mosq Control Assoc* 34:120–123.
- Ortega-Morales AI, Cueto-Medina SM, Siller-Rodríguez QK. 2016. First record of the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus* in Hidalgo State, Mexico. *J Am Mosq Control Assoc* 32:234–236.
- Ortega-Morales AI, Moreno-García M, González-Acosta C, Correa-Morales F. 2018b. Mosquito surveillance in Mexico: the use of ovitraps for *Aedes aegypti*, *Ae. albopictus*, and non-target species. *Fla Entomol* 101:623–626.

- Ortega-Morales AI, Siller-Rodríguez QK. 2016. First record of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in San Luis Potosí, Mexico. *J Vector Ecol* 41:314–315.
- Paupy C, Kassa Kassa F, Caron M, Nkoghé D, Leroy EM. 2012. A chikungunya outbreak associated with the vector *Aedes albopictus* in remote villages of Gabon. *Vector Borne Zoonotic Dis* 12:167–169.
- Pesina OH, Mercado R, Valdez-Rodríguez MA. 2001. *Aedes albopictus* in Allende City, Nuevo León, Mexico. *J Am Mosq Control Assoc* 17:260–261.
- Salomón-Grajales J, Lugo-Moguel GV, Tinal-Gordillo VR, de la Cruz-Velázquez J, Beaty BJ, Eisen L, Lozano-Fuentes S, Moore CG, García-Rejón JE. 2012. *Aedes albopictus* mosquitoes, Yucatan Peninsula, Mexico. *Emerg Infect Dis* 18: 525–527.
- Torres-Avendaño JI, Castillo-Ureta H, Torres-Montoya EH, Meza-Carrillo E, López-Mendoza RL, Vázquez-Martínez MG, Rendon-Maldonado JG. 2015. First record of *Aedes albopictus* in Sinaloa, Mexico. *J Am Mosq Control Assoc* 2:164–166.
- Villegas-Trejo A, Manrique-Saide P, Che-Mendoza A, Cruz-Canto W, Fernández MG, González-Acosta C, Dzúl-Manzanilla F, Huerta H, Arredondo-Jiménez JI. 2010. First report of *Aedes albopictus* and other mosquito species in Morelos, Mexico. *J Am Mosq Control Assoc* 3:321–323.
- WHO [World Health Organization]. 2020. *Vector-borne diseases—key facts* [Internet]. Geneva, Switzerland: World Health Organization [accessed March 7, 2020]. Available from: <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/vector-borne-diseases>.

ESTUDIO 3

ARTÍCULO 3: New Records and Updated Checklist of Mosquito Species in Quintana Roo, Mexico, Using DNA-Barcoding.

SCIENTIFIC NOTE

NEW RECORDS AND UPDATED CHECKLIST OF MOSQUITO SPECIES IN QUINTANA ROO, MEXICO, USING DNA-BARCODING

RAHUEL J. CHAN-CHABLE,^{1,2} ARELY MARTÍNEZ-ARCE,^{2,5} ALDO I. ORTEGA-MORALES³ AND PEDRO C. MISÁVILA⁴

ABSTRACT. Collections of mosquitoes were conducted as part of the entomological vector surveillance in Quintana Roo State, Mexico, during September 2015. Species collected included *Anopheles gabaldoni*, *An. darlingi*, *Psorophora columbiae*, *Culex infictus*, *Cx. trificus*, *Cx. lactator*, and *Wyeomyia guatemala* s.l. All the specimens were identified by morphological and molecular characters (DNA-barcoding). This is the 1st time these species are reported in the Mexican state of Quintana Roo. This research updates and increases the list of species of mosquitoes in Quintana Roo from 79 to 86.

KEY WORDS Mosquito updates, mosquito surveillance, new records, Quintana Roo

Culicidae is the most important group of insects worldwide from a medical and veterinary point of view; some species are vectors of pathogens that cause diseases which affect humans and domestic animals (Meisch 1994). Pathogens, like arboviruses, cause diseases such as dengue, Zika, chikungunya, yellow fever, West Nile virus, Mayaro fever, and Venezuelan equine encephalitis (Díaz-González et al. 2015). In tropical countries, diseases caused by mosquitoes are a priority in talking about health problems (Campos et al. 2017). In Quintana Roo State the last 4 years, the Secretary of State for Health has reported an average of 700 cases of patients with a mosquito-borne disease, including malaria, dengue, chikungunya, and Zika (DGE 2019). Consequently, knowledge about the distribution of the species with medical importance across the different states in Mexico has been useful for the public health authorities, in order to establish the relevant control strategies. Based on morphological and molecular evidence (DNA-barcoding), in Quintana Roo State are reported 7 new records: *Anopheles (Anopheles) gabaldoni* Vargas, *An. (Nyssorhynchus)*

darlingi Root, *Psorophora (Grabhamia) columbiae* (Dyar and Knab), *Culex (Culex) infictus* Theobald, *Cx. (Melanoconion) trificus* (Dyar), *Cx. (Phenacomyia) lactator* Dyar and Knab, and *Wyeomyia (Wyeomyia) guatemala* (Dyar and Knab) s.l. for the 1st time. In this research, the list of species that are distributed in the state of Quintana Roo has been updated (Table 1).

In September 2015, 324 adult female mosquitoes were collected, using the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) light traps that operated consecutively from 5:00 p.m. to 10:00 p.m. The traps were installed near the international border between Mexico and Belize in 3 locations (2 traps per location): Sacxan (18°27'52.76"N, 88°30'58.44"W; 18°27'44.61"N, 88°31'08.44"W), Palmar (18°26'43.0"N, 88°31'27.4"W; 18°26'26.9"N, 88°31'37.99"W), and Ramonal (18°25'27.7"N, 88°31'45.97"W; 18°25'08.1"N, 88°31'47.7"W). All traps were baited with CO₂ and hung at 40 cm above ground level. Additionally, mosquitoes were collected using manual aspirators while the collecting personnel were approaching. All specimens collected were deposited in the Entomology Collection of the Zoology Museum of El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal Unit, with reference code ECO-CH-AR/DP_0285-0611.

A stereomicroscope (Discovery V8; Zeiss, Jena, Germany) and identification keys of Clark-Gil and Darsie (1983) and Wilkerson and Strickman (1990) were used for taxonomic identification. For molecular analysis, DNA-barcoding region cytochrome *c* oxidase I was used. All selected specimens ($n = 18$) (Table 2) were processed according to previously reported protocols (Chan-Chable et al. 2019b). The 18 sequences obtained here were deposited in the BOLD Systems database (Ratnasingham and Hebert 2007) within the project "New Records of Culicids from Ribera del Rio Hondo Chetumal, Mexico" (Project code: NRC). Molecular analysis confirms the

¹ Postgrado en Ciencias en Producción Agropecuaria, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna, Periférico Raúl López Sánchez y Carretera a Santa Fe, 27054 Torreón, Coahuila, Mexico.

² Departamento de Sistemática y Ecología Acuática, El Colegio de la Frontera Sur, Unidad Chetumal, Avenida del Centenario Km. 5.5, 77900 Chetumal, Quintana Roo, Mexico.

³ Departamento de Parasitología, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna, Periférico Raúl López Sánchez y Carretera a Santa Fe, 27054 Torreón, Coahuila, Mexico.

⁴ Departamento de Enfermedades Transmitidas por Vector y Zoonosis, Servicios Estatales de Salud de Quintana Roo, Avenida Chapultepec No. 267, 77000 Chetumal, Quintana Roo, Mexico.

⁵ To whom correspondence should be addressed.

Table 1. Updated checklist of mosquito species of the Quintana Roo State.

Taxon
<i>Anopheles (Anopheles)</i>
1. <i>apicimacula</i> ¹
2. <i>atropos</i> ²
3. <i>bradleyi</i> ¹
4. <i>crucians</i> ³
5. <i>franciscanus</i> ⁴
6. <i>gabaldoni</i> ⁵
7. <i>neomaculipalpus</i> ⁴
8. <i>pseudopunctipennis</i> ¹
9. <i>punctimacula</i> ¹
10. <i>verustanei</i> ⁶
11. <i>vestitipennis</i> ¹
<i>Anopheles (Nyssorhynchus)</i>
12. <i>albimanus</i> ¹
13. <i>darlingi</i> ⁵
<i>Aedes (Georgecraigius)</i>
14. <i>epactius</i> ⁷
<i>Aedes (Howardina)</i>
15. <i>cozumelensis</i> ²
<i>Aedes (Ochlerotatus)</i>
16. <i>angustivittatus</i> ⁸
17. <i>bimaculatus</i> ²
18. <i>condolenscens</i> ⁸
19. <i>euplocamus</i> ⁴
20. <i>fulvus</i> ⁸
21. <i>infirmatus</i> ²
22. <i>scapularis</i> ²
23. <i>serratus</i> ⁸
24. <i>sollicitans</i> ²
25. <i>taeniorhynchus</i> ⁸
26. <i>tormentor</i> ⁸
27. <i>tortilis</i> ⁸
28. <i>trivittatus</i> ⁴
<i>Aedes (Protomacleaya)</i>
29. <i>podographicus</i> ⁴
<i>Aedes (Stegomyia)</i>
30. <i>aegypti</i> ⁸
31. <i>albopictus</i> ⁹
<i>Haemagogus (Haemagogus)</i>
32. <i>anastasionis</i> ⁷
33. <i>equinus</i> ⁷
<i>Psorophora (Grabhamia)</i>
34. <i>confinnis</i> Group ^{4,16}
35. <i>columbiae</i> ⁵
<i>Psorophora (Janthinosoma)</i>
36. <i>albipes</i> ^{10,11}
37. <i>champerico</i> ⁸
38. <i>cyanescens</i> ²
39. <i>ferox</i> ⁸
40. <i>lutzii</i> ⁸
<i>Psorophora (Psorophora)</i>
41. <i>ciliata</i> ²
42. <i>cilipes</i> ¹²
43. <i>lineata</i> ⁸
<i>Culex (Anodiopora)</i>
44. <i>restrictor</i> ⁴
<i>Culex (Culex)</i>
45. <i>chidesteri</i> ²
46. <i>coronator</i> Group ²
47. <i>declarator</i> ²
48. <i>inflictor</i> ⁵
49. <i>interrogator</i> ²
50. <i>nigripalpus</i> ²

Table 1. Continued.

Taxon
51. <i>quinquefasciatus</i> ²
52. <i>restuans</i> ²
53. <i>salinarius</i> ²
54. <i>tarsalis</i> ⁴
55. <i>thriambus</i> ²
<i>Culex (Melanoconion)</i>
56. <i>anips</i> ²
57. <i>conspirator</i> ⁴
58. <i>educator</i> ²
59. <i>erraticus</i> ²
60. <i>iolambdis</i> ²
61. <i>mutator</i> ¹³
62. <i>peccator</i> ²
63. <i>taeniopus</i> ²
64. <i>theobaldi</i> ¹²
65. <i>trifidus</i> ⁵
<i>Culex (Phenacomyia)</i>
66. <i>corniger</i> ²
67. <i>lactator</i> ⁵
<i>Deinocerites</i>
68. <i>cancer</i> ⁸
69. <i>pseudes</i> ²
<i>Coquillettidia (Rhynchotaenia)</i>
70. <i>nigricans</i> ²
71. <i>venezuelensis</i> ⁸
<i>Mansonia (Mansonia)</i>
72. <i>dyari</i> ⁴
73. <i>indubitans</i> ²
74. <i>titillans</i> ⁸
<i>Limatus</i>
75. <i>durhamii</i> ²
<i>Sabethes (Sabethes)</i>
76. <i>gymnothorax</i> ⁴
<i>Sabethes (Sabethoides)</i>
77. <i>chloropterus</i> ²
<i>Shannoniana</i>
78. <i>fluviatilis</i> ^{4,16}
<i>Trichoprosopon</i>
79. <i>digitatum</i> ¹⁴
<i>Wyeomyia (Wyeomyia)</i>
80. <i>celaenocephala</i> ⁸
81. <i>guatemala</i> s.l. ^{5,15}
82. <i>mitchellii</i> ²
83. <i>stonei</i> ²
<i>Toxorhynchites (Lynchiella)</i>
84. <i>moctezuma</i> ¹⁰
<i>Uranotaenia (Uranotaenia)</i>
85. <i>lowii</i> ²
86. <i>socialis</i> ⁴

¹ Vargas and Martínez-Palacios (1950).² Pletsch (1986).³ Vargas (1956).⁴ Ortega-Morales et al. (2010a).⁵ New state record.⁶ Vargas (1979).⁷ Ibáñez-Bernal et al. (1990).⁸ Vargas (1958).⁹ Salomón-Grajales et al. (2012).¹⁰ Mis Avila et al. (2013).¹¹ Chan-Chable et al. (2016).¹² Ortega-Morales et al. (2018).¹³ Ordóñez-Sánchez et al. (2013).¹⁴ Chan-Chable et al. (2019a).¹⁵ More specimens need to be added.¹⁶ Dubious record.

Table 2. Sampling locality of the species collected and processed in this study, number of sequences analyzed, and Barcode Index Number codes (BINs) assigned by BOLD Systems.

Mosquito species	<i>n</i> by sampling locality			Species processed (<i>n</i>)	Sequences (<i>n</i>)	BINs
	Sacxan	Palmar	Ramonal			
<i>Anopheles darlingi</i>	2		2	2	2	BOLD:AAA2442
<i>An. gabaldoni</i>	2		4	5	5	BOLD:AAN4188
<i>Culex inflicus</i>			2	2	2	BOLD:ADJ1860
<i>Cx. lactator</i>		1		1	1	BOLD:AAZ5281
<i>Cx. trinidadensis</i>	8	172	130	5	5	BOLD:ADE4670
<i>Psorophora columbiae</i>	1			1	1	BOLD:AAG3850
<i>Wyeomyia guatemala</i> s.l.	1		1	2	2	BOLD:ACA0979

identification of species and this study corresponds to the 7 new records (Table 2). The sequences of *An. gabaldoni* and *Cx. inflicus* are new to the GenBank database. Meanwhile, the sequences of *Cx. trinidadensis* have the Barcode Index Number: BOLD: ADE4670. This number was new for GenBank and BOLD Systems databases (Table 2).

Anopheles gabaldoni is reported in Guatemala, Belize, and southern Mexico (WRBU 2005). In Mexico, it had been previously recorded in the states of Veracruz, Tabasco, Chiapas, and Campeche (Vargas and Martínez-Palacios 1956, Ordóñez-Sánchez et al. 2013). In this study 6 adult females were collected: 2 specimens were from Sacxan and 4 from Ramonal.

Anopheles darlingi is distributed from some states of southern Mexico to northern Argentina, through the chain of the Andes and the coast of the Atlantic Ocean in South America (Hiwat and Bretas 2011). In Mexico, *An. darlingi* had been previously recorded in Chiapas, Tabasco, and Campeche (Kumm et al. 1943, Vargas and Martínez-Palacios 1956). *Anopheles darlingi* is considered the main vector of malaria in the Neotropical region by its susceptibility to *Plasmodium* species and its anthropophilic behavior (Hiwat and Bretas 2011, Campos et al. 2017). In this study, 2 adult specimens were collected at 2100 h, 10 m from the Río Hondo in Ramonal locality.

Psorophora columbiae has been reported in the Bahamas, Belize, Canada, the Cayman Islands, Cuba, Mexico, and the USA (Meisch 1994). The distribution of *Ps. columbiae* in Mexico includes the states of Campeche, Chiapas, Coahuila, Durango, Morelos, Nuevo Leon, San Luis Potosí, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz, and Yucatán (Martini 1935, Vargas 1956, Díaz-Nájera and Vargas 1973, Heinemann and Belkin 1977). Furthermore, this revision also shows a female of *Ps. columbiae* that was collected in CDC trap at 1800 h in Sacxan locality.

Culex inflicus has also been distributed in the Antilles, Barbados, Belize, Colombia, Costa Rica, Cuba, Dominica, El Salvador, Grenada, Guatemala, Honduras, Martinique, Mexico, Nicaragua, Panama, Trinidad and Tobago, and Venezuela (WRBU 2005). In Mexico, *Cx. inflicus* has been recorded in Colima, Veracruz, Jalisco, Guerrero, and Chiapas (Martínez-Palacios 1952, Díaz-Nájera and Vargas 1973,

Heinemann and Belkin 1977). *Culex inflicus* is a coastal species whose larvae develop in water in crab holes. The immature stages are commonly associated with *Deinocerites cancer* Theobald and *De. epitedeus* (Knab) (Martínez-Palacios 1952). The medical importance of *Cx. inflicus* is unknown. In this study, 2 females within a CDC trap were collected at 2100 h in Ramonal locality.

Culex trinidadensis has been scattered in Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Mexico, and Panama (WRBU 2005). In Mexico, *Cx. trinidadensis* has been recorded in the states of Guerrero, Michoacan, Morelos (Díaz-Nájera and Vargas 1973), Oaxaca (Heinemann and Belkin 1977), and in this study reported from Quintana Roo. The immature stages of *Cx. trinidadensis* develop in small bodies of water on the banks of rivers, as well as bodies of permanent water, with partial shade. Regularly, *Cx. trinidadensis* is associated with larvae of *An. argyritarsis* (Robineau-Desvoidy) and *Cx. coronator* (Dyar and Knab) (Heinemann and Belkin 1977, Clark-Gil and Darsie 1983). The medical importance of *Cx. trinidadensis* is unknown. Furthermore, this investigation displays that 310 females were collected in the 3 different localities (Table 2). All specimens were collected around 1800 and 2200 h at the located sites between 20 and 50 m from the Río Hondo.

Culex lactator has been dispersed in Belize, Colombia, Guatemala, Honduras, Mexico, Panama, and Venezuela (WRBU 2005). In Mexico, *Cx. lactator* has been recorded in the states of Chiapas, Hidalgo, Oaxaca, Tamaulipas, Veracruz, and Yucatán (Strickman and Pratt 1989, Ibáñez-Bernal and Martínez-Campos 1994, Zapata-Peniche et al. 2007, Ortega-Morales et al. 2015). In this investigation, an adult female was collected at 2000 h in Palmar.

Wyeomyia guatemala s.l. has been spread in Costa Rica, Guatemala, and Mexico (WRBU 2005). In Mexico, *Wy. guatemala* s.l. has been collected in the states of Chiapas, San Luis Potosí, Oaxaca, Tabasco, and Veracruz (Vargas 1956, Díaz-Nájera and Vargas 1973). Females have been collected in jungle areas and their larvae have been found in bromeliad axils (Vargas 1956). Likewise, 2 adult females were collected at 1600 h, resting on the collection personnel in the Sacxan and Ramonal localities, 20 m from the Río Hondo.

In Belize, the adjacent country, 112 mosquito species have been recorded (Pecor et al. 2002, Ortega-Morales et al. 2010b), of which 53 have not yet been recorded in Quintana Roo. Considering that the Quintana Roo State has a bigger area than Belize, 50,212 km² versus 22,800 km², respectively, and both regions bear similar environmental (urban, suburban, and wild) and climate conditions, it is predicted that there are still missing species to be recorded in Quintana Roo. The aforementioned highlights the necessity to increase the entomological studies of systematic collections, including stages of immature and adult mosquitoes from different biogeographic subregions, with different environments and different types of habitats.

We thank Edgardo Baalam, Gemma Macías, Irving Ramírez, and Nancy Cupul for the support during data collection trips. Our gratitude to Noemi Salas for the laboratory support, the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) Mexico for the PhD scholarship provided to Rael J. Chan-Chable, and the Red MEXBOL project no. 271108 for funding.

REFERENCES CITED

- Campos M, Conn JE, Peres-Alonso D, Vinetz JM, Emerson KJ, Martins Ribolla PE. 2017. Microgeographical structure in the major Neotropical malaria vector *Anopheles darlingi* using microsatellites and SNP markers. *Parasit Vectors* 10:76. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2014-y>
- Chan-Chable RJ, Bahena-Basave H, Vázquez-Marroquín R. 2019a. Nuevo registro de distribución para *Trichoprosopon digitatum* (Rondani) (Diptera: Culicidae) en Quintana Roo, México. *Rev Chil Entomol* 45:669–672.
- Chan-Chable RJ, Martínez-Arce A, Mis-Ávila PC, Ortega-Morales AI. 2019b. DNA barcodes and evidence of cryptic diversity of anthropophilic mosquitoes in Quintana Roo, Mexico. *Ecol Evol* 9:4692–4705.
- Chan-Chable RJ, Ortega-Morales AI, Martínez-Arce A. 2016. First record of *Psorophora albipes* in Quintana Roo, Mexico. *J Am Mosq Control Assoc* 32:237–240.
- Clark-Gil S, Darsie RF. 1983. The mosquitoes of Guatemala, their identification, distribution and bionomics. *Mosq Syst* 15:151–284.
- DGE [Dirección General de Epidemiología]. 2019. *Boletín Epidemiológico, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Sistema Único de Información* [Internet]. México DF, México: Dirección General de Epidemiología [accessed December 29, 2019]. Available from: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/direccion-general-de-epidemiologia-boletin-epidemiologico>.
- Diáz-González EE, Kautz TF, Dorantes-Delgado A, Malo-García IR, Laguna-Aguilar M, Langsjoen RM, Chen R, Auguste DI, Sánchez-Casas RM, Danis-Lozano R, Weaver SC, Fernández-Salas I. 2015. First report of *Aedes aegypti* transmission of chikungunya virus in the Americas. *Am J Trop Med Hyg* 93:1325–1329.
- Diáz-Nájera A, Vargas L. 1973. Mosquitos mexicanos, distribución geográfica actualizada. *Rev Invest Salud Pública* 33:111–125.
- Heinemann SJ, Belkin JN. 1977. Collection records of the project “Mosquitoes of Middle America” 9. Mexico (MEX, MF, MT, MX). *Mosq Syst* 9:483–535.
- Hiwat H, Bretas G. 2011. Ecology of *Anopheles darlingi* Root with respect to vector importance: a review. *Parasit Vectors* 4:177. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-177>
- Ibáñez-Bernal S, Canul O, Camal JF. 1990. Los dípteros de la reserva de la biosfera de Sian Ka’an, Quintana Roo, México. In: *Diversidad biológica de Sian ka’an, Quintana Roo, México*. Gainesville, FL: Centro de Investigaciones de Quintana Roo y Program for Studies in Tropical Conservation, Univ. of Florida. p 305–316.
- Ibáñez-Bernal S, Martínez-Campos C. 1994. Clave para la identificación de las larvas de mosquitos comunes en las áreas urbanas y suburbanas de la República Mexicana (Diptera: Culicidae). *Folia Entomol Mex* 92:43–73.
- Kumm HW, Bustamante ME, Herrera JR. 1943. Informe sobre algunos *Anopheles* hallados en la frontera de México y Guatemala. *Rev Inst Salub Enferm Trop* 4:183–187.
- Martínez-Palacios A. 1952. *Culex inflictus* Theobald y *Culex thriambus* Dyar, mosquitos nuevos para México (Diptera: Culicidae). *Rev Soc Mex Hist Nat* 13:89–95.
- Martini E. 1935. *Los mosquitos de México*. Boletines Técnicos 1. México D.F., México: Departamento de Salubridad Pública. 66 p.
- Meisch MV. 1994. The dark ricefield mosquito *Psorophora columbiae*. *Wing Beats* 5:8–9.
- Mis-Ávila PC, Canul Amaro GJ, Domínguez Galera MA. 2013. Taxonomic determination of mosquitoes (Culicinae: Culicidae) from the urban area of Chetumal, Quintana Roo. *Rev Salud QRoo* 6:8–13.
- Ordóñez-Sánchez F, Sánchez-Trinidad A, Mis-Ávila PC, Canul-Amaro G, Fernández-Salas I, Ortega-Morales AI. 2013. Nuevos registros de mosquitos (Diptera: Culicidae) en algunas localidades de Campeche y Quintana Roo. *Entomol Mex* 1:850–854.
- Ortega-Morales AI, Casas-Martínez M, Bond JG, Harbach RE. 2018. First records of *Psorophora ciliipes* and *Culex theobaldi* in Quintana Roo State, Mexico. *J Am Mosq Control Assoc* 34:124–127.
- Ortega-Morales AI, Mis-Ávila P, Elizondo-Quiroga A, Harbach RE, Siller-Rodríguez QK, Fernández-Salas I. 2010a. The mosquitoes of Quintana Roo State, Mexico (Diptera: Culicidae). *Acta Zool Mex (n.s.)* 26:33–46.
- Ortega-Morales AI, Mis-Ávila P, Domínguez-Galera M, Canul-Amaro G, Esparza-Aguilar J, Carlos-Azueta J, Fernández-Salas I. 2010b. First record of *Stegomyia albopicta* [*Aedes albopictus*] in Belize. *Southwest Entomol* 35:197–199.
- Ortega-Morales AI, Zavortink TJ, Huerta-Jiménez H, Sánchez-Ramos FJ, Valdéz-Pérezgasca T, Reyes-Villanueva F, Siller-Rodríguez QK, Fernández-Salas I. 2015. Mosquito records from Mexico: the mosquitoes (Diptera: Culicidae) of Tamaulipas State. *J Med Entomol* 52:171–184.
- Pecor JE, Harbach RE, Peyton EL, Roberts DR, Rejman-kova E, Manguin S, Palanko J. 2002. Mosquito studies in Belize, Central America: records, taxonomic notes, and a checklist of species. *J Am Mosq Control Assoc* 18:241–276.
- Pletsch DJ. 1986. A comparison of faunal list of mosquito species in Florida, in Cuba and in the state of Quintana Roo, Yucatan peninsula, Mexico. *J Fla Anti-Mosq Assoc* 57:29–32.

- Ratnasingham S, Hebert PDN. 2007. BOLD: the Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Mol Ecol Notes* 7:355–364.
- Salomón-Grajales J, Lugo-Moguel GV, Tinal-Gordillo VR, de La Cruz-Velazquez J, Beaty BJ, Eisen L, Lozano-Fuentes S, Moore CG, Garcia-Rejon JE. 2012. *Aedes albopictus* mosquitoes, Yucatan Peninsula, Mexico. *Emerg Infect Dis* 18:525–527.
- Strickman D, Pratt J. 1989. Redescription of *Cx. corniger* Theobald and elevation of *Culex (Culex) lactator* Dyar and Knab from synonymy based on specimens from Central America (Diptera: Culicidae). *Proc Entomol Soc Wash* 91:551–574.
- Vargas DL. 1956. Especies y distribución de mosquitos mexicanos no Anofelinos (Insecta, Diptera). *Rev Inst Salub Enf Trop* 16:19–36.
- Vargas DL. 1958. Nuevos datos sobre la distribución de anofelinos mexicanos. *Bol Epidemiol* 22:33–45.
- Vargas DL. 1979. *Anopheles (Anopheles) veruslanei* Vargas, n. sp. (Diptera: Culicidae). *Gaceta Méd Méx* 115:87–88.
- Vargas L, Martínez-Palacios A. 1950. *Estudio taxonómico de los mosquitos Anofelinos de México*. México DF, México: Secretaría de Salubridad y Asistencia.
- Vargas L, Martínez-Palacios A. 1956. *Anofelinos mexicanos. Taxonomía y distribución*. México DF, México: Secretaría de Salubridad y Asistencia, Comisión Nacional para la Erradicación del Paludismo.
- Wilkerson RC, Strickman D. 1990. Illustrated key to the female Anopheline mosquitoes of Central America and Mexico. *J Am Mosq Control Assoc* 6:7–34.
- WRBU [Walter Reed Biosystematics Unit]. 2005. *Systematic catalog of Culicidae* [Internet]. Suitland, MD: Walter Reed Biosystematics Unit [accessed April 30, 2020]. Available from: <http://www.mosquitocatalog.org>.
- Zapata-Peniche A, Manrique-Saide P, Rebollar-Téllez EA, Che-Mendoza A, Dzul-Manzanilla F. 2007. Identificación de larvas de mosquitos (Diptera: Culicidae) de Mérida, Yucatán, México y sus principales criaderos. *Rev Bioméd* 18:3–17.

ESTUDIO 4

ARTÍCULO 4: Código de Barras de ADN y nuevos registros de culícidos en la ciudad fronteriza de Chetumal, México.

Código de Barras de ADN y nuevos registros de culicidos en la ciudad fronteriza de Chetumal, México

DNA Barcodes and new records of culicids in the border city Chetumal, Mexico

Rahuel J. Chan-Chable^{1,2}

<https://orcid.org/0000-0002-3418-742X>

rahuel_jere_1990@hotmail.com

Arely Martínez-Arce^{2,*}

<https://orcid.org/0000-0002-8482-372X>

armartarce@ecosur.mx

Luis M. Hernández-Triana³

<https://orcid.org/0000-0002-6882-0393>

luis.hernandez-triana@apha.gov.uk

1. Postgrado en Ciencias en Producción Agropecuaria, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna, Periférico Raúl López Sánchez y Carretera a Santa Fe, 27054 Torreón, Coahuila, México.
2. Departamento de Sistemática y Ecología Acuática, El Colegio de la Frontera Sur, Unidad Chetumal, Avenida del Centenario Km. 5.5, 77900 Chetumal, Quintana Roo, México.
3. Animal and Plant Health Agency, Virology Department, Rabies and Viral Zoonoses (VII), Building 52, Woodham Lane Addlestone, Surrey, KT15 3NB, UK.

* Correspondencia

Resumen

Debido a la importancia médica que tienen algunas especies de culicidos, su identificación precisa es el primer paso para establecer un programa de vigilancia de vectores y prevenir la transmisión y proliferación de patógenos. Para la identificación de la fauna de culicidos en la ciudad de Chetumal se combinaron datos morfológicos y moleculares (Código de Barras de ADN) para delimitar 22 especies y detectar especies crípticas. Se colectaron un total de 866 hembras adultas pertenecientes a siete géneros y 22 morfoespecies. Para los datos moleculares, el método ABGD identificó 20 entidades, mientras que el análisis del Sistema BIN identificó 30. Distancias intraespecíficas altas ($K2P > 2.2\%$) fueron observadas en *Anopheles albimanus* (3.90%), *Aedes cozumelensis* (3.40%), *Ae. serratus* (2.80%), *Haemagogus equinus* (2.50%), *Cx. erraticus* (2.70%) y *Li. durhamii* (4.80%). En *Culex erraticus* y *Cx. theobaldi* se observó una distancia interespecífica promedio $< 2.0\%$ (1.40%). *Culex eastor* es reportado por primera vez para el estado de Quintana Roo. Nuestro estudio enfatiza la importancia de involucrar diferentes herramientas para la correcta identificación de las especies. El constante descubrimiento de especies crípticas refleja la existencia de una diversidad de culicidos mayor a la estimada, lo cual repercute directamente en la vigilancia

y control epidemiológico de cualquier programa de especies trasmisoras de enfermedades. Recomendamos el monitoreo constante en localidades donde existe un constante movimiento de personas de otros países, como ocurre en la ciudad de Chetumal.

Abstract

Due to the medical importance of some Culicidae species, their precise identification is the first step to establish a vector surveillance program and prevent the transmission and proliferation of pathogens. For the identification of the Culicidae fauna in the Chetumal city, morphological and molecular data (DNA-barcoding) were combined to delimit 22 species and detect cryptic species. A total of 866 adult females belonging to seven genera and 22 morphospecies were collected. In molecular data, the ABGD method identified 20 entities, while the BIN System analysis identified 30. High intraspecific distances ($K2P > 2.2\%$) were observed in *Anopheles albimanus* (3.90%), *Aedes cozumelensis* (3.40%), *Ae. serratus* (2.80%), *Haemagogus equinus* (2.50%), *Cx. erraticus* (2.70%) and *Li. durhamii* (4.80%). In *Cx. erraticus* and *Cx. theobaldi* an average interspecific distance $< 2.0\%$ (1.40%) was observed. *Culex eastor* is reported for the first time for the state of Quintana Roo. Our study emphasizes the importance of involving different tools for correct species identification. The discovery of cryptic species reflects the existence of a higher diversity in culicids than it is estimated. The above has a direct impact on the surveillance and epidemiological control of any vector borne disease program. We recommend monitoring of regions, where there is a constant movement of people from other countries such as Chetumal's city.

Palabras clave: Diversidad críptica, Culicidae, vigilancia entomológica, México, vectores.

Keywords: Cryptic diversity, Culicidae, entomological surveillance, Mexico, vectors.

Contribución de los autores / Authors' contribution:

RJCC: Colecta de campo, identificación taxonómica y análisis de distancias genéticas. AMA: obtención de las secuencias genéticas y su análisis. LMHT: Revisión y correcciones al primer borrador del manuscrito. RJCC, AMA: Conceptualización. AMA, LMHT: Adquisición de fondos. Todos los autores contribuyeron al texto y aprobaron el manuscrito final.

Conflicto de intereses / Competing interests:

Los autores no incurrir en conflictos de intereses.

Fuentes de financiamiento / Funding:

Red MEXBOL no. de proyecto 271108, y la European Union Framework Horizon 2020 Innovation Grant, European Virus Archive (EVAg, grant no. 653316).

Introducción

Los culicidos (Diptera: Culicidae) son un grupo de insectos ampliamente estudiados debido a su papel como vectores de patógenos que causan enfermedades en humanos y animales domésticos (Rozo-López & Mengual 2015, Rueda & Alarcón-Elbal 2020). Algunas especies como *Aedes (Stegomyia) aegypti* L. y *Ae. (Stg.) albopictus* Skuse son vectores del virus del Chikungunya, Dengue y Zika en varias regiones del mundo (Medeiros et al. 2018). *Anopheles (Nyssorhynchus) albimanus* Wiedemann, *An. (Ano.) pseudopunctipennis* Theobald y *An. (Ano.) vestitipennis* Dyar y Knab son considerados los principales vectores de malaria en México (Villarreal-Treviño et al. 2020). A nivel mundial se han descrito 3583 especies clasificados en 41 géneros (WRBU 2005), para México se registran alrededor de 250 especies, pertenecientes a 20 géneros (Chan-Chable et al. 2019a, Hernández-Amparan et al. 2020), para el estado de Quintana Roo se han registrado 86 especies pertenecientes a 15 géneros (Chan-Chable et al. 2020b), y específicamente para la ciudad de Chetumal, sólo se han reportado 23 especies dentro de 6 géneros (Vargas & Martínez-Palacios 1956, Mis Ávila et al. 2013, Chan-Chable et al. 2016, 2018a, 2019b, 2020a).

Aunque los culicidos se han estudiado más que otros grupos de insectos vectores, su conocimiento taxonómico está lejos de ser completo (Delgado-Serra et al. 2020). La identificación de especies, en su mayoría, es por el método tradicional basado en la morfología (Ashfaq et al. 2014, Versteirt et al. 2015), pero este método regularmente presenta limitaciones, como: caracteres diagnósticos dañados durante la recolección, almacenamiento inadecuado de los especímenes que propician la pérdida de caracteres y el no poder observar los caracteres diagnósticos en todas las etapas de su desarrollo (Wang et al. 2012, Talaga et al. 2017, Weeraratne et al. 2018). Además, la presencia de complejos de especies y especies crípticas reveladas mediante herramientas moleculares (Ruiz-López et al. 2012, Ashfaq et al. 2014, Chan-Chable et al. 2019a), en especies dentro de los géneros *Anopheles*, *Aedes*, *Haemagogus*, *Psorophora*, *Culex* y *Culiseta* (Cywinska et al. 2006, Kumar et al. 2007, Wang et al. 2012, Linton et al. 2013, Engdahl et al. 2014, Ashfaq et al. 2014, Chan et al. 2014, Gunay et al. 2015, Hoyos-Lopez et al. 2015, Versteirt et al. 2015, Batovska et al. 2016, Talaga et al. 2017, Weeraratne et al. 2018, Chan-Chable et al. 2019a, Hernández-Triana et al. 2019, Ruiz-Arrondo et al. 2019, 2020) ponen de manifiesto que la diversidad real de culicidos está lejos de ser completada.

Durante los últimos 15 años, el uso de herramientas moleculares (ADN) como el “Código de barras de ADN” (CB-ADN) usando el gen Citocromo Oxidasa Subunidad I (COI) como marcador molecular, ha dado la pauta para incluir esta herramienta en todos los estudios de identificación de culicidos en diversas regiones del mundo. A la fecha, con los CB-ADN se ha logrado la identificación molecular de 1590 especies de culicidos (<http://www.boldsystems.org>), lo que corresponde a un 44.38 % de su riqueza específica conocida. El uso combinado del ADN y la morfología permite una identificación más precisa en la identificación de vectores y la detección de su diversidad genética (Ruiz-Arrondo et al. 2020, Delgado-Serra et al. 2020). En México, el CB-ADN se ha utilizado para confirmar la presencia de nueve especies de culicidos, *Psorophora (Janthinosoma) albipes* (Theobald), *An. (Ano.) veruslanei* Vargas, *An. (Ano.) gabaldoni* Vargas, *An. (Nys.) darlingi* Root, *Ps. (Grabhamia) columbiae* (Dyar y Knab), *Culex (Culex) inflictus* Theobald, *Cx. (Melanoconion) trifidus* (Dyar), *Cx. (Phenacomylia) lactator* Dyar y Knab, y *Wyeomyia (Wyeomyia) guatemala* (Dyar y Knab) s.l., en el estado de Quintana Roo (Chan-Chable et al. 2016, 2018b, 2020b); también se ha utilizado para apoyar la evidencia de diversidad críptica dentro de ocho especies, *An. (Ano.) apicimacula* Dyar y Knab, *An. (Ano.) crucians* s.l. Wiedemann, *Ae. (Ochlerotatus) serratus* Theobald, *Ae. (Och.) taeniorhynchus* (Wiedemann), *Haemagogus*

(*Haemagogus equinus* Theobald, *Ps. (Jan.) ferox* von Humboldt, *Cx. (Mel.) erraticus* Dyar y Knab, y *Cx. (Mel.) taeniopus* Dyar y Knab (Chan-Chable et al. 2018a, 2019a) y, recientemente para confirmar la presencia de *Mansonia (Mansonia) dyari* Belkin, Heinemann, y Page, *Ae. (Howardina) guatemala* Berlin, *Ae. (Protomacleaya) insolitus* (Coquillett), *Limatus asulleptus* (Theobald) y *Trichoprosopon pallidiventer* (Lutz) en el territorio mexicano (Hernández-Guevara et al. 2020, Hernández-Triana et al. 2021).

Diversos estudios han demostrado la relación entre enfermedades arbovirales y los flujos migratorios de personas (Romaña et al. 2003, Mora-Covarrubias et al. 2010, Arredondo-García et al. 2016, 2020). Los movimientos migratorios en la frontera sur de México influyen, en gran medida, en la incidencia de casos de chikungunya, dengue y paludismo la cual termina extendiéndose al resto del país (SSA 2001, Arredondo-García et al. 2020). Por su ubicación fronteriza, Chetumal es catalogada como un punto de llegada de migrantes, en su paso hacia Estados Unidos, provenientes de diversos lugares de Centroamérica, zonas consideradas endémicas de dengue y paludismo (SSA 2001). Lo anterior recalca la importancia de realizar estudios encaminados a la detección temprana de la presencia de vectores en ciudades fronterizas como es la ciudad de Chetumal (Mora-Covarrubias et al. 2010, Sinti-Hesse et al. 2019).

El funcionamiento óptimo de los programas de vigilancia y monitoreo para el control de vectores en ciudades con alta incidencia de migrantes, dependen principalmente de la correcta identificación de las especies (Wang et al. 2012, Ruiz-Arrodo et al. 2019). Por lo que, los objetivos de este estudio fueron: 1) identificar las especies de culícidos en la ciudad fronteriza de Chetumal mediante taxonomía tradicional (morfología de hembras adultas) y CB-ADN; 2) delimitar las especies de culícidos utilizando los métodos ABGD y Sistema BIN; y 3) contribuir a las bases de datos moleculares (GenBank y BOLD) con nuevas secuencias de ADN para aumentar la lista de especies de culícidos existentes en México.

Material y métodos

Colecta e identificación de culícidos.— Los mosquitos (hembras) fueron colectados durante octubre de 2013 en cuatro sitios estratégicos de la Ciudad de Chetumal: Sabana (18°31'7.5''N–88°21'6.04''W), Parque Ecológico (18°30'25.4''N–88°19'13.0''W), Bahía (18°29'46.03''N–88°18'55.26''W) y El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR) (18°32'35.0''N–88°15'43.9''W) (Fig. 1). Los sitios fueron seleccionados por la abundancia de individuos, vegetación presente, ubicación y accesibilidad. Los sitios Sabana, Parque Ecológico y ECOSUR corresponden a parches de vegetación secundaria, las especies vegetales más abundantes en estos sitios son: *Metopium brownei* (Jacq.) Urban, *Sideroxylon salicifolium* (L.) A. DC., *Lysiloma latisiliquum* (L.) Benth, *Bursera simaruba* (L.) Sarg, *Cecropia peltata* L., y *Piscidia piscipula* (L.) Sarg. El sitio Bahía es un área que presenta suelos regularmente inundados y está cubierto por vegetación de manglar, siendo *Rhizophora mangle* la especie más abundante. Otras especies vegetales observadas con menor presencia en este sitio son: *Avicennia germinans* (L.) L., *Laguncularia racemosa* (L.) C.F. Gaertn., y *Conocarpus erectus* L. Para la colecta de los especímenes se utilizaron trampas de luz tipo CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (2 trampas por sitio) con operación consecutiva de 18:00 hrs a 24:00 hrs. Todas las trampas fueron cebadas con CO₂ y colgadas a 40 cm sobre el nivel del suelo. Se realizaron cuatro colectas por sitio de muestreo, una colecta por semana. Todos los especímenes colectados fueron sacrificados en frascos de vidrio que contenían vapor de acetato de etilo (Chan-Chable et al. 2019a), posteriormente transportados al Museo de

Zoología de El Colegio de la Frontera sur (ECOSUR), Unidad Chetumal, para ser clasificados y montados.

Extracción de ADN, Amplificación por PCR y secuenciación.- Para el análisis molecular se procesaron 127 especímenes que representan 22 morfoespecies. La extracción y amplificación del ADN se realizó siguiendo el protocolo publicado en Cywinska et al. (2006) e Ivanova et al. (2006). Para la amplificación del gen COI-5' se utilizaron tres pares de cebadores, LCO1490/HCO2198, dgLCO-1490/dgHCO-2198 y LCO1490_t1/HCO2198_t1 (Folmer et al. 1994, Meyer 2003, Footitt et al. 2009), con el siguiente programa de termociclado: desnaturalización inicial de 1 min a 94 °C, seguido por cinco ciclos de 94 °C durante 40 s, 45 °C durante 40 s, y 72 °C durante 1 min, posteriormente 35 ciclos de 94 °C durante 40 s, 51 °C durante 40 s, y 72 °C durante 1 min y una extensión final a 72 °C durante 5 min. Los 107 amplicones exitosos fueron enviados para secuenciación bidireccional, al Canadian Center for DNA Barcoding (CCDB) y al Laboratorio de Secuenciación Genómica del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Se utilizó un secuenciador ABI 3730 XL (ABI, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) y el Kit de Secuenciación de Ciclos BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Foster, CA, USA). Las secuencias obtenidas fueron ensambladas y editadas usando el programa Codon Code Aligner v 5.0.1.

Análisis de secuencias.- Las secuencias fueron analizadas y comparadas con secuencias de culicidos disponibles en BOLD Systems® usando la herramienta "Identification Engine" y con secuencias disponibles en GenBank con "Basic Local Alignment Search Tool" (BLAST). Para el alineamiento de las secuencias se usó el algoritmo ClustalW, y el cálculo de las distancias genéticas intra- e interespecíficas se realizó en el programa MEGA versión X (Kumar et al. 2018) usando el modelo de distancias Kimura 2 Parámetros (K2P) (Kimura 1980). El árbol de similitud con distancias K2P fue construido con el modelo Neighbor-Joining (NJ) con valores de soporte (Bootstrap) calculados con 1000 réplicas (Laurito et al. 2013, Rozo-López & Mengual 2015, Chanchable et al. 2019a). Para la construcción del árbol (NJ) se añadieron 73 secuencias públicas de alta calidad recuperadas de BOLD, perteneciente a 13 especies colectadas en otras regiones geográficas de México y Centroamérica (Información suplementaria Tabla S1). Además, se añadieron 14 secuencias de especímenes colectados en un área de estudio cercana a la ciudad de Chetumal, las cuales pertenecen a siete especies (Información suplementario Tabla S1).

Delimitación molecular de entidades.- Para delimitar las Unidades Taxonómicas Operativas Moleculares (UTOM), se utilizaron los métodos Sistema Barcode Index Number (BIN) incluyendo todas las secuencias (Ratnasingham & Hebert 2013) y el método Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) (Puillandre et al. 2012) con los siguientes parámetros: distancia intraespecífica mínima (Pmin) de 0.001, distancia intraespecífica máxima (Pmax) de 0.0220, amplitud relativa de gap (X) de 1.1 y los modelos evolutivos JC69 (Jukes-Cantor) y K2P (Jukes & Cantor 1969, Kimura 1980), para este análisis se excluyeron las secuencias únicas (singletons).

Resultados

Identificación morfológica.- Se colectaron 866 hembras adultas pertenecientes a dos subfamilias (Anophelinae y Culicinae), tres tribus (Aedini, Culicini y Sabethini), siete géneros (*Anopheles*, *Aedes*, *Haemagogus*, *Psorophora*, *Culex*, *Limatus* y *Wyeomyia*) y 12 subgéneros (*Anopheles*, *Nyssorhynchus*, *Howardina*, *Ochlerotatus*, *Protomacleaya*, *Stegomyia*, *Haemagogus*,

Janthinosoma, *Psorophora*, *Culex*, *Melanoconion* y *Wyeomyia*). Morfológicamente se identificaron 22 morfoespecies (Tabla 1) solo una fue identificada a nivel de género (*Wyeomyia* sp.) debido a que presentó algunos caracteres dañados.

Todos los especímenes colectados fueron depositados en la colección entomológica del Museo de Zoología de ECOSUR, Unidad Chetumal, con los códigos de referencia ECO-CH-AR/DP_0001-0866. La identificación fue basada en las claves taxonómicas de Clark-Gil y Darsie (1983) y Wilkerson et al. (1990). Para tener respaldos fotográficos, imágenes de los ejemplares de todas las especies identificadas fueron capturadas en vista lateral y dorsal, las imágenes junto con la información de los datos de colecta están depositados en la base de datos BOLD Systems® (www.boldsystems.org) (Ratnasingham & Hebert 2007) dentro del proyecto “Culicids of Chetumal Mexico” (Código: CUL). La ubicación y clasificación taxonómica utilizada en este estudio está basada en el Systematic Catalog of Culicidae del Walter Reed Biosystematics Unit (<http://www.wrbiu.org>).

El género *Aedes* fue el mejor representado con ocho especies, mientras que *Haemagogus* y *Limatus* solo fueron representados con una especie (Tabla 1). La localidad Sabana fue el sitio con el mayor número de especies (n = 14), mientras que Parque Ecológico presentó el menor número (n = 7). Para *Ae. taeniorhynchus* se colectaron 255 especímenes, siendo esta la especie con mayor número de ejemplares en este estudio, seguido por *Cx. taeniopus* y *Ps. ferox* con 192 y 148 especímenes, respectivamente. *Aedes taeniorhynchus* y *Ps. ferox* estuvieron presentes en todos los sitios muestreados y con mayor presencia en las localidades Parque Ecológico y ECOSUR (Tabla 1).

Nuevos registros.- Hasta el 2019 se reportaban 23 especies de culicidos en la ciudad de Chetumal (Vargas & Martínez-Palacios 1956, Mis Ávila et al. 2013, Chan-Chable et al. 2016, 2018a, 2019b, 2020a). En este estudio se reportan 12 nuevos registros confirmados con CB-ADN, por lo que para la ciudad de Chetumal se reporta un total de 35 especies de Culicidae (Tabla S2). Dentro de los nuevos registros, la especie *Cx. eastor* es un nuevo registro estatal, con este registro la lista de culicidos presentes en Quintana Roo alcanza un total de 87 especies (Chan-Chable et al. 2020b).

Código de barras de ADN.- Para los 127 especímenes procesados se obtuvieron 94 secuencias de COI, solo fueron descartadas ocho secuencias por no cumplir con la calidad óptima. Las 94 secuencias obtenidas se depositaron en la base de datos BOLD Systems® (Ratnasingham & Hebert 2007) con los siguientes identificaciones de proceso (ID): CUL001-13, CUL003-13 a CUL012-13, CUL018-13, CUL020-13, CUL023-13, CUL025-13, CUL026-13, CUL028-13 a CUL031-13, CUL033-13, CUL035-13, CUL037-13, CUL040-13, CUL041-13, CUL045-13 a CUL049-13, CUL051-13, CUL053-13 a CUL055-13, CUL058-13 a CUL072-13, CUL076-13 a CUL081-13, CUL083-13, CUL084-13, CUL087-13, CUL089-13 a CUL091-13, CUL093-13 a CUL116-14, CUL118-14, CUL120-14 a CUL125-14.

Las 22 especies identificadas morfológicamente están representadas con su correspondiente código de barras de ADN, el tamaño del fragmento amplificado fue entre 498-669 pares de bases (pb) (Tabla 2). El análisis de similitud entre las secuencias obtenidas en este estudio y la base de datos BOLD Systems® mostró que 21 de las 22 especies presentaron una similitud de 99–100% con secuencias con específicas, mientras que en Genbank se observó un 98.5–100% de identidad para 21 especies. Las secuencias obtenidas en este estudio para la especie *Cx. nigripalpus* mostraron una identificación ambigua en ambas bases de datos.

Distancia genética.- En este estudio, la distancia genética promedio (K2P) intra e interespecífica fue 0.76 % y 13.1 %, respectivamente. En *Ae. fulvus* se observó una distancia intraespecífica (K2P) promedio > 2 % (2.9 %) (Tabla 2). Para *Cx. erraticus* y *Cx. theobaldi*, se observó una distancia interespecífica promedio de 1.4 %.

Árbol Neighbor-joining.- La mayoría de las especies formaron grupos bien definidos con altos valores de Bootstraps (99–100 %) en el árbol NJ (Fig. 2). Las ramas principales del árbol NJ representaron diferentes grupos taxonómicos como tribus y géneros. Las secuencias obtenidas de BOLD para *An. veruslanei*, *Ae. angustivittatus*, *Ae. euplocamus*, *Ae. aegypti*, *Ps. albipes*, y *Wy. celaenocephala* formaron grupos bien definidos con las secuencias generadas en este estudio, las ramas fueron soportadas con valores altos de Bootstrap (99–100 %) (Fig. 2).

Para las especies *Cx. erraticus* y *Cx. theobaldi* se observó un mismo grupo soportado con altos valores de Bootstrap (99 %). En el grupo formado para *Cx. erraticus*, se observó un segundo grupo para las secuencias MRRO301-17 y MRRO302-17 (Fig. 2). Mientras que en *Ae. fulvus* se observaron grupos divergentes (Fig. 2). Para *Hg. equinus* también se formaron dos grupos soportados por valores altos de Bootstrap (100 %). Lo mismo ocurrió para *Ae. cozumelensis*, y para *An. albimanus* donde se observaron tres grupos, dos de estos mostraron altos valores de Bootstrap (> 80 %). Finalmente, para *Li. durhamii* también se observa un grupo más para la especie.

Delimitación de entidades.- El método ABGD delimitó un total de 20 Unidades Taxonómicas Operativas Moleculares (UTOMs) para 22 morfoespecies. *Psorophora ferox*, *Ps. albipes* y *Ps. lutzii* fueron asignados a una misma UTOM, al igual que *Cx. erraticus* y *Cx. theobaldi*. Para *Hg. equinus* ABGD asignó dos diferentes UTOMs. Por otro lado, el método BINs de BOLD Systems, delimitó 30 BINs (Tabla 2). En este análisis *Cx. erraticus* y *Cx. theobaldi* compartieron el mismo BIN (BOLD:AAG3848), mientras que *An. albimanus* fue dividido en dos diferentes BINs (BOLD:ADU8918 y BOLD:AAA3068), al igual que *Ae. fulvus* (BOLD:ACN9154 y BOLD:ACC4605), *Ae. serratus* (BOLD:ACN3711 y BOLD:ACN8188) y *Hg. equinus* (BOLD:ACN9157 y BOLD:ACN9156) (Tabla 2).

Discusión

Distribución de culicidos en Chetumal.- De las 23 especies previamente registradas, se confirma la presencia de nueve de ellas (*An. albimanus*, *Ae. angustivittatus*, *Ae. fulvus*, *Ae. serratus*, *Ae. taeniorhynchus*, *Ae. aegypti*, *Ps. albipes*, *Ps. ferox* y *Cx. nigripalpus*) con análisis moleculares. De los nuevos registros, la especie *Cx. eastor* es señalada con una amplia distribución desde el sur de México hasta Brasil (WRBU 2005), aunque en el territorio mexicano sólo había sido reportada para el estado de Tabasco (Vargas 1956), Campeche (Abella-Medrano et al. 2020) y Chiapas (Hernández-Triana et al. 2021). En este estudio se colectó una hembra adulta mediante trampas de luz tipo CDC, cebadas con CO₂, la colecta fue en un área de vegetación secundaria en la periferia de la ciudad de Chetumal, se sugiere ampliar las localidades de muestreo para tener un mayor registro de ejemplares.

De la lista de especies reportadas en el presente estudio, siete son vectores importantes, pues se trata de patógenos que causan enfermedades en humanos (*An. vestitipennis*, *An. albimanus*, *Ae. taeniorhynchus*, *Ae. aegypti*, *Hg. equinus*, *Ps. ferox* y *Cx. nigripalpus*) (Fernández-Salas & Flores-Leal 1995, Santamarina Mijares et al. 1999, Ortiz et al. 2005, Vitek et al. 2008, Hirwat & Bretas

2011, Wiggins et al. 2018, Villarreal-Treviño et al. 2020). Y sobresalen *Ae. aegypti* por ser el principal vector de dengue, zika, chikungunya, fiebre amarilla y el virus Mayaro (Wiggins et al. 2018, Brady & Hay 2020), *An. albimanus* y *An. vestitipennis*, estos últimos por ser los principales vectores de malaria en México (Hiwat & Bretas 2011, Villarreal-Treviño et al. 2020). Lo anterior, demuestra la importancia de continuar con la vigilancia entomológica de estos vectores en la región y las ciudades aledañas.

Código de Barras de ADN y delimitación de especies.- Veintiséis de las 27 especies identificadas morfológicamente, mostraron correspondencia entre la morfología y los datos moleculares. Considerando todos los criterios para delimitar especies en este estudio, reportamos un total de 33 entidades taxonómicas que incluye 27 morfoespecies bien delimitadas, dos especies crípticas para *An. albimanus*, y una especie críptica para *Ae. cozumelensis*, *Hg. equinus* y *Cx. erraticus*. Para el caso de *Ae. fulvus* se observaron dos linajes, dicha especie comprende dos subespecies, *Ae. fulvus fulvus* (Wiedemann) y *Ae. fulvus pallens* (Ross) (Harbach 2021), por sus características morfológicas y distribución los especímenes colectados en Chetumal probablemente corresponden a *Ae. fulvus fulvus*, mientras que las secuencias recuperadas de BOLD de especímenes de Florida corresponden a *Ae. fulvus pallens*. *Aedes serratus* mostró una distancia > 2.2 % con especímenes conoespecíficos, sin embargo, es necesario incluir más secuencias debido a que solo se obtuvo una en este estudio; lo mismo ocurre para el caso de *Li. durhamii*, que formó un grupo aislado. Para ambas especies es necesario colectar más especímenes, ya que, aunque se han señalado amplias distribuciones para estas especies (WRBU 2005) no se descarta la posibilidad de la existencia de especies crípticas con distribuciones restringidas.

Para los casos donde más de una especie fue agrupada en una misma UTOM por el método ABGD (*Ps. ferox*, *Ps. albipes* y *Ps. lutzii*, *Cx. erraticus* y *Cx. theobaldi*) y asignado un número BIN diferente para cada especie, se ha señalado que la discordancia entre ambos métodos de delimitación de UTOM es debida a los diferentes valores umbral utilizados en cada método para separar a las especies (Chan-Chable et al. 2019a). Así mismo, el rendimiento taxonómico de Refined Single Linkage (RESL) en el sistema BIN es más robusto que el algoritmo ABGD, mostrando mejores resultados entre las especies identificadas y asignadas a una UTOM (Ratnasingham & Hebert 2013). En ABGD, los resultados mejoran cuando se selecciona el mejor esquema de partición, y la partición final depende en gran medida del límite superior previamente definido para la distancia intraespecífica (P) (Puillandre et al. 2012). Pero ambos análisis dependen en gran medida de la representación de las especies en el algoritmo de corrida (Pentinsaari et al. 2017).

Los resultados obtenidos con el método ABGD para este estudio han sido reportados anteriormente para culicidos de Bélgica (Versteirt et al. 2015), donde *Cx. pipiens* y *Cx. torrentium* fueron agrupados en la misma UTOM. Para el caso de *Psorophora*, los resultados han sido reportados por Chan-Chable et al. (2019a) en donde *Ps. albipes*, *Ps. cyanescens*, *Ps. ferox* y *Ps. lutzii* fueron agrupados en un mismo UTOM. Los bajos valores de divergencia interespecífica observados entre *Ps. albipes*, *Ps. champerico* y *Ps. lutzii* dentro del subgénero *Janthinosoma* sugieren utilizar un marcador molecular adicional para corroborar un evento de especiación reciente, así como, determinar que son unidades reproductivamente aisladas con ausencia de flujo genético.

Diversidad críptica.- Desde el 2009, Gutiérrez et al. (2009) propusieron la existencia de un complejo de especies para *An. albimanus*, posteriormente Ahumada et al. (2016) confirmaron esta

propuesta. En este estudio mostramos la existencia de al menos tres entidades, una para México (Chetumal)/Colombia, otra para el Pacífico Colombiano, y una para Puerto Rico. Debido a la cercanía de Puerto Rico a la localidad tipo (Santo Domingo, República Dominicana), es probable que las secuencias correspondan a *An. albimanus* s.s., mientras que el resto deben ser consideradas como *An. albimanus* s.l y muy probablemente nuevas especies. Además de estas evidencias moleculares, también se han documentado variaciones morfológicas en las larvas de *An. albimanus* en Ecuador (Montoya-Lerma et al. 2011), y en los huevos de poblaciones de *An. albimanus* en el sur de México (Rodríguez et al. 1992). Un muestreo intensivo que incluya la distribución completa de *An. albimanus* permitirá delimitar todas las especies dentro del complejo.

Aedes cozumelensis fue descrita en 1966 siendo la isla de Cozumel la localidad tipo (Díaz Nájera 1966), pero actualmente se sabe poco sobre su biología y se desconoce su papel como vector en la transmisión de patógenos en humanos (García-Rejón et al. 2012). Hasta ahora, su distribución conocida abarca la Península de Yucatán y Belice (García-Rejón et al. 2012). Las distancias intraespecíficas de 2.3 % a 3.4 % observadas entre los dos grupos formados para *Ae. cozumelensis*, sugiere especiación críptica dentro de esta especie, y es necesario hacer observaciones de etapas inmaduras (huevos, larvas y pupas) así como, de genitales en machos adultos para poder encontrar los caracteres que separan a estas especies (Versteirt et al. 2015). Para los casos de *Ae. serratus*, *Hg. equinus* y *Cx. erraticus*, la evidencia de especiación críptica ya ha sido señalado (Chan-Chable et al. 2019a). Estas especies tienen una amplia distribución en el continente Americano (WRBU 2005); sin embargo por estar expuestas a factores ambientales extremos podemos considerar que se está propiciando un proceso de especiación acelerado (Mendenhall et al. 2012, Versteirt et al. 2015, De-Silva et al. 2017). Chan-Chable et al (2019a), observaron más de un grupo dentro de estas especies con distancias genéticas >2 %, en *Ae. serratus* (3.9 %), *Hg. equinus* (3.9 %) y en *Cx. erraticus* (5.0 %), ligeramente superiores a las distancias intraespecíficas observadas en este estudio (*Ae. serratus* 2.8 %, *Hg. equinus* 2.5 % y *Cx. erraticus* 2.7 %).

Por otro lado, el traslape observado en este estudio, entre la distancia (K2P) intra e interespecífica en las secuencias del género *Culex* dio lugar a identificaciones ambiguas utilizando los Códigos de Barras de ADN. La mayoría de los individuos conoespecíficos en este género mostraron una distancia genética <2 %, de tal forma que *Cx. erraticus* y *Cx. theobaldi* no pudieron ser delimitados como especies diferentes, en este caso sospechamos que la divergencia es reciente, o las poblaciones aún tienen contacto y por lo tanto se mantiene un flujo genético (Chan-Chable et al. 2019a). Casos similares son observados dentro de las especies de *Culex* en América del Sur, donde se secuenciaron 22 especies, pero no se pudo delimitar el 30 % a pesar de usar multilocus (COI o ITS2) (Laurito et al. 2013). Lo mismo ocurrió en el caso reportado entre *Cx. minor* y *Cx. spiculosus* donde se observó una distancia interespecífica (K2P) promedio de 1.86 % (Wang et al. 2012). Entre *Cx. interrogador* y *Cx. nigripalpus* también se observó una distancia interespecífica de 0.1 % (Chan-Chable et al. 2019a). Los resultados podrían explicarse desde una separación incompleta de linajes o eventos de introgresión en el genoma mitocondrial (Beebe 2018). En estos casos es necesario incluir en el análisis otros marcadores moleculares (Citocromo b, ITS1, Nad4), soportados con datos ecológicos y biológicos (Versteirt et al. 2015, Ajamma et al. 2016, Beebe 2018, Ibáñez-Justicia et al. 2020).

Finalmente, nuestros resultados contribuyen al conocimiento de la fauna de culicidos en una ciudad con alto movimiento de migrantes, se reportan 12 nuevos registros y sobre todo especies de importancia médica. Esto ayudará a las Secretaría de Salud (SSA) de México y en específico en el estado de Quintana Roo, para establecer programas de vigilancia de vectores y prevención en la

transmisión de patógenos (Ruiz-Arrondo et al. 2020). Corrobora que es necesario investigar las diferencias taxonómicas en *An. albimanus* s.l., *Ae. cozumelensis*, *Ae. serratus*, *Hg. equinus*, *Cx. erraticus* y *Li. durhamii*, incluyendo todas sus etapas de desarrollo (larva, pupa y adultos) para documentar el vínculo entre la identificación morfológica y molecular (Ruiz-Arrondo et al. 2020, Singh y Vashist, 2020).

Agradecimientos / Acknowledgments:

Agradecemos al Departamento de Enfermedades Transmitidas por Vector y Zoonosis de los Servicios Estatales de Salud (SESA) de Quintana Roo por apoyarnos con los equipos de colecta. A El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Unidad Chetumal por facilitarnos sus laboratorios para procesar los especímenes colectados. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) de México por la beca de Doctorado proporcionado a Rael J. Chan-Chable (no. 726275), y a la Red MEXBOL no. de proyecto 271108 por financiar este estudio. Agradecemos a la European Union Framework Horizon 2020 Innovation Grant, European Virus Archive (EVA) grant no. 653316 por financiamiento.

Literatura citada

- Abella-Medrano CA, Roiz D, González-Rebeles Islas C, Salazar-Juárez CL, & Ojeda-Flores R. 2020. Assemblage variation of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in different land use and activity periods within a lowland tropical forest matrix in Campeche, Mexico. *Journal of Vector Ecology* 45(2): 188-196. <https://doi.org/10.1111/jvec.12389>
- Ahumada ML, Orjuela LI, Pareja PX, Conde M, Cabarcas DM, Cubillos EFG, Lopez JA, Beier JC, Herrera S, & Quiñones ML. 2016. Spatial distributions of *Anopheles* species in relation to malaria incidence at 70 localities in the highly endemic Northwest and South Pacific coast regions of Colombia. *Malaria Journal* 15(1): 407. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1421-4>
- Ajamma YU, Villinger J, Omondi D, Salifu D, Onchuru TO, Njoroge L, & Masiga DK. 2016. Composition and genetic diversity of mosquitoes (Diptera: Culicidae) on Islands and Mainland shores of Kenya's lakes Victoria and Baringo. *Journal of Medical Entomology* 53(6): 1348–1363. <https://doi.org/10.1093/jme/tjw102>
- Arredondo-García JL, Aguilar-López CG, Lugo-Gerez JJA, Osnaya-Romero N, Pérez-Guillé G, & Medina-Cortina H. 2020. Panorama epidemiológico de dengue en México 2000-2019. *Revista Latinoamericana de Infectología Pediátrica* 33(2): 78–83.
- Arredondo-García JL, Méndez-Herrera A, & Medina-Cortina H. 2016. Arbovirus in Latin America. *Acta pediátrica de México* 37(2): 111–131.
- Ashfaq M, Hebert PDN, Mirza JH, Khan AM, Zafar Y, & Mirza MS. 2014. Analyzing mosquito (Diptera: Culicidae) diversity in Pakistan by DNA barcoding. *PLoS One* 9(5): e97268. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097268>

- Batovska J, Blacket MJ, Brown K, & Lynch SE. 2016. Molecular identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in southeastern Australia. *Ecology and Evolution* 6(9): 3001–3011. <https://doi.org/10.1002/ece3.2095>
- Beebe NW. 2018. DNA barcoding mosquitoes: Advice for potential prospectors. *Parasitology* 145(5): 622–633. <https://doi.org/10.1017/S0031182018000343>
- Brady OJ, & Hay SI. 2020. The global expansion of dengue: How *Aedes aegypti* mosquitoes enabled the first pandemic arbovirus. *Annual Review of Entomology* 65: 191–208.
- Chan A, Chiang LP, Hapuarachchi HC, Tan CH, Pang SC, Lee R, Lee KS, Ng LC, & Lam-Phua SG. 2014. DNA barcoding: complementing morphological identification of mosquito species in Singapore. *Parasites & Vectors* 7(1): 569. <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0569-4>
- Chan-Chable RJ, Bahena-Basave H, & Vázquez-Marroquín R. 2019b. Nuevo registro de distribución para *Trichoprosopon digitatum* (Rondani) (Diptera: Culicidae) en Quintana Roo, México. *Revista Chilena de Entomología* 45(4): 669–672. <https://doi.org/10.35249/rche.45.4.19.20>
- Chan-Chable RJ, Balam-Poot E, Vázquez-Marroquín R, Martínez-Arce A, Mis-Avila PC, & Hernández-Triana LM. 2020a. New distribution records of *Aedes albopictus* in Quintana Roo, Mexico and its importance in public health. *Journal of the American Mosquito Control Association* 36(3): 197–200. <https://doi.org/10.2987/20-6935.1>
- Chan-Chable RJ, Martínez-Arce A, & Mis-Ávila PC. 2018a. Especies crípticas en *Ochlerotatus taeniorhynchus* mediante revelación de código de barras. *Salud Quintana Roo* 11(38): 7–11.
- Chan-Chable RJ, Martínez-Arce A, Mis-Avila PC, & Ortega-Morales AI. 2018b. Confirmation of occurrence of *Anopheles (Anopheles) veruslanei* Vargas in Quintana Roo, Mexico using morphology and DNA barcodes. *Acta Tropica* 188(2018): 138–141. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.08.036>
- Chan-Chable RJ, Martínez-Arce A, Mis-Avila PC, & Ortega-Morales AI. 2019a. DNA barcodes and evidence of cryptic diversity of anthropophilous mosquitoes in Quintana Roo, Mexico. *Ecology and Evolution* 9(8): 4692–4705. <https://doi.org/10.1002/ece3.5073>
- Chan-Chable RJ, Martínez-Arce A, Ortega-Morales AI, & Mis-Ávila PC. 2020b. New Records and Updated Checklist of Mosquito Species in Quintana Roo, Mexico, Using DNA-Barcoding. *Journal of the American Mosquito Control Association* 36(4): 264–268. <https://doi.org/10.2987/20-6941.1>
- Chan-Chable RJ, Ortega-Morales AI, & Martínez-Arce A. 2016. First Record of *Psorophora albipes* in Quintana Roo, Mexico. *Journal of the American Mosquito Control Association* 32(3): 237–239. <http://dx.doi.org/10.2987/16-6580.1>
- Clark-Gil S, & Darsie RF. 1983. The mosquitoes of Guatemala, their identification, distribution and bionomics. *Mosquito Systematics* 15: 151–284.

- Cywinska A, Hunter FF, & Hebert PDN. 2006. Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. *Medical and Veterinary Entomology* 20(4): 413–424. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2006.00653.x>
- De-Silva DL, Mota LL, Chazot N, Mallarino R, Silva-Brandão KL, Gómez Piñerez LM, & Elias M. 2017. North Andean origin and diversification of the largest ithomiine butterfly genus. *Scientific Reports* 7: 45966. <https://doi.org/10.1038/srep45966>
- Delgado-Serra S, Viader M, Ruiz-Arrondo I, Miranda MÁ, Barceló C, Bueno-Marí R, Hernández-Triana LM, Miquel M, Lester K, Jurado-Rivera JA, & Paredes-Esquivel C. 2020. Molecular Characterization of Mosquito Diversity in the Balearic Islands. *Journal of Medical Entomology* tjaa217: 1–8. <https://doi.org/10.1093/jme/tjaa217>
- Díaz Nájera A. 1966. *Aedes* de México. Descripción de una nueva especie del subgénero *Howardina* (Diptera: Culicidae). *Revista de Investigación en Salud Pública* 26(4): 331–344.
- Engdahl C, Larsson P, Näslund J, Bravo M, Evander M, Lundström JO, Ahlm C, & Bucht G. 2014. Identification of Swedish mosquitoes based on molecular barcoding of the COI gene and SNP analysis. *Molecular Ecology Resources* 14(3): 478–488. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12202>
- Fernández-Salas I, & Flores-Leal A. 1995. El papel del vector *Aedes aegypti* en la epidemiología del dengue en México. *Salud Pública de México* 37(suppl 1): 45–52.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, & Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3(5): 294–299.
- Foottit RG, Maw HEL, Havill NP, Ahern RG, & Montgomery ME. 2009. DNA barcodes to identify species and explore diversity in the Adelgidae (Insecta: Hemiptera: Aphidoidea). *Molecular Ecology Resources* 9(Suppl. 1): 188–195. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02644.x>
- García-Rejón JE, López-Urbe MP, Loroño-Pino MA, Arana-Guardia R, Puc-Tinal M, López-Urbe GM, & Lozano-Fuentes S. 2012. *Aedes (Stegomyia) aegypti* and *Aedes (Howardina) cozumelensis* in Yucatán State, Mexico, with a summary of published collection records for *Ae. cozumelensis*. *Journal of Vector Ecology* 37(2): 365–372.
- Gunay F, Alten B, Simsek F, Aldemir A, & Linton Y-M. 2015. Barcoding Turkish *Culex* mosquitoes to facilitate arbovirus vector incrimination studies reveals hidden diversity and new potential vectors. *Acta Tropica* 143: 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.10.013>
- Gutiérrez LA, Naranjo NJ, Cienfuegos AV, Muskus CE, Luckhart S, Com JE, & Correa MM. 2009. Population structure analyses and demographic history of the malaria vector *Anopheles albimanus* from the Caribbean and the Pacific regions of Colombia. *Malaria Journal* 8(1): 259. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-8-259>
- Harbach RE. 2021. Mosquito Taxonomic Inventory. [accessed 2021 Mar 21]. <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/simpletaxonomy/term/6045>

- Hernández-Amparan S, Pérez-Santiago G, Ibáñez-Bernal S, Hinojosa-Ontiveros GA, & Álvarez-Zagoya R. 2020. Actualización de la Riqueza de Especies de Mosquitos en el Estado de Durango, México. *Southwestern Entomologist* 45(1): 251–262. <https://doi.org/10.3958/059.045.0126>
- Hernández-Guevara LF, Sánchez-Ramos FJ, Chan-Chable RJ, Hernández-Triana LM, Valdés-Perezgasga MT, González-Acosta C, & Correa-Morales F. 2020. First Record of *Mansonia dyari* in the State of Morelos, Mexico, Based on Morphology and COI DNA Barcoding. *Journal of the American Mosquito Control Association* 36(1): 33–36. <https://doi.org/10.2987/19-6909.1>
- Hernández-Triana LM, Brugman VA, Nikolova NI, Ruiz-Arrondo I, Barrero E, Thorne T, de Marco MF, Krüger A, Lumley S, Johnson N, & Fooks AR. 2019. DNA barcoding of British mosquitoes (Diptera, Culicidae) to support species identification, discovery of cryptic genetic diversity and monitoring invasive species. *ZooKeys* 832: 57–76. <https://doi.org/10.3897/zookeys.832.32257>
- Hernández-Triana LM, Garza-Hernández JA, Ortega Morales AI, Prosser SWJ, Hebert PDN, Nikolova NI, Barrero E, de Luna-Santillana E de J, González-Alvarez VH, Mendez-López R, Chan-Chable RJ, Fooks AR, & Rodríguez-Pérez MA. 2021. An Integrated Molecular Approach to Untangling Host–Vector–Pathogen Interactions in Mosquitoes (Diptera: Culicidae) From Sylvan Communities in Mexico. *Frontiers in Veterinary Science* 7: 564791. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.564791>
- Hiwat H, & Bretas G. 2011. Ecology of *Anopheles darlingi* Root with respect to vector importance: A review. *Parasites & Vectors* 4: 177. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-177>
- Hoyos-Lopez R, Pardo SR, Castaño JC, & Gallego-Gómez JC. 2015. Código de barras para la tipificación de culícidos inmaduros de Armenia y Cricasia (Quindío, Colombia). *Revista Colombiana de Entomología* 41(2): 218–227.
- Ibáñez-Justicia A, Smítz N, den Hartog W, van de Vossenbergh B, De Wolf K, Deblauwe I, & Stroo A. 2020. Detection of Exotic Mosquito Species (Diptera: Culicidae) at International Airports in Europe. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 17(10): 3450. <https://doi.org/10.3390/ijerph17103450>
- Ivanova NV, deWaard J, Hebert PDN. 2006. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering highquality DNA. *Molecular Ecology Notes* 6: 998–1002. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01428.x>
- Jukes TH, & Cantor CR. 1969. Evolution of protein molecules, in: H.N. Munro (Ed.), *Mammalian protein metabolism*. Academic Press, New York, pp. 21–132.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111–120.
- Kumar NP, Rajavel AR, Natarajan R, & Jambulingam P. 2007. DNA barcodes can distinguish species of Indian mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 44: 1–7. <https://doi.org/10.1093/jmedent/41.5.01>

- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, & Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35: 1547–1549.
- Laurito M, de Oliveira TMP, Almirón WR, & Sallum MAM. 2013. COI barcode versus morphological identification of *Culex* (*Culex*) (Diptera: Culicidae) species: A case study using samples from Argentina and Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 108: 110–122. <https://doi.org/10.1590/0074-0276130457>
- Linton YM, Pecor JE, Porter CH, Mitchell LB, Garzon-Moreno A, Foley DH, Pecor DB, & Wilkerson RC. 2013. Mosquitoes of eastern Amazonian Ecuador: biodiversity, bionomics and barcodes. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 108(suppl 1): 100–109. <https://doi:10.1590/0074-0276130440>
- Medeiros AS, Costa DMP, Branco MSD, Sousa DMC, Monteiro JD, Galvão SPM, Azevedo PRM, Fernandes JV, Jeronimo SMB, & Araújo JMG. 2018. Dengue virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in urban areas in the state of Rio Grande do Norte, Brazil: Importance of virological and entomological surveillance. *PLoS One* 13(3): e0194108. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194108>
- Mendenhall IH, Bahl J, Blum MJ, & Wesson DM. 2012. Genetic structure of *Culex erraticus* populations across the Americas. *Journal of Medical Entomology* 49: 522–534.
- Meyer CP. 2003. Molecular systematics of cowries (Gastropoda: Cypraeidae) and diversification patterns in the tropics. *Biological Journal of the Linnean Society* 79: 401–459. <https://doi.org/10.1046/j.1095-8312.2003.00197.x>
- Mis Ávila PC, Camul Amaro GJ, & Domínguez Galera MA. 2013. Determinación taxonómica de mosquitos (Culicinae: Culicidae) de la zona urbana de Chetumal, Quintana Roo. *Salud Quintana Roo* 6(23): 8–13.
- Montoya-Lerma J, Solarte YA, Giraldo-Calderón GI, Quiñones ML, Ruiz-López F, Wilkerson RC, & González R. 2011. Malaria vector species in Colombia - A review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 106(Suppl 1): 223–238.
- Mora-Covarrubias ADL, Jiménez-Vega F, & Treviño-Aguilar SM. 2010. Distribución geoespacial y detección del virus del dengue en mosquitos *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* de Ciudad Juárez, Chihuahua, México. *Salud Pública de México* 52(2): 127–133.
- Ortiz DI, Anishchenko M, & Weaver SC. 2005. Susceptibility of *Psorophora confinnis* (Diptera: Culicidae) to infection with epizootic (Subtype IC) and enzootic (Subtype ID) Venezuelan Equine Encephalitis Viruses. *Journal of Medical Entomology* 42(5): 857–863. <https://doi.org/10.1093/jmedent/42.5.857>
- Pentinsaari M, Vos R, & Mutanen M. 2017. Algorithmic single-locus species delimitation: Effects of sampling effort, variation and nonmonophyly in four methods and 1870 species of beetles. *Molecular Ecology Resources* 17: 393–404. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12557>

- Puillandre N, Lambert A, Brouillet S, & Achaz G. 2012. ABGD, automatic barcode gap discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology* 21: 1864–1877. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05239.x>
- Ratnasingham S, & Hebert PDN. 2007. BOLD: The barcode of life data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Notes* 7(3): 355–364. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x>
- Ratnasingham S, & Hebert PDN. 2013. A DNA-based registry for all animal species: The Barcode Index Number (BIN) System. *PLoS One* 8: e66213. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066213>
- Rodríguez MH, Chavez B, Orozco A, Loyola EG, & Martínez-Palomo A. 1992. Scanning Electron Microscopic Observations of *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) Eggs. *Journal of Medical Entomology* 29(3): 400–406.
- Romaña C, Emperaire L, & Jansen AM. 2003. Enfoques conceptuales y propuestas metodológicas para el estudio de las interacciones entre el medio ambiente y la salud: aplicación a un programa de investigación sobre la tripanosomiasis americana. *Cadernos de Saúde Pública* 19: 945–953.
- Rozo-López P, & Mengual X. 2015. Mosquito species (Diptera, Culicidae) in three ecosystems from the Colombian Andes: Identification through DNA barcoding and adult morphology. *ZooKeys* 513: 39–64. <https://doi.org/10.3897/zookeys.513.9561>
- Rueda J, & Alarcón-Elbal PM. 2020. Mosquitos (Diptera: Culicidae) de lagunas temporales de Costa Rica y Nicaragua. *Limnetica* 39(2): 579–600. <https://doi.org/10.23818/limn.39.38>
- Ruiz-Arrondo I, Hernández-Triana LM, Nikolova NI, Fooks AR, & Oteo JA. 2020. Integrated Approaches in Support of Taxonomic Identification of Mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Vector Surveillance in Spain. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 20(11): 831–842. <https://doi.org/10.1089/vbz.2020.2662>
- Ruiz-Arrondo I, McMahon BJ, Hernández-Triana LM, Santibañez P, Portillo A, & Oteo JA. 2019. Surveillance of Mosquitoes (Diptera, Culicidae) in a Northern Central Region of Spain: Implications for the Medical Community. *Frontiers in Veterinary Science* 6: 86. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00086>
- Ruiz-López F, Wilkerson RC, Conn JE, McKeon SN, Levin DM, Quiñones ML, & Linton YM. 2012. DNA barcoding reveals both known and novel taxa in the Albitarsis Group (*Anopheles: Nyssorhynchus*) of Neotropical malaria vectors. *Parasites & Vectors* 5: 44. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-44>
- Santamarina Mijares AS, Pérez Pacheco R, Tomás Martínez SH, Cantón LE, & Flores Ambrosio G. 1999. The *Romanomermis iyengari* parasite for *Anopheles pseudopunctipennis* suppression in natural habitats in Oaxaca State, Mexico. *Revista Panamericana de Salud Pública* 5(1): 23–28. <https://doi.org/10.1590/S1020-49891999000100004>
- Singh D, & Vashist D. 2020. DNA barcoding as a tool supporting species identification and molecular phylogeny for Indian *Anopheles* (Diptera: Culicidae: Anophelinae). *Journal of Entomological Research* 44(3): 409–416. <https://doi.org/10.5958/0974-4576.2020.00069.9>

- Sinti-Hesse C, Díaz-Soria F, Casanova-Rojas W, Carey-Ángeles C, Tello-Espinoza R, Espinoza J, & Zevallos K. 2019. Embarcaciones fluviales como medio de dispersión de *Aedes aegypti* hacia zonas fronterizas de la Amazonía peruana. *Revista peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 36: 392–399. <http://dx.doi.org/10.17843/rpmesp.2019.363.4558>
- SSA (Secretaría de Salud de México). 2001. Programa de Acción: Enfermedades Transmitidas por Vector. [accessed 2021 Mar 19]. <https://www.gob.mx/salud>
- Talaga S, Leroy C, Guidez A, Dusfour I, Girod R, Dejean A, & Murienne J. 2017. DNA reference libraries of French Guianese mosquitoes for barcoding and metabarcoding. *PLoS One* 12(6): e0176993. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176993>
- Vargas L. 1956. Especies y distribución de mosquitos mexicanos no Anofelinos (Insecta, Diptera). *Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales* 16(1): 19–36.
- Vargas L, & Martínez-Palacios A. 1956. Anofelinos Mexicanos, taxonomía y distribución. Secretaría de Salubridad y Asistencia. 181pp.
- Versteirt V, Nagy ZT, Roelants P, Denis L, Breman FC, Damiens D, & Van Bortel W. 2015. Identification of Belgian mosquito species (Diptera: Culicidae) by DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources* 15: 449–457. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12318>
- Villarreal-Treviño C, Ríos-Delgado JC, Penilla-Navarro RP, Rodríguez AD, López JH, Nettel-Cruz JA, & Fuentes-Maldonado G. 2020. Composition and abundance of anopheline species according to habitat diversity in Mexico. *Salud pública de México* 62(4): 388–401. <https://doi.org/10.21149/10111>
- Vitek CJ, Richards SL, Mores CN, Day JE, & Lord CC. 2008. Arbovirus transmission by *Culex nigripalpus* in Florida, 2005. *Journal of Medical Entomology* 45(3): 483–493. <https://doi.org/10.1093/jmedent/45.3.483>
- Wang G, Li C, Guo X, Xing D, Dong Y, Wang Z, & Zhao T. 2012. Identifying the main mosquito species in China based on DNA barcoding. *PLoS One* 7: e47051. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047051>
- Weeraratne TC, Surendran SN, & Parakrama Karunaratne SHP. 2018. DNA barcoding of morphologically characterized mosquitoes belonging to the subfamily Culicinae from Sri Lanka. *Parasites & Vectors* 11: 266. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2810-z>
- Wiggins K, Eastmond B, & Alto BW. 2018. Transmission potential of Mayaro virus in Florida *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes. *Medical and Veterinary Entomology* 32(4): 436–42. <https://doi.org/10.1111/mve.12322>
- Wilkerson RC, & Strickman D. 1990. Illustrated key to the female Anopheline mosquitoes of Central America and Mexico. *Journal of the American Mosquito Control Association* 6: 7–34.
- WRBU (Walter Reed Biosystematics Unit). 2005. Systematic catalog of Culicidae. [accessed 2021 Mar 20]. <http://www.mosquitocatalog.org/>

Leyendas de figuras y tablas:

Figura 1. Mapa de ubicación de los puntos de muestreo de culicidos en la ciudad de Chetumal, Quintana Roo.

Figura 2. Árbol NJ basado en las distancias genéticas (K2P) del gen COI (fragmento de 498–669 pb) para 27 especies de Culicidae. Los valores de bootstrap (> 80%) se muestran en los puntos de ramificación. MX = México; EUA = Estados Unidos de Norteamérica; GF = Guayana Francesa; COL: Colombia; PR = Puerto Rico; ¥ = secuencias generadas en este estudio para culicidos colectados en Chetumal; * = secuencias de culicidos colectados en regiones cercanas a Chetumal; λ = secuencias descargadas de BOLD System.

Tabla 1. Número de individuos por especie colectados por sitio de muestreo en Chetumal, Quintana Roo. B = Bahía, PE = Parque Ecológico, EC = ECOSUR y S = Sabana.

Tabla 2. Lista de especies de mosquitos analizados en este estudio, país de colecta, número (n) de especímenes con CB-ADN, distancia genética intraespecífica (K2P) (promedio y máxima), “Binary Index Number” (BIN), y pares de bases (pb). Secuencias generadas para Chetumal son señaladas (¥), secuencias de especímenes colectados en otras regiones de Quintana Roo (*) y secuencias descargadas de BOLD (λ).

Material Suplementario:

Tabla S1. Secuencias descargadas de BOLD para 20 especies que fueron añadidos al análisis en este estudio. * = secuencias no publicas generadas en este estudio de ejemplares correspondientes a otras regiones de Quintana Roo.

Tabla S2. Lista de especies de mosquitos presentes en la ciudad de Chetumal. Los registros previos están abreviados con el acrónimo del primer autor: VM, Vargas y Martínez-Palcios (1956); MA, Mis Avila et al. (2013); CCa, Chan-Chable et al. (2016); CCb, Chan-Chable et al. (2018); CCC, Chan-Chable et al. (2019); CCd, Chan-Chable et al. (2020). Registros reportados en este estudio (*), nuevo registro estatal (**). La clasificación se basa en el Systematic Catalog of Culicidae del Walter Reed Biosystematics Unit (<http://www.wrbiu.org>).

Figura 1.

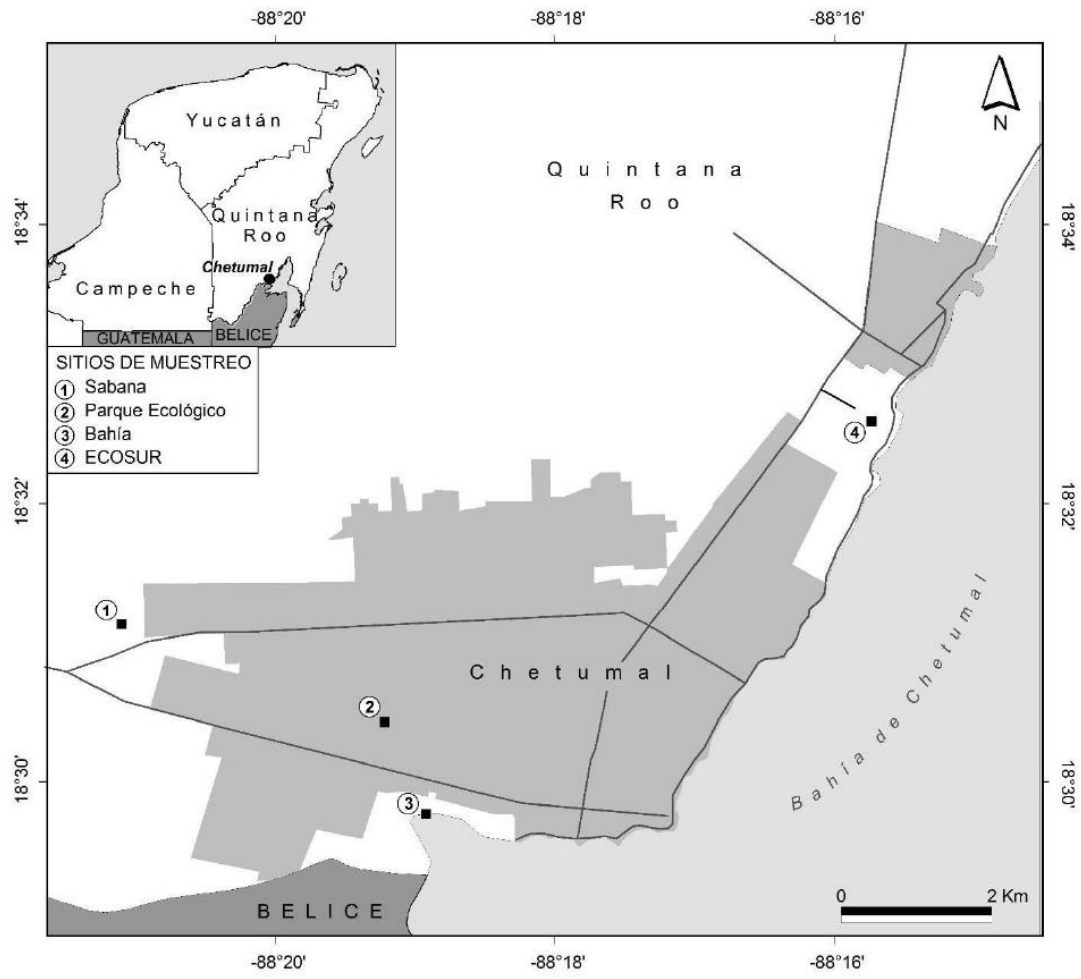


Figura 2.

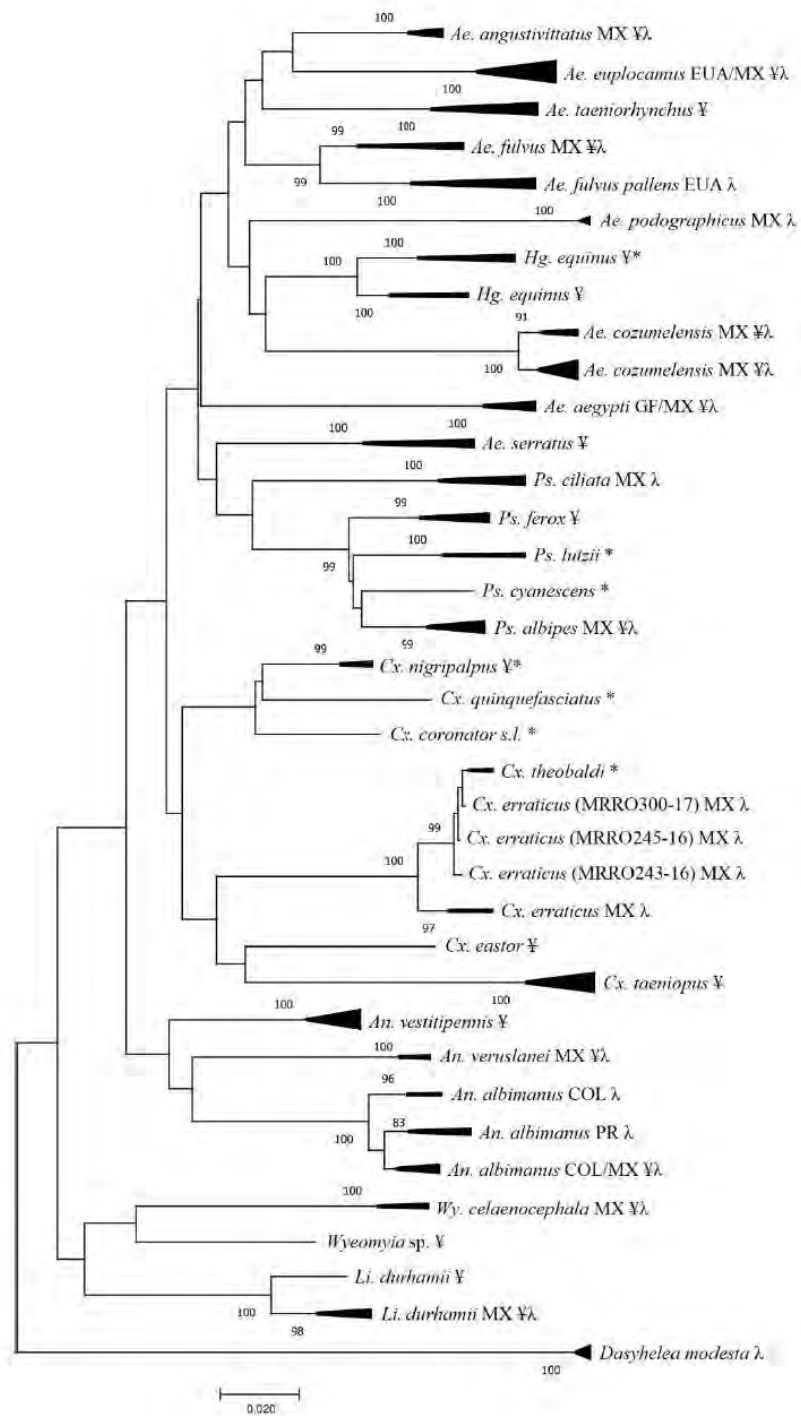


Tabla 1. Número de individuos por especie colectados por sitio de muestreo en Chetumal, Quintana Roo. B = Bahía, PE = Parque Ecológico, EC = ECOSUR y S = Sabana.

Especies	Sitios				(n) Total x spp
	B	PE	EC	S	
<i>Anopheles veruslanei</i>	1				1
<i>Anopheles vestitipennis</i>	7				7
<i>Anopheles albimanus</i>	3	1		1	5
<i>Aedes cozumelensis</i>			7		7
<i>Aedes angustivittatus</i>		21	1	2	24
<i>Aedes euplocamus</i>		2	5	3	10
<i>Aedes fulvus</i>				2	2
<i>Aedes serratus</i>		7	4	34	45
<i>Aedes taeniorhynchus</i>	5	96	126	28	255
<i>Aedes podographicus</i>				1	1
<i>Aedes aegypti</i>	5		6		11
<i>Haemagogus equinus</i>			9		9
<i>Psorophora albipes</i>		6	6	119	131
<i>Psorophora ferox</i>	7	54	43	44	148
<i>Psorophora ciliata</i>			1		1
<i>Culex nigripalpus</i>			1	2	3
<i>Culex eastor</i>				1	1
<i>Culex erraticus</i>				2	2
<i>Culex taeniopus</i>	188		1	3	192
<i>Limatus durhamii</i>				9	9
<i>Wyeomyia celaenocephala</i>			1		1
<i>Wyeomyia</i> sp.	1				1
Total de especímenes por sitio de colecta	217	187	211	251	

Tabla 2. Lista de especies de mosquitos analizados en este estudio, país de colecta, número (n) de especímenes con CB-ADN, distancia genética intraespecífica (K2P) (promedio y máxima), “Binary Index Number” (BIN), y pares de bases (pb). Secuencias generadas para Chetumal son señaladas (¥), secuencias de especímenes colectados en otras regiones de Quintana Roo (*) y secuencias descartadas de BOLD (λ).

Especies	País de colecta	n	Distancia media (%)	Distancia máxima (%)	BIN	Pb
<i>Anopheles (Anopheles) veruslanei</i> Vargas, 1979	México ^{¥λ}	5	0.4	1.2	BOLD:ADF9652	658
<i>Anopheles (Anopheles) vestitipennis</i> Dyar y Knab, 1906	México [¥]	7	0.3	1.2	BOLD:AA4188	658
<i>Anopheles (Nyssorhynchus) albimanus</i> Wiedemann, 1820	México ^{¥λ} Colombia ^λ Pto. Rico ^λ	18	1.6	3.9	BOLD:ADU8918 BOLD:AAA3068	658
<i>Aedes (Howardina) cozumelensis</i> Díaz Nájera, 1966	México ^{¥λ}	12	1.0	3.4	BOLD:ACO0212	597
<i>Aedes (Ochlerotatus) angustivittatus</i> Dyar y Knab, 1907	México ^{¥λ}	13	1.0	2.2	BOLD:ACN2972	667
<i>Aedes (Ochlerotatus) euplocamus</i> Dyar y Knab, 1906	México ^{¥λ} EUA ^λ	11	0.9	1.7	BOLD:AAH9007	650
<i>Aedes (Ochlerotatus) fulvus</i> (Wiedemann, 1828)	México ^{¥λ} EUA ^λ	9	2.9	4.6	BOLD:ACN9154 BOLD:ACC4605	583
<i>Aedes (Ochlerotatus) serratus</i> (Theobald, 1901)	México [¥]	5	1.0	2.8	BOLD:ACN3711 BOLD:ACN8188	665
<i>Aedes (Ochlerotatus) taeniorhynchus</i> (Wiedemann, 1821)	México [¥]	6	0	0	BOLD:AAE5975	664
<i>Aedes (Protomacleaya) podographicus</i> Dyar y Knab, 1906	México ^λ	3	0.8	0.8	BOLD:ADE6045	658
<i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> (Linnaeus, 1762)	México ^{¥λ} Guayana Francesa ^λ	6	0.4	0.9	BOLD:AAA4210	658
<i>Haemagogus (Haemagogus) equinus</i> Theobald, 1903	México ^{¥*}	6	1.7	2.5	BOLD:ACN9157 BOLD:ACN9156	658
<i>Psorophora (Janthinosoma) albipes</i> (Theobald, 1907)	México ^{¥λ}	11	0.3	1.3	BOLD:ACN3418	669
<i>Psorophora (Janthinosoma) cyanescens</i> (Coquillett, 1902)	México [*]	1	—	—	BOLD:AAG851	591
<i>Psorophora (Janthinosoma) ferox</i> (von Humboldt, 1819)	México [¥]	7	0.4	1.2	BOLD:ABZ5766	658
<i>Psorophora (Janthinosoma) lutzii</i> (Theobald, 1901)	México [*]	2	0	0	BOLD:ADE0378	591
<i>Psorophora (Psorophora) ciliata</i> (Fabricius, 1794)	México ^λ	5	0	0	BOLD:AAG8849	588
<i>Culex (Culex) coronator</i> Dyar y Knab, 1906	México [*]	1	—	—	BOLD:AA3636	498
<i>Culex (Culex) nigripalpus</i> Theobald, 1901	México ^{¥*}	9	0.3	1.8	BOLD:AAF1735	658
<i>Culex (Culex) quinquefasciatus</i> Say, 1823	México [*]	1	—	—	BOLD:AAA4751	591
<i>Culex (Melanoconion) eastor</i> Dyar, 1920	México [¥]	1	—	—	BOLD:AAG8857	582
<i>Culex (Melanoconion) erraticus</i> (Dyar y Knab, 1906)	México ^λ	5	2.0	2.7	BOLD:AAG8848	648
<i>Culex (Melanoconion) taeniopus</i> Dyar y Knab, 1907	México [¥]	7	1.2	1.4	BOLD:AAW1983	661
<i>Culex (Melanoconion) theobaldi</i> (Lutz, 1904)	México [*]	2	0.3	0.3	BOLD:AAG8848	616
<i>Limatus durhamii</i> Theobald, 1901	México ^{¥λ}	14	0.7	4.8	BOLD:AAU2690	668

<i>Wyeomyia (Wyeomyia) celaenocephala</i> Dyar y Knab, 1906	México [✱]	5	0	0	BOLD:ACM7671	601
<i>Wyeomyia</i> sp.	México [*]	1	—	—	BOLD:ACN6876	626

Información suplementaria

Tabla S1. Secuencias descargadas de BOLD para 20 especies que fueron añadidos al análisis en este estudio. * = secuencias no publicas generadas en este estudio de ejemplares correspondientes a otras regiones de Quintana Roo.

Especies	(n) secuencias	Process ID	BIN	País	Estado/sitio de colecta
<i>An. veruslanei</i>	4	MRRO187-16	BOLD:ADF9652	México	Quintana Roo
		MRRO188-16	BOLD:ADF9652	México	Quintana Roo
		MRRO190-16	BOLD:ADF9652	México	Quintana Roo
		MRRO262-16	BOLD:ADF9652	México	Quintana Roo
<i>An. albimanus</i>	14	MRRO283-16	BOLD:ADU8918	México	Quintana Roo
		MRRO284-16	BOLD:ADU8918	México	Quintana Roo
		MRRO292-17	BOLD:ADU8918	México	Quintana Roo
		MRRO293-17	BOLD:ADU8918	México	Quintana Roo
		GBDP48297-19	BOLD:ADU8918	Colombia	—
		GBDP48298-19	BOLD:ADU8918	Colombia	—
		GBDP48299-19	BOLD:ADU8918	Colombia	—
		GBDP48300-19	BOLD:AAA3068	Colombia	—
		GBDP48301-19	BOLD:AAA3068	Colombia	—
		MOSN2827-19	BOLD:ADU8918	Puerto Rico	Municipio Lajas
		MOSN2828-19	BOLD:ADU8918	Puerto Rico	Municipio Lajas
		MOSN2829-19	BOLD:ADU8918	Puerto Rico	Municipio Lajas
		MOSN2777-19	BOLD:ADU8918	Puerto Rico	Municipio Lajas
		MOSN2799-19	BOLD:ADU8918	Puerto Rico	Municipio Lajas
<i>Ae. cozumelensis</i>	6	MRRO209-16	BOLD:ACO0212	México	Quintana Roo
		MRRO210-16	BOLD:ACO0212	México	Quintana Roo
		MRRO211-16	BOLD:ACO0212	México	Quintana Roo
		MRRO212-16	BOLD:ACO0212	México	Quintana Roo
		MRRO213-16	BOLD:ACO0212	México	Quintana Roo
		MRRO214-16	BOLD:ACO0212	México	Quintana Roo
<i>Ae. angustivittatus</i>	6	MRRO021-16	BOLD:ACN2972	México	Quintana Roo
		MRRO022-16	BOLD:ACN2972	México	Quintana Roo
		MRRO023-16	BOLD:ACN2972	México	Quintana Roo
		MRRO143-16	BOLD:ACN2972	México	Quintana Roo
		MRRO144-16	BOLD:ACN2972	México	Quintana Roo
		MRRO145-16	BOLD:ACN2972	México	Quintana Roo
<i>Ae. euplocamus</i>	7	MRRO049-16	BOLD:AAH9007	México	Quintana Roo
		MRRO050-16	BOLD:AAH9007	México	Quintana Roo
		MRRO051-16	BOLD:AAH9007	México	Quintana Roo
		MRRO056-16	BOLD:AAH9007	México	Quintana Roo
		MRRO148-16	BOLD:AAH9007	México	Quintana Roo
		BBDIT1101-11	BOLD:AAH9007	EUA	Texas
		MQTBC046-16	BOLD:AAH9007	México	Tabasco
<i>Ae. fulvus</i>	7	MRRO091-16	BOLD:ACN9154	México	Quintana Roo
		MRRO131-16	BOLD:ACN9154	México	Quintana Roo
		IUP1004-14	BOLD:ACC4605	EUA	Florida
		IUP1005-14	BOLD:ACC4605	EUA	Florida
		IUP1006-14	BOLD:ACC4605	EUA	Florida
		IUP1007-14	BOLD:ACC4605	EUA	Florida
		IUP1008-14	BOLD:ACC4605	EUA	Florida

<i>Ae. podographicus</i>	3	XNSLF032-19	BOLD:ADE6045	México	Chiapas
		XNSLF034-19	BOLD:ADE6045	México	Chiapas
		XNSLF035-19	BOLD:ADE6045	México	Chiapas
<i>Ae. aegypti</i>	2	FGMOS1063-16	BOLD:AAA4210	Guayana Francesa	Matoury
		FGMOS186-16	BOLD:AAA4210	Guayana Francesa	Kourou
<i>Hg. equinus*</i>	1	MRRO048-16	BOLD:ACN9156	México	Quintana Roo
<i>Ps. albipes</i>	3	MRRO017-16	BOLD:ACN3418	México	Quintana Roo
		MRRO018-16	BOLD:ACN3418	México	Quintana Roo
		MRRO019-16	BOLD:ACN3418	México	Quintana Roo
<i>Ps. cyanescens*</i>	1	MRRO008-16	BOLD:AAG3851	México	Quintana Roo
<i>Ps. luzii*</i>	2	MRRO013-16	BOLD:ADE0378	México	Quintana Roo
		MRRO014-16	BOLD:ADE0378	México	Quintana Roo
<i>Ps. ciliata</i>	5	MRRO059-16	BOLD:AAG3849	México	Quintana Roo
		MRRO060-16	BOLD:AAG3849	México	Quintana Roo
		MRRO184-16	BOLD:AAG3849	México	Quintana Roo
		MRRO185-16	BOLD:AAG3849	México	Quintana Roo
		MRRO186-16	BOLD:AAG3849	México	Quintana Roo
<i>Cx. coronator*</i>	1	MRRO096-16	BOLD:AAN3636	México	Quintana Roo
		MRRO044-16	BOLD:AAF1735	México	Quintana Roo
<i>Cx. nigripalpus*</i>	6	MRRO045-16	BOLD:AAF1735	México	Quintana Roo
		MRRO047-16	BOLD:AAF1735	México	Quintana Roo
		MRRO099-16	BOLD:AAF1735	México	Quintana Roo
		MRRO101-16	BOLD:AAF1735	México	Quintana Roo
		MRRO102-16	BOLD:AAF1735	México	Quintana Roo
<i>Cx. quinquefasciatus*</i>	1	MRRO046-16	BOLD:AAA4751	México	Quintana Roo
<i>Cx. erraticus</i>	5	MRRO243-16	BOLD:AAG3848	México	Quintana Roo
		MRRO245-16	BOLD:AAG3848	México	Quintana Roo
		MRRO300-17	BOLD:AAG3848	México	Quintana Roo
		MRRO301-17	BOLD:AAG3848	México	Quintana Roo
		MRRO302-17	BOLD:AAG3848	México	Quintana Roo
<i>Cx. theobaldi*</i>	2	MRRO134-16	BOLD:AAG3848	México	Quintana Roo
		MRRO304-17	BOLD:AAG3848	México	Quintana Roo
<i>Li. durhamii</i>	7	MRRO038-16	BOLD:AAU2690	México	Quintana Roo
		MRRO156-16	BOLD:AAU2690	México	Quintana Roo
		MRRO157-16	BOLD:AAU2690	México	Quintana Roo
		MRRO260-16	BOLD:AAU2690	México	Quintana Roo
		MQCHP094-16	BOLD:AAU2690	México	Chiapas
		XNSLF044-19	BOLD:AAU2690	México	Chiapas
		XNSLF085-19	BOLD:AAU2690	México	Chiapas
<i>Wy. celaenocéphala</i>	4	MRRO155-16	BOLD:ACM7671	México	Quintana Roo
		MRRO255-16	BOLD:ACM7671	México	Quintana Roo
		MRRO256-16	BOLD:ACM7671	México	Quintana Roo
		MRRO259-16	BOLD:ACM7671	México	Quintana Roo

Tabla S2. Lista de especies de mosquitos presentes en la ciudad de Chetumal. Los registros previos están abreviados con el acrónimo del primer autor: VM, Vargas y Martínez-Palacios (1956); MA, Mis Avila et al. (2013); CCa, Chan-Chable et al. (2016); CCb, Chan-Chable et al. (2018); CCc, Chan-Chable et al. (2019); CCd, Chan-Chable et al. (2020). Registros reportados en este estudio (*), nuevo registro estatal (**). La clasificación se basa en el Systematic Catalog of Culicidae del Walter Reed Biosystematics Unit (<http://www.wrbu.org>).

Taxon	Registros previos
<i>Anopheles (Anopheles)</i>	
1. <i>crucians</i> (Wiedemann)	VM
2. <i>punctimacula</i> (Dyar y Knab)	VM
3. <i>veruslanei</i> Vargas *	
4. <i>vestitipennis</i> (Dyar y Knab) *	
<i>Anopheles (Nyssorhynchus)</i>	
5. <i>albimanus</i> (Wiedemann)	VM, CCb
<i>Aedes (Howardina)</i>	
6. <i>cozumelensis</i> Díaz Nájera *	
<i>Aedes (Ochlerotatus)</i>	
7. <i>angustivittatus</i> (Dyar y Knab)	CCb, MA
8. <i>euplocamus</i> (Dyar y Knab) *	
9. <i>fulvus</i> (Wiedemann)	CCb
10. <i>scapularis</i> (Rondani)	MA
11. <i>serratus</i> (Theobald)	CCb
12. <i>sollicitans</i> (Walker)	MA
13. <i>taeniorhynchus</i> (Wiedemann)	MA, CCb
14. <i>trivittatus</i> (Coquillett)	MA
<i>Aedes (Protomacleaya)</i>	
15. <i>podographicus</i> Dyar y Knab *	
<i>Aedes (Stegomyia)</i>	
16. <i>aegypti</i> (Linnaeus)	MA
17. <i>albopictus</i> (Skuse)	CCd
<i>Haemagogus (Haemagogus)</i>	
18. <i>equinus</i> (Theobald) *	
<i>Psorophora (Janthinosoma)</i>	
19. <i>albipes</i> (Theobald)	MA, CCa
20. <i>cyanescens</i> (Coquillett)	MA
21. <i>ferox</i> (Humboldt)	MA
<i>Psorophora (Psorophora)</i>	
22. <i>ciliata</i> (Fabricius) *	
<i>Culex (Culex)</i>	
23. <i>coronator</i> Group	MA
24. <i>interrogator</i> (Dyar y Knab)	MA

25. <i>nigripalpus</i> (Theobald)	MA
26. <i>quinquefasciatus</i> (Say)	MA
27. <i>salinarius</i> (Coquillett)	MA
28. <i>thriambus</i> (Dyar)	MA
<i>Culex</i> (<i>Melanoconion</i>)	
29. <i>eastor</i> Dyar *,**	
30. <i>erraticus</i> (Dyar y Knab) *	
31. <i>taeniopus</i> (Dyar y Knab) *	
<i>Limatus</i>	
32. <i>durhamii</i> (Theobald) *	
<i>Trichoprosopon</i>	
33. <i>digitatum</i> (Rondani)	CCc
<i>Wyeomyia</i> (<i>Wyeomyia</i>)	
34. <i>celaenocephala</i> (Dyar y Knab) *	
<i>Toxorhynchites</i> (<i>Lynchiella</i>)	
35. <i>moctezuma</i> (Dyar y Knab)	MA

CONCLUSIONES GENERALES

ESTUDIO 1

Nuestros resultados contribuyen al desarrollo de una biblioteca de CB-ADN de referencia para mosquitos (Culicidae) mexicanos. Además, nuestro análisis reportó la presencia de cierta diferenciación taxonómica que debe ser investigada dentro de *An. apicimacula*, *An. crucians* s.l., *Ae. serratus*, *Hg. equinus*, *Ps. ferox*, *Cx. erraticus* y *Cx. taeniopus*. Para la nueva especie descubierta, es necesario trabajar en su descripción tomando en cuenta todos sus estadios de vida (larva, pupa y adultos). La identificación de las especies es un paso esencial para la vigilancia y control de los vectores. Esta información es valiosa para la Secretaría de Salud de México por la contribución en la vigilancia entomológica y el diseño de programas para el control de enfermedades transmitidas por vectores en la región fronteriza con Belice.

ESTUDIO 2

Aedes albopictus es un importante vector de varios arbovirus que afectan la salud humana en todo el mundo, por lo que el conocimiento de su distribución es una pieza clave para la implementación de estrategias de control de las enfermedades. En México, *Ae. albopictus* se ha registrado en 14 de los 32 estados. En 2012 se registró por primera vez en una sola localidad de Quintana Roo (Cancun), en este estudio aportamos nueva información sobre la distribución de *Ae. albopictus* en el centro y sur del Estado, y comentamos su importancia médica.

ESTUDIO 3

Utilizando datos morfológicos y moleculares, reportamos siete especies de mosquitos (*An. gabaldoni*, *An. darlingi*, *Ps. columbiae*, *Cx. inflicus*, *Cx. trifidus*, *Cx. lactator* y *Wy. guatemala* s.l.) como nuevos registros para el Estado de Quintana Roo. La lista actualizada de especies de mosquitos para el Estado asciende a un total de 86, con 15 géneros y 21 subgéneros, los géneros con

mayor riqueza de especies son *Culex* (24 especies), *Aedes* (18 especies), *Anopheles* (15 especies) y *Psorophora* (10 especies). Actualmente, Quintana Roo es el tercer Estado con mayor riqueza de especies de mosquitos, sólo después de Tabasco con 105 especies y Veracruz con 140 especies.

ESTUDIO 4

Se reportan 12 nuevos registros de mosquitos para Chetumal, de las cuales *Cx. eastor* es nuevo registro para el Estado de Quintana Roo. Además, se corrobora que es necesario investigar las diferencias taxonómicas dentro de *An. albimanus* s.l., *Ae. cozumelensis*, *Ae. serratus*, *Hg. equinus*, *Cx. erraticus* y *Li. durhamii*, incluyendo todas sus etapas de desarrollo (larva, pupa y adultos) para documentar el vínculo entre la identificación morfológica y molecular. Nuestros resultados contribuyen al conocimiento de la fauna de mosquitos culícidos en una ciudad con alto movimiento de migrantes. Esta información será útil para la Secretaría de Salud de Quintana Roo para establecer programas de vigilancia de vectores y prevención en la transmisión de patógenos en la ciudad capital.