

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LISIANE DE CASTRO PONCIO

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE *Culex coronator* E
Culex usquatus, DUAS ESPÉCIES DO COMPLEXO CORONATOR DO
SUBGÊNERO *Culex* (*Culex*) (DIPTERA, CULICIDAE)**

CURITIBA

2008

LISIANE DE CASTRO PONCIO

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE *Culex coronator* E
Culex usquatus, DUAS ESPÉCIES DO COMPLEXO CORONATOR DO
SUBGENEROS *Culex* (*Culex*) (DIPTERA, CULICIDAE)**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, Departamento de Zoologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Mário Antonio Navarro da Silva.

Co-orientadora: Prof. Dra. Maria Anice Mureb Sallum.

CURITIBA

2008

*À minha mãe, Floracy Gomes de Castro
Poncio (in memoriam), minha maior
incentivadora, com quem aprendi a ser forte
e superar todas as dificuldades, e
infelizmente não pode ver este trabalho
concluído... Aqui está ele com todo meu
amor e carinho.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus pela Graça de estar em um curso de pós-graduação que é referência nacional e por me dar forças para superar todas as dificuldades e transtornos durante a realização desta dissertação.

Ao Curso de Pós-graduação em Entomologia (Pgento) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

À minha família por sempre me incentivar ao “estudo” e por acreditar, entender e apoiar os meus objetivos acadêmicos.

Ao meu noivo, Thiago Demetrius Woiski, pelo amor, carinho, compreensão, paciência, auxílio nas coletas e pelo incessante apoio.

Ao meu orientador, Mario Antonio Navarro da Silva, por ter acreditado no meu potencial em realizar este trabalho, pela orientação, pela compreensão nos momentos de irritação e desânimo, pelo apoio e incentivo constantes.

À Professora Dra. Maria Anice Sallum por confiar no meu trabalho cedendo material para a realização desta dissertação, pela paciência e compreensão em me ensinar técnicas de montagem de lâminas e pelas importantes sugestões.

À Dra. Daniéla Cristina Calado que me ajudou desde a elaboração do projeto, me ensinou os primeiros passos para trabalhar com biologia molecular, sanou minhas dúvidas e me deu sugestões valiosas, além do incessante apoio e incentivo durante este período.

À Professora Dra. Adriana Lacerda Twerdochilib, da UNIBEM (Centro Universitário Bezerra de Menezes), pela ajuda e sugestões no laboratório de Biologia Molecular.

Ao meu querido amigo, Geovan Henrique Corrêa, pela paciência e disponibilidade em me ensinar a trabalhar com o “photoshop”, por me ouvir nos momentos de desespero e por ter sempre uma palavra de conforto e estímulo; pelas longas e boas conversas acompanhadas de um delicioso sorvete, e pelas divertidas e bem sucedidas compras.

Ao amigo Roberto Rossati, pesquisador do Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe, responsável pela obtenção das seqüências de DNA... Quem me ajudou pacientemente a refazer e purificar as PCRs, editar e alinhar as seqüências.

Às minhas grandes amigas Ana Caroline Dalla Bona e Josiane Somariva Prophiro que estiveram comigo desde o início do Mestrado. Cursando disciplinas, apresentando seminários, discutindo textos, jogando conversa fora e fofocando em meio às pipocas nos momentos de descontração... Obrigada pelos conselhos, opiniões e sugestões, mas acima de tudo pela amizade.

Aos colegas e ex-colegas do Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária pela convivência; em especial a Jonny Edward Duque Luna pelas ótimas sugestões e pela ajuda na análise dos dados moleculares.

À Secretaria Estadual de Saúde do Paraná (SESA) em especial a Allan Martins da Silva, pelo envio de material.

Ao Programa *TaxOnline*, principalmente a Lisiane Wendt, pelo auxílio na retirada das fotos.

A todos os colegas do Curso de Pós-graduação em Entomologia pela troca de experiências.

A todos àqueles que torceram por mim, mas que aqui não foram citados, os meus sinceros agradecimentos.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

RESUMO

O Complexo Coronator é constituído de cinco espécies: *Culex coronator* Dyar e Knab, 1906; *Culex ousqua* Dyar, 1918; *Culex usquatus* Dyar, 1918; *Culex usquatissimus* Dyar, 1922 e *Culex camposi* Dyar, 1925. Estas espécies constituem um Complexo devido a semelhança morfológica existente na larva e nas fêmeas destas espécies, sendo a genitália masculina fundamental para distingui-las. O Complexo é amplamente distribuído pela região Neotropical, mas apenas *Culex coronator* e *Culex usquatus* ocorrem no Brasil. A fim de encontrar caracteres morfológicos e moleculares para separar as duas espécies foram observadas as variações morfológicas, que ocorrem nos exemplares do Complexo Coronator, principalmente na genitália dos machos, e analisadas as evidências moleculares de populações oriundas dos Estados do Paraná e São Paulo. Observou-se a morfologia de 35 espécimes fêmeas e 26 espécimes machos com exúvias da larva e da pupa e genitálias dos machos associadas, montadas em lâmina e obtiveram-se 8 seqüências de DNA do gene mitocondrial citocromo oxidase I (COI). Não foram encontradas características morfológicas relevantes para a distinção das espécies nas fêmeas e nos imaturos analisados. No entanto, foram encontradas variações na ornamentação de cerdas do gonocoxito da genitália dos machos de *Cx. usquatus* de São José dos Pinhais (PR) e Pariquera-Açú (SP). Esta é a principal característica utilizada para a separação das espécies que constituem o Complexo Coronator, fato que sugere a existência de uma espécie nova no Paraná. Porém para afirmarmos estes dados são necessários estudos mais aprofundados. A análise das seqüências do gene COI sugerem a existência de 2 clados distintos. O primeiro com espécimes de Porto Rico, São José dos Pinhais (PR) e Campos do Jordão (SP), cujas relações internas não foram resolvidas, possivelmente pelo número reduzido de exemplares analisados. O segundo grupo é formado pelos exemplares de Lucélia (SP). Ambos os clados são monofiléticos com suporte de *bootstrap* acima de 50%. Tanto os dados morfológicos quanto os moleculares sugerem a necessidade de estudos mais aprofundados bem como esforços amostrais do grupo Coronator no Brasil, visto que ainda existem muitas interrogações a serem solucionadas.

Palavras - Chave: Complexo Coronator, COI, morfologia, mtDNA.

SUMMARY

The Coronator Complex comprises five species: *Culex coronator* Dyar and Knab, 1906; *Culex ousqua* Dyar, 1918; *Culex usquatus* Dyar, 1918; *Culex usquatissimus* Dyar, 1922 and *Culex camposi* Dyar, 1925. These species constitute a complex due the existing morphologic similarity in the larva and the females of these species, being the basic male genitalia for distinguish them. The Complex widely is distributed by the Neotropical region, but only *Culex coronator* and *Culex usquatus* occur in Brazil. In order to find morphologic and molecular characters to separate the two species had been observed the morphologic variations that occur in the units of the Coronator Complex, mainly in the males genitalia, and analyzed molecular evidence of populations of States of the Paraná and São Paulo. It was observed morphology of 35 female specimens and 26 male specimens with exuviae of the larva and pupa and males genitalias associates, mounted in blade and had gotten 8 sequences of DNA of the mitochondrial gene cytochrome oxidase subunit I (COI). They had not been found prominent morphologic characteristic for the distinction of the species in the analyzed females and the immature ones. However, variations in the bristles of apex gonocoxite of the male genitalia of *Cx usquatus* of São José dos Pinhais (PR) and Pariquera-Açú (SP) had been found. This is the main characteristic used for the separation of the species that comprise the Coronator Complex, fact that suggests the existence of a new species in the Paraná. However to affirm these data are necessary deepened studies more. The analysis of the sequences of gene COI suggests the existence of 2 groups distinct. The first one with specimens of Porto Rico, São José dos Pinhais (PR) and Campos do Jordão (SP), whose internal relations had not been decided, possibly for the reduced number of analyzed units. As the group is formed by the units of Lucélia (SP). Both the clusters ones are monophyletic group and supported by bootstrap above of 50%. As much the morphologic data how much the molecular ones suggest the necessity of deepened studies more as well as efforts you show of the Coronator group in Brazil, since still many interrogations exist to be solved.

Key - Words: Coronator complex, COI, morphology, mtDNA.

LISTA DE TABELAS

TABELA I – Amostras das populações do Complexo Coronator utilizadas na análise de seqüências do fragmento do gene mitocondrial COI.....	13
TABELA II - Estágios de desenvolvimento conhecidos até o presente momento para cada uma das espécies do Complexo Coronator	18
TABELA III – Número de ramos de cerdas da pupa de <i>Culex (Cux.) coronator</i>	27
TABELA IV – Número de ramos de cerdas de larva de quarto instar de <i>Culex (Cux.) coronator</i>	28
TABELA V – Número de ramos de cerdas da pupa de <i>Culex (Cux.) usquatus</i>	35
TABELA VI - Composição de nucleotídeos de seqüências do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade I de espécies de <i>Culex (Culex)</i>	38

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1 – Distribuição geográfica de *Culex coronator* Dyar & Knab, 1906 de acordo com (WRBU 2008). Disponível em:
http://www.mosquitocatalog.org/species/species_profile.asp?ID=34475
- FIGURA 2 – Distribuição geográfica de *Culex usquatus* Dyar, 1918 de acordo com (WRBU 2008). Disponível em:
http://www.mosquitocatalog.org/species/species_profile.asp?ID=38235
- FIGURA 3 - Distribuição geográfica de *Culex ousqua* Dyar, 1918 de acordo com (WRBU 2008). Disponível em:
http://www.mosquitocatalog.org/species/species_profile.asp?ID=36106
- FIGURA 4 – Distribuição geográfica de *Culex camposi* Dyar, 1925 de acordo com (WRBU 2008). Disponível em:
http://www.mosquitocatalog.org/species/species_profile.asp?ID=34306
- FIGURA 5 - Distribuição geográfica de *Culex usquatissimus* Dyar, 1922 de acordo com (WRBU 2008). Disponível em:
http://www.mosquitocatalog.org/species/species_profile.asp?ID=38227
- FIGURA 6 – *Cx. (Cux.) coronator*, Dyar & Knab, 1906. Campos do Jordão – SP. **A:** Vista geral ♀; **B:** Probóscide; **C:** Vista dorsal do escudo; **D:** Vista lateral dos tergos abdominais; **E:** Vista dorsal dos tergos abdominais.....24
- FIGURA 7 - *Cx. (Cux.) coronator*, Campos do Jordão – SP. Genitália – **A:** vista lateral; **B:** vista medial. Gc: gonocoxito; Gs: gonostilo; LSa: lobo subapical. Escala em milímetros (mm)25
- FIGURA 8 - *Cx. (Cux.) coronator*, pupa. Campos do Jordão – SP. CT: cefalotórax; GL: lobo genital; P: paleta; T: trompa; I-IX: segmentos abdominais. Escalas em milímetros (mm)26
- FIGURA 9 - *Cx. (Cux.) usquatus* Dyar, 1922. São José dos Pinhais – PR. **A.** Vista

geral ♀; B. Probóscide; C. Vista dorsal do escudo; D. Vista dorsal dos tergos abdominais; E. Vista lateral dos tergos abdominais	32
FIGURA 10 - <i>Cx. (Cux.) usquatus</i> , Genitália – A: Pariquera-Açú, vista lateral. B: Pariquera-Açú, vista medial. C: Piraquara, vista medial. D: Piraquara, vista lateral. Gc: gonocoxito; Gs: gonostilo; LSA: lobo subapical.....	33
FIGURA 11 - <i>Cx. (Cux.) usquatus</i> , pupa. São José dos Pinhais - PR. CT: cefalotórax; GL: lobo genital; P: paleta; T: trompa; I-IX: segmentos abdominais. Escalas em milímetros (mm)	34
FIGURA 12 - Topologia gerada na análise de distância, utilizando valores não corrigidos de P, com o algoritmo de Neighbor Joining	40
FIGURA 13 - Topologia gerada na análise de distância empregando o modelo de evolução de nucleotídeos Kimura 2-parâmetros, 1000 replicações no teste “ <i>bootstrap</i> ” (programa MEGA)	41

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Complexo Coronator	1
1.2 Distribuição Geográfica	4
1.3 Aspectos Bioecológicos.....	7
1.4 Importância em Saúde Pública.....	9
1.5 Utilização de ferramentas da biologia molecular para diferenciação de espécies	10
1.6 Justificativa.....	11
2. OBJETIVO	12
2.1 Objetivos específicos	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 Procedência do Material.....	13
3.2 Preparação dos espécimes	13
3.3 Análise baseada em caracteres moleculares	15
3.3.1 Amostras e método de extração de DNA	15
3.3.2 Amplificação de parte do gene COI.....	16
3.3.3 Purificação dos produtos de PCR e reação de sequenciamento	17
3.3.4 Eletroforese	17
3.3.5 Análise das seqüências de DNA	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1 Morfologia.....	18
4.2. Estudos moleculares	38
5. CONCLUSÕES	42
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1. INTRODUÇÃO

A família Culicidae Meigen, 1818 tem em torno de 3500 espécies descritas. As espécies estão distribuídas por todo o mundo, em regiões temperadas e tropicais, sendo que algumas espécies podem atingir o Círculo Polar Ártico. É constituída de duas subfamílias, Anophelinae e Culicinae. Esta, mais diversa, com 43 gêneros agrupados em 11 tribos. No Brasil são registrados os gêneros: *Aedeomyia*, *Aedes*, *Anopheles*, *Chagasia*, *Coquillettia*, *Culex*, *Deinocerites*, *Haemagogus*, *Isostomyia*, *Johnbelkinia*, *Limatus*, *Lutzia*, *Mansonia*, *Onirion*, *Orthopodomyia*, *Psorophora*, *Runchomyia*, *Sabethes*, *Shannoniana*, *Toxorhynchites*, *Trichoprosopon*, *Uranotaenia*, *Wyeomyia*. O monofiletismo de Culicidae foi comprovado pelos estudos de Harbach & Ktching (1998), mas existem problemas nas relações evolutivas internas do grupo.

O gênero *Culex* Linnaeus, 1758 constitui um dos maiores grupos dentro da Família Culicidae com quase 800 espécies descritas, distribuídas em 27 subgêneros, dos quais oito ocorrem no Brasil: *Culex*, *Aedinus*, *Melanoconion*, *Phenacomyia*, *Microculex*, *Carrollia*, *Anoedioporpa*, *Tinolestes* (WRBU 2008). As espécies do grupo se caracterizam principalmente pela presença de púlvilo e ausência de cerdas pré e pós-espiraculares.

Apesar da representatividade do gênero quanto ao número de espécies descritas, verifica-se um número reduzido de fêmeas com características marcantes e pouco variáveis. Desta forma, a identificação de fêmeas coletadas na fase adulta, com base na morfologia externa é dispendiosa e difícil para pessoas pouco familiarizadas com o grupo. Um problema que dificulta um conhecimento maior do gênero é que as chaves dicotômicas existentes, para as fêmeas, não são suficientemente seguras. Além destas dificuldades, muitos adultos quando capturados, perdem algumas características que são de extrema importância para sua identificação, como cerdas e escamas. As genitálias masculinas dos representantes do gênero *Culex* apresentam características que permitem a identificação correta das espécies. Desta maneira as estruturas da genitália masculina representam método mais adequado para a identificação específica (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994).

1.1 O COMPLEXO CORONATOR

O Complexo Coronator compreende cinco espécies válidas: *Culex coronator* Dyar e Knab, 1906; *Culex ousqua* Dyar, 1918; *Culex usquatus* Dyar, 1918; *Culex usquatissimus* Dyar, 1922 e *Culex camposi* Dyar, 1925. As espécies do Complexo Coronator são distinguíveis pelo aspecto do ápice do gonocoxito e da ornamentação cerdosa do lobo subapical da genitália masculina, no entanto os caracteres morfológicos das fêmeas adultas e a quetotaxia das larvas não são utilizáveis para esta separação (Bram 1967; Forattini 2002). Desta forma, grande parte dos trabalhos de levantamento de fauna de mosquitos, realizados no Brasil, traz na lista de espécies apenas um reconhecimento ao Grupo Coronator, referindo-se a *Culex coronator* + *Culex usquatus*. Os trabalhos de Gomes & Forattini (1990); Urbinatti *et al.* (2001); Taipe-Lagos & Natal (2003); Cardoso *et al.* (2005) são alguns exemplos.

Culex coronator foi descrito por Dyar & Knab, 1906 a partir do estágio larval, tendo como base caracteres da cápsula cefálica e do sifão respiratório. A localidade tipo é Saint Joseph, Trinidad. *Culex ousqua* e *Culex usquatus* foram descritos por Dyar (1918) e Dyar (1918) respectivamente. Dyar (1918) destaca aspectos morfológicos do macho, da fêmea e do estágio larval de *Culex usquatus* e *Culex ousqua* e assinala a semelhança entre as duas espécies e delas com *Culex coronator* e *Culex (Culex) surinamensis* Dyar (1918). Dyar 1922 descreve o macho de *Culex usquatissimus*. A descrição de *Culex usquatus*, *Culex ousqua* e *Culex usquatissimus* foi baseada em material coletado no Panamá e todas as três espécies foram consideradas pelo autor como variações morfológicas de *Culex coronator*. Dyar (1925) observou que alguns mosquitos que ocorriam no Equador apresentavam variações em relação à *Culex coronator*, nomeando estes como uma nova “raça” de *Culex coronator* denominada *Culex camposi*.

Bonne & Bonne-Wepster (1925) fizeram a redescrição da fêmea, do macho e da larva de *Culex coronator* utilizando amostras do Suriname. Considerando as observações feitas por Dyar em anos anteriores os autores citaram *Culex usquatus*, *Culex ousqua* e *Culex usquatissimus* e apontaram possíveis variações nas cerdas do lobo apical e do ápice da peça basal (gonocoxito) destas espécies em relação à *Culex coronator*.

Root (1927) realizou coletas de mosquitos do gênero *Culex*, no Brasil, nos

Estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais e destacou a presença de duas formas de *Culex coronator* no país, sendo que os adultos seriam muito semelhantes quanto à coloração e características do mesosoma (falossoma). No entanto, as duas formas diferiam na estrutura do lobo apical e da peça basal (gonocoxito).

Dyar (1928) redescreveu a fêmea, o macho e a larva de *Culex coronator*, baseado utilizando espécimes coletados na América do Norte, Central e do Sul (Maracay, Aragua, Panamá, Venezuela, Argentina, Suriname e Brasil).

Anduze (1943) descreveu *Culex albertoi* e considerou que a nova espécie equivaleria à descrição de Root (1927) sobre a forma atípica de *Culex coronator*. Lane (1951) examinando tipos de Culicidae Neotropical nas coleções do National History Museum de Londres e do National Museum of Natural History de Washington, D. C. colocou *Culex albertoi* na sinonímia de *Culex coronator*. Lane (1953) redescreveu a fêmea, o macho e a larva de *Culex coronator* e descreveu pela primeira vez a pupa da espécie.

Vargas & Martinez-Palacios (1954) descreveram *Culex mooseri* como subespécie de *Culex coronator*. Stone *et al.* (1959), em seu catálogo de mosquitos do Mundo, consideraram *Culex coronator* como espécie válida, *Culex ousqua*, *Culex usquatus*, *Culex usquatissimus* e *Culex albertoi* como suas sinonímias e *Culex camposi* e *Culex mooseri* como subespécies de *Culex coronator*. Belkin *et al.* (1965) adotaram a classificação de Stone *et al.* (1959).

Forattini (1965) que se baseou na tese de Bram, 1964 (dados não publicados) foi o primeiro autor a citar o Complexo Coronator, que seria composto por *Culex coronator*, *Culex ousqua*, *Culex usquatus*, *Culex usquatissimus*, *Culex camposi* e *Culex covagarciai*. Estas espécies constituem um complexo pela semelhança morfológica apresentada pelas fêmeas e imaturos destas espécies. Todas as seis espécies são consideradas válidas devido às evidências morfológicas da genitália masculina e registros de distribuição geográfica.

Bram (1967) analisou a genitália de 227 espécimes pertencentes ao Complexo Coronator, e considerando as diferenças morfológicas e a distribuição deste taxa, considerou como espécies válidas *Culex coronator*, *Culex usquatus*, *Culex ousqua*, *Culex usquatissimus* e *Culex camposi*. *Culex albertoi* é considerada sinônimo de *Culex ousqua* e *Culex mooseri* sinônimo de *Culex coronator*. Stone (1967) no suplemento III do Catálogo de Mosquitos do Mundo e Forattini (2002) adotaram a classificação de Bram (1967). Forattini (2002) não considera *Culex*

covagarciai como pertencente ao Complexo Coronator. Os espinhos presentes no sifão respiratório desta espécie não são evidentes e fortes como nas demais espécies do Complexo Coronator, além disto, a genitália de *Culex covagarcia* é bastante característica.

1.2 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

De acordo com Bram (1967) e Forattini (2002), o Complexo Coronator encontra-se amplamente distribuído na região Neotropical. Porém cada uma das espécies apresenta distribuição particular. A distribuição geográfica de cada espécie do Complexo Coronator está apresentada nas figuras 1, 2, 3, 4 e 5, de acordo com WRBU (2008). *Culex coronator* é a espécie que apresenta a distribuição mais ampla, ocorrendo desde o sudeste dos Estados Unidos à Argentina. Os registros mais recentes são de Louisiana (Debboun *et al.* 2005), Florida (Smith *et al.* 2006), Mississippi (Goddard *et al.* 2006) e Alabama (McNelly *et al.* 2007). Almirón *et al.* (1995) citam Bahia Blanca (Província de Buenos Aires), Argentina como o limite sul da distribuição de *Culex coronator*. *Culex ousqua*, *Culex usquatus*, *Culex usquatissimus* e *Culex camposi* ocorrem no México e nas Américas Central e do Sul. No Brasil existem registros apenas para *Culex coronator* e *Culex usquatus* (WRBU 2008).



Figura 1: Distribuição geográfica de *Culex coronator* Dyar & Knab, 1906 de acordo com (WRBU 2008). Disponível em:

http://www.mosquitocatalog.org/species/species_profile.asp?ID=3447



Figura 2: Distribuição geográfica de *Culex usquatus* Dyar, 1918 de acordo com (WRBU 2008). Disponível em:

http://www.mosquitocatalog.org/species/species_profile.asp?ID=3823



Figura 3: Distribuição geográfica de *Culex ousqua* Dyar, 1918 de acordo com (WRBU 2008). Disponível em:

http://www.mosquitocatalog.org/species/species_profile.asp?ID=3610



Figura 4: Distribuição geográfica de *Culex camposi* Dyar, 1925 de acordo com (WRBU 2008). Disponível em:

http://www.mosquitocatalog.org/species/species_profile.asp?ID=3430



Figura 5: Distribuição geográfica de *Culex usquatissimus* Dyar, 1922 de acordo com (WRBU 2008). Disponível em: http://www.mosquitocatalog.org/species/species_profile.asp?ID=3822

1.3 ASPECTOS BIOECOLÓGICOS

Os mosquitos do gênero *Culex*, subgênero *Culex* demonstram se beneficiar das modificações ambientais de natureza antrópica, colonizando tanto ambientes naturais quanto artificiais; isso se deve ao fato de os indivíduos deste grupo não serem muito exigentes quanto à água utilizada para oviposição. Os adultos procuram abrigo próximo aos criadouros ou às fontes de alimentação (Gomes & Forattini, 1990).

Os imaturos, das espécies do Complexo Coronator podem se desenvolver nos mais diversos tipos de criadouros, sejam eles naturais ou artificiais (Bonne & Bonne-Wepster 1925; Arnett 1948; Carpenter & LaCasse 1955; Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994; Lopes & Lozovei, 1995; Forattini 2002; Silva 2002).

Em geral os imaturos têm sido encontrados em poças semi-permanentes no

solo, ao longo de estradas pouco movimentadas e ferrovias, impressões de pneus e patas de animais que acumulam água das chuvas e em valas de drenagem (Dyar & Knab 1906; Dyar 1928; Antunes 1937; Almirón & Brewer 1996; Debboun *et al.* 2005). Ocorrem também em terrenos alagados pelo extravasamento de riachos, áreas de pântano ou mangue. Dentre os criadouros artificiais, vale destacar o encontro de imaturos em uma vasta variedade de recipientes dos quais se destacam os bebedouros de animais e tanques domésticos. Komp (1936) observou que as larvas encontradas em ocos de árvores apresentam o sifão profundamente escurecido.

A água dos criadouros pode ser límpida ou turva, com ou sem vegetação, sendo que as larvas podem viver em água muito poluída. Pecor *et al.* (2002), em Belize, encontraram imaturos de *Culex coronator* em plantação de arroz, com água parada de aspecto leitoso. Os criadouros podem ter o fundo recoberto por barro, com matéria orgânica em decomposição ou rochas. As formas imaturas foram encontradas, inclusive, em criadouros situados próximos ao mar. Em relação à luminosidade, os habitats aquáticos podem ser representados por poças ensolaradas, parcial ou inteiramente sombreadas (Root 1927; Antunes & Lane 1933; Arnett 1948; Arnett 1950; Pecor *et al.* 2002). Alfonzo *et al.* (2005) no oeste da Venezuela associou os imaturos de *Culex coronator*, a locais parcialmente sombreados e florestas.

Quanto aos adultos, as fêmeas podem apresentar diferentes preferências alimentares, ou seja, são tanto antropofílicas como zoofílicas, se alimentando do sangue de mamíferos ou de aves (Lane, 1953). Forattini *et al.* (1995) dizem que em geral as espécies do gênero *Culex* são ornitofílicas. Dyar & Knab (1906), Bonne & Bonne-Wepster (1925), Dyar (1928) e Komp (1936) consideravam que os adultos de *Culex coronator* não se alimentavam de sangue humano. Dyar (1918) relatou a presença de *Culex usquatus* próximo às habitações humanas. Antunes & Lane (1933) capturaram a espécie em locais utilizados para a criação de suínos e bovinos, no Estado de São Paulo. Antunes (1937) encontrou focos das espécies próximos de habitações humanas, na Colômbia, sendo que algumas fêmeas foram capturadas com isca humana. Arnett (1948) no Panamá registrou *Culex coronator*, em cavalos. Belkin & Heinemann (1976) relataram o encontro de *Culex coronator* em aves. Almirón & Brewer (1995) coletaram *Culex coronator* em aves e coelhos.

Lopes *et al.* (1995) observaram tendência de aumento populacional de *Culex coronator* na primavera. No entanto, Forattini *et al.* 1995 notaram que a distribuição

mensal do Grupo Coronator foi regular não sendo influenciada por fatores climáticos ambientais ao longo do ano. A espécie apresentou comportamento silvestre. Registros publicados na literatura por diversos pesquisadores falam da adaptação de espécies do Grupo Coronator ao ambiente antrópico (Lopes & Lozovei 1995; Silva 2002; Barbosa *et al.* 2003).

1.4 IMPORTÂNCIA EM SAÚDE PÚBLICA

A capacidade vetora de *Culex coronator* precisa ser esclarecida, no entanto existem evidências que demonstram o potencial do inseto para transmitir agentes infecciosos. Hammon & Reeves (1943) em estudo conduzido em laboratório demonstraram a competência vetora da espécie para transmitir o Saint Louis Encephalitis Virus (SLEV – *Flavivirus* da Família Flaviviridae), na Califórnia (EUA). Anderson *et al.* (1957) encontraram espécimes de *Culex coronator* naturalmente infectadas por linhagens de SLEV em Trinidad. Scherer *et al.* (1971) isolaram o vírus da Encefalomielite Equina Venezuelana (VEE - *Alphavirus* da família Togaviridae) de *Culex coronator* no México. No entanto, Turell *et al.* (2000) observaram que populações de *Culex coronator* do Peru não são susceptíveis ao VEE. Turell *et al.* (2005) isolaram o Vírus Ilhéus e o SLEV de amostras de *Culex coronator* provenientes da Amazônia Peruana, nordeste do Peru próximo a Iquitos. A espécie mostrou-se susceptível ao SLEV em laboratório. *Culex coronator* está entre as mais de 60 espécies de mosquitos capturadas nos Estados Unidos e encontradas naturalmente infectadas pelo West Nile Vírus (WNV - *Flavivirus* da Família Flaviviridae) no período que compreende 1999 a 2006 (CDC, 2008).

No Brasil, Fernandez *et al.* (2000) tentaram isolar partículas do vírus da encefalomielite equina de amostras de *Culex coronator* provenientes do Estado do Paraná. Porém, os autores não encontraram nenhum sorotipo do vírus nas amostras analisadas. Santos *et al.* (2006) relataram que *Culex coronator* está infectado com SLEV na Amazônia Brasileira.

Diante destas evidências, o esclarecimento taxonômico do Complexo Coronator torna-se importante na prevenção de alguns arbovírus.

1.5 UTILIZAÇÃO DE FERRAMENTAS DA BIOLOGIA MOLECULAR PARA DIFERENCIAÇÃO DE ESPÉCIES

A fim de elucidar o problema da identificação de espécies crípticas, vários métodos têm sido empregados, dentre os quais, a análise do bandeamento de cromossomos politênicos e tipagem de enzimas por meio de perfis de migração eletroforética. Porém estas são técnicas que apresentam muitas limitações (Walton *et al.* 1999; Singh *et al.* 2004; Ruiz *et al.* 2005; Kumar *et al.* 2007). Desta forma, métodos baseados na análise de DNA têm sido desenvolvidos nas últimas décadas. As regiões do genoma que têm sido amplamente estudadas e utilizadas para a distinção de espécies crípticas e em análises filogenéticas são o rDNA e o mtDNA, pois são de fácil amplificação e sequenciamento, têm iniciadores que podem ser aplicados à várias espécies de insetos e grande número de seqüências estão disponíveis em bancos de dados para comparações (Besansky & Fahey, 1997).

O esclarecimento taxonômico desses complexos pode ajudar na solução de problemas epidemiológicos relacionados à transmissão de vários patógenos e nas medidas de controle, já que diferentes espécies dentro de um complexo podem exibir diferenças na ecologia, apresentar variações quanto à capacidade e competência vetora, e na resposta a medidas de controle.

Regiões não codificantes, como a região de controle do DNA mitocondrial, íntrons de genes nucleares e espaçadores transcritos internos do rDNA sofrem pressões muito pequenas de seleção e tendem a evoluir muito rapidamente e são normalmente utilizadas para diferenciação intra-específica ou de espécies muito proximamente relacionadas. O espaçador interno, ITS2 e o gene mitocondrial COI promovem uma forte ferramenta para estudos de variação intra-específica e filogenias de espécies crípticas (Cruickshank, 2002).

O genoma mitocondrial é haplóide devido sua herança ser estritamente materna, por isso não está submetido a processos de recombinação (Moritz *et al.* 1987). Os genes mitocondriais estão presentes em múltiplas cópias e são mais facilmente amplificados do que os genes nucleares (Cook *et al.* 2005). O citocromo oxidase I (COI) é o gene mais conservado nas seqüências de aminoácidos sendo então, vantajoso para estudos taxonômicos (Knowlton & Weigt 1998 apud Kumar *et al.* 2007).

1.6 JUSTIFICATIVA

O histórico do Complexo Coronator indica que desde a descrição de *Culex coronator* e subsequentemente das demais espécies que compõe o complexo, os autores procuram por caracteres para diferenciar os taxa morfológicamente. No entanto, caracteres dos ovos e da quetotaxia das pupas nunca foram estudados em detalhes. Para a obtenção de ovos há a necessidade de coletar indivíduos em campo e trazê-los para o laboratório. No entanto, para identificação correta de espécies torna-se necessário obter adultos machos e fêmeas, o que é bastante desafiador. As estruturas da armadura do cibário de *Culex coronator* foram estudadas de indivíduos provenientes de Santa Clara, San Carlos, Alajuela e La Selva, Sarapiquí, Heredia, Costa Rica por Boza & Vargaz (2006), impossibilitando comparações interespecíficas. Desde a década de 1960 não são realizados estudos sistemáticos ou sobre a distribuição das espécies do Complexo Coronator, sendo esta a atual situação do grupo. Os estudos detalhados sobre a quetotaxia das larvas e das pupas, bem como o emprego de técnicas de biologia molecular representam ferramentas importantes para auxiliar na identificação das espécies que constituem o Complexo Coronator.

2. OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo observar as variações morfológicas, que ocorrem nos exemplares do Complexo Coronator, principalmente na genitália dos machos assim como evidências moleculares de populações oriundas dos Estados do Paraná e São Paulo.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar sistematicamente as características morfológicas de adultos e imaturos dos espécimes encontrados.
- Sequenciar parte do gene mitocondrial Citocromo Oxidase Subunidade I (COI) de exemplares do Complexo Coronator.
- Redescrever e/ou descrever os estágios de larva, pupa e adulto dos espécimes encontrados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. PROCEDÊNCIA DO MATERIAL

Para o desenvolvimento deste estudo, foram obtidos por empréstimo, exemplares com procedência de instituições nacionais, listadas abaixo, com a respectiva sigla e o nome do curador e/ou intermediário do empréstimo entre parênteses.

DZUP - Coleção de Entomologia Padre Jesus Santiago Moure, Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil – (Mário Antonio Navarro da Silva).

FSP – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil – (Maria Anice Mureb Sallum).

Para avaliar a variabilidade genética do grupo Coronator foram coletados exemplares do Complexo Coronator nos Estados do Paraná e São Paulo (Tabela I).

Tabela I. Amostras das populações do Complexo Coronator utilizadas na análise de seqüências de DNA do gene mitocondrial COI.

Localidade/ n° indivíduos	Códigos	Latitude (N-S)	Longitude (W-E)
São José dos Pinhais (PR)/ 1	SJP08	25° 44' 16"	49° 16' 08"
Porto Rico 02 (PR)/ 1	PR02-02	22°47'16"	53°16'38"
Porto Rico 04 (PR)/ 2	PR04-12 PR04-01	22°47'16"	53°16'38"
Campos do Jordão (SP)/ 2	CJ01-39 CJ01-38	22°45'50"	45°30'87"
Lucélia (SP)/ 2	66 e 72	21°37'07,9"	50°56'24,0"

3.2. PREPARAÇÃO DOS ESPÉCIMES

Para o estudo morfológico os exemplares adultos foram montados em triângulos brancos espetados em alfinetes entomológicos. Os adultos foram observados com o auxílio de estereó microscópio. As genitálias masculinas e femininas foram montadas em lâminas permanentes da seguinte forma: com o auxílio de tesoura fina a genitália foi cortada na altura do segmento abdominal VII e então colocada em banho de KOH 20% por 12 horas. Após este período o KOH foi removido e substituído por álcool acético 20%. A seguir trocou-se o álcool acético por outro adicionando uma gota de fucsina ácida. Posteriormente faz-se a desidratação da peça em série de álcoois de diferentes concentrações, 80, 90, 95% e absoluto cada um por 10 minutos. Depois se retirou o álcool absoluto e adicionou-se óleo de cravo (Eugenol). A peça fica mergulhada em Eugenol por duas horas. A montagem foi feita com Bálsamo do Canadá, entre lâmina e lamínula, procedendo as devidas dissecções, específicas para cada gênero. No gênero *Culex* as peças que compõe a genitália (gonocoxito, falossoma, proctiger, tergitos IX e X) foram separadas com o auxílio de um micro estilete, para facilitar a visualização e a ilustração de todas as estruturas.

Para os imaturos também foram confeccionadas lâminas permanentes. As exúvias foram preservadas em álcool 80%. Do álcool 80%, passadas para o 90%, 95% e absoluto sucessivamente, cada um por 10 minutos. O álcool absoluto foi substituído por óleo de cravo (Eugenol) por 1 hora. As exúvias foram montadas em Bálsamo do Canadá entre lâmina e lamínula, seguindo as técnicas para montagem de exúvias de larvas e pupas de Culicidae.

Foram realizados desenhos das seguintes estruturas: Larva - cápsula cefálica vista dorsal e ventral, antena, dorsomente, segmentos abdominais VIII-X e sifão respiratório. Pupa - cefalotórax, segmentos abdominais I-VIII, paleta natatória. Genitália masculina - gonocoxito, gonostilo, edeago, paraproctos e cerca. O reconhecimento das estruturas e as ilustrações foram realizadas com auxílio de um microscópio ZEISS, Standard 20 acoplado com câmara-clara. Para a confecção dos desenhos foi estabelecido um padrão de aumento para cada estrutura. A dimensão dos desenhos foi registrada através da escala que acompanha o microscópio.

As fotos das espécies foram obtidas através da câmera Leica DFC 500,

acoplada à Lupa Leica MZ16. O alinhamento das imagens, realizado pelo Software Auto-Montage Pro (Syncroscopy) do “Projeto Taxon *line* Rede Paranaense de Coleções Biológicas”, do Departamento de Zoologia. A arte final dos desenhos e fotos foi realizada no programa ADOBE PHOTOSHOP CS versão 8.0.

Na lista de material examinado, foi citado o País, Estado, localidade, data de coleta, coletor, sexo (representado pelos símbolos macho (♂) e fêmea (♀)) e a sigla da coleção à qual o exemplar pertence.

A terminologia utilizada é aquela proposta por Belkin *et al.* (1970), modificada por Harbach & Knight (1980); Forattini (1996) e Forattini (2002).

Foram utilizadas duas letras para abreviar o nome dos gêneros e três para os subgêneros, conforme proposto por Reinert (2001). Reinert (1975) preconiza a utilização de abreviações genéricas e subgenéricas curtas e padronizadas, a fim de facilitar o reconhecimento de cada táxon e reduzir o espaço impresso em tabelas, listas, descrições, etiquetas de identificação, estudos computacionais, entre outras vantagens.

3.3. ANÁLISE BASEADA EM CARACTERES MOLECULARES

3.3.1. Amostras e Método de Extração de DNA.

Para as análises moleculares foram utilizadas amostras de acordo com a Tabela I. Para evitar riscos de contaminação das amostras com DNA de parasitas ou com sangue de hospedeiros, foram utilizados apenas indivíduos adultos machos obtidos em laboratório e que não receberam nenhum tipo de alimento. No momento anterior à extração, a genitália masculina foi retirada e montada em lâmina permanente. Procedimento adotado para facilitar a busca por caracteres morfológicos.

A extração de DNA foi realizada segundo protocolo de Cheung *et al.* (1993) modificado por Carvalho & Vieira (2001) e por França (2005). - Exemplares adultos foram macerados individualmente em tubo de microcentrífuga de 1.5ml, contendo 160 µl de tampão de extração (Tris-HCl 200 mM, pH 8,0, NaCl 2M, EDTA 70 mM). Em seguida adicionou-se 20 µl de SDS 10%. A solução então foi homogeneizada e incubada a 60°C por 1 hora, sendo então resfriada a temperatura ambiente. Na

seqüência foi adicionado 50 µl de clorofórmio: álcool isoamílico na proporção de 24:1 e a solução centrifugada durante 15 min a 13000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5ml, onde adicionou-se 80 µl de acetato de amônio 7,5M e 300 µl de etanol 96%. Esta solução foi homogeneizada por inversão e permaneceu por 2 horas no freezer para precipitação do DNA. Depois de retirada do freezer a amostra passou por 15 min de centrifugação a 13000 rpm e em seguida o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 70%. A amostra então foi centrifugada por mais 5 min e seca em estufa a 37°C. Depois de seco o DNA foi ressuspensão em 50 - 100 µl de TE (Tris e EDTA) estéril e armazenado a -20°C.

3.3.2 Amplificação de parte do gene COI

As reações de amplificação foram conduzidas em volume total de 25 µl, contendo 1X tampão, 1,5mM de MgCl₂, 0,2µl (0,2 mM) de cada dNTP (BIOTOOLS) 10pmol de cada iniciador, 0,5 - 1µl de DNA genômico (20ng), 2,5U de *Taq* DNA Polimerase (BIOTOOLS) e água Milli-Q estéril para completar o volume final. Para amplificar a porção do gene COI foram utilizados os iniciadores (*primers*) de acordo com Simon *et al.* (1994) C1-J-1718 (5' GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC 3') e C1-N-2191 (5' CCCGGTAAAATTAATAAATAACTTC 3'). A PCR foi realizada em termociclador *Eppendorf* PTC- 100TM [MJ Research, Inc. Watertown, MA], utilizando-se os seguintes ciclos de temperatura: desnaturação inicial a 94°C por três minutos, 40 ciclos de desnaturação a 94°C por quarenta segundos, anelamento a 48°C por quarenta segundos e extensão a 72°C por quarenta segundos, e extensão final a 72°C por dez minutos.

3.3.3 Purificação dos produtos de PCR e reação de sequenciamento.

Os produtos de PCR foram purificados utilizando GFXTM PCR DNA Purification Kit. A quantidade de DNA presente nas amostras foi determinada através de quantificação em gel de agarose 2% através de comparação com

marcador Low Mass DNA Ladder (AMRESCO). Após purificação e quantificação, as amostras foram encaminhadas para a Genomic Engenharia Molecular Ltda, onde foi realizado o sequenciamento.

3.3.4 Eletroforese

Após a reação de restrição, os fragmentos obtidos foram fracionados em gel de agarose 2%, corados com solução de brometo de etídio e fotografados sob luz ultravioleta. Como marcadores de peso molecular foram utilizados: 1Kb DNA Ladder (AMRESCO), 100pb DNA Ladder (AMRESCO).

3.3.5 Análise das seqüências de DNA

As seqüências de DNA foram alinhadas e editadas através dos programas *Seqman* e *EditSeq* (Lasergene - DNASTAR). Análises filogenéticas e moleculares foram conduzidas utilizando o programa MEGA 4.1 “Molecular Evolutionary Genetics” Kumar *et al.* (2008). As relações entre as espécies foram avaliadas pelo método *Neighbor Joining* (NJ) e parcimônia Saitou & Nei (1987) com distância utilizada a distância Kimura 2-parâmetros (K2P) com o gamma ($\alpha=1$). Na análise de parcimônia foi realizada uma busca heurística para encontrar todas as árvores mais parcimoniosas. O teste de *Bootstrap* com 1000 réplicas foi aplicado para estimar o índice de consistência da árvore de NJ (Felsenstein, 1985).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 MORFOLOGIA

Foram feitas as redescritções da larva, pupa, adultos fêmea e macho de

Culex coronator, larva e macho de *Culex usquatus* e as descrições da fêmea e da pupa da última espécie.

As informações, referentes aos estágios descritos, localidade tipo e Coleção na qual o exemplar tipo de *Culex coronator*, *Culex usquatus*, *Culex ousqua*, *Culex usquatissimus* e *Culex camposi*, está depositado, estão descritas na tabela II.

Tabela II. Estágios de desenvolvimento conhecidos até o presente momento para cada uma das espécies do Complexo Coronator.			
	Estágios descritos	Localidade Tipo	Museu
<i>Cx. coronator</i>	Larva, Pupa, ♂ e ♀	St. Joseph - Trinidad	USNM ¹
<i>Cx. usquatus</i>	♂ e Larva	Panamá	USNM ¹
<i>Cx. ousqua</i>	♂ e Larva	Panamá	USNM ¹
<i>Cx. camposi</i>	♂	Ecuador	USNM ¹
<i>Cx. usquatissimus</i>	♂ ♀	Toro Point - Panamá	USNM ¹

¹USNM - United States National Museum, Washington, D. C., USA.

Complexo Coronator

Forattini, 1965: 121-129 (livro); Bertram, 1971: 745 (arbovirus); Forattini *et al.* 1987: 190; Gomes & Forattini, 1990: 395, 396 (ecologia); Lopes & Lozovei, 1995: 184, 187, 189 (ecologia); Lopes *et al.* 1995: 239 (ecologia); Forattini *et al.* 1995: 272-276 (ecologia); Urbinatti *et al.* 2001: 463-465 (ecologia); Calado & Navarro-Silva, 2001: 53, 54, 56, 57, 58 (ecologia); Silva, 2002: 32-34 (ecologia); Taípe-Lagos & Natal, 2003: 277, 278 (ecologia); Barbosa *et al.* 2003: 60-62 (ecologia); Barghini *et al.* 2004: 616, 617 (ecologia); Cardoso *et al.* 2005: 279 (checklist); Marcondes *et al.* 2006: 3, 4 (ecologia); Smith *et al.* 2006: 330 (novo registro).

Culex coronator Dyar & Knab, 1906.

(Figs. 6,7 e 8)

Culex coronator Dyar & Knab, 1906: 215 localidade tipo: Sait Joseph, Trinidad e Tobago.

Culex mooseri Vargas & Martinez Palácios, 1954: 33-37, localidade tipo: Campeche, México.

Dyar 1918d: 121, 122 (descrições de novas espécies); Dyar, 1922b: 18 (notas sobre genitália masculina); Bonne & Bonne-Wepster, 1925: 226-230 (redescrção); Dyar, 1925: 28 e 29 (mosquitos do Equador); Root, 1927: 576 e 577 (notas sobre

morfologia e biologia); Dyar, 1928: 387 e 388 (redescrição); Edwards, 1932a: 205 (catálogo); Antunes & Lane, 1933: 95 e 96 (distribuição geográfica); Antunes, 1937: 78 (nota sobre criadouros); Anduze, 1941: 832 (lista de espécies); Anduze, 1941:15 (ecologia); Anduze, 1943: 193 e 195 (descrição); Hammon & Reeves, 1943: 241, 245, 246, 252, 253 (transmissão viral); Arnett, 1948: 180 (notas sobre distribuição e biologia); Arnett, 1950: 106 (notas sobre distribuição e biologia); Martinez Palácios, 1950: 183, 184, 186 e 189 (checklist); Lane, 1951: 334 (lista de sinonímias); Vargas, 1952: 173 (checklist); Lane, 1953: 316, 318, 319, 331-334 (revisão); Vargas & Martínez Palacios, 1954: 33-37 (descrição); Carpenter & LaCasse, 1954: 277-279 (revisão); Reyes, 1955: 57 (lista de espécies); Duret & Barreto, 1956: 84 (notas de distribuição); Stone *et al.* 1959: 245 (catálogo); Belkin *et al.* 1965: 21, 37, 51, 63, 69, 71e 74 (mosquitos da América Central); Forattini, 1965: 121,122, 123 e 126 (livro); Bram, 1967: 45-53 (revisão); Stone, 1967: 216 (catálogo); Xavier & Mattos, 1970: 446 (notas de distribuição); Belkin & Heinemann, 1976: 276, 280, 281, 282, 283, 285, 286 (checklist); Forattini *et al.* 1987: 190 (ecologia); Forattini *et al.* 1988: 533 (catálogo); Lopes *et al.* 1993: 329-332 (ecologia); Teodoro *et al.* 1994: 109-112 (ecologia); Almirón & Brewer, 1995: 108 (ecologia); Forattini *et al.* 1995: 271 e 272 (ecologia); Ahid & Lourenço-de-Oliveira, 1999: 562(ecologia); Navarro & Liria, 2000: 76, 79, 80 (filogenia); Pecor *et al.* 2000: 212 (checklist); Pecor *et al.* 2002: 244, 257, 259, 261, 267, 270, 271(checklist); Lopes *et al.* 2002: 468 (ecologia); Rossi & Martinez, 2003: 471(checklist); Vasconcelos *et al.* 2003: 61 (isolamento viral); Fé *et al.* 2003: 345-347 (ecologia); Jones *et al.* 2004: 351 e 352 (ecologia); Calderón-Arguedas *et al.* 2004: 133-135 (ecologia); Alfonzo *et al.* 2005: 280-282 (ecologia); Turrel *et al.* 2005: 894 e 895 (isolamento viral); Debboun *et al.* 2005: 455-457 (novo registro); Boza & Vargas, 2006: 815-820 (descrição do cibário); Santos *et al.* 2006: 62; Smith *et al.* 2006, 330-332 (novo registro); Reyes-Villanueva *et al.* 2006: 410-413 (ecologia); Goddard *et al.* 2006: 622-625 (novo registro); McNelly *et al.* 2007: 473-475 (novo registro); Barata *et al.* 2007: 377-379 (ecologia); Mackay *et al.* 2008: 30, 32 e 34 (detecção viral).

Fêmea: (Fig. 6) Mosquitos de pequeno a médio porte. *Cabeça:* Probóscide predominantemente escura, apresentando mancha de escamas claras na face ventral, um pouco além do meio. Palpos curtos de coloração predominantemente

escura. Vértice e occipício cobertos de escamas de tons dourados, estreitas e por escamas eretas escuras e bifurcadas no ápice; Margem do occipício coberta por escamas brancas. *Tórax*: Escudo coberto de escamas marrom-bronzeadas com duas pequenas manchas arredondadas de escamas douradas situadas na região média do mesonoto. Cerdas acrosticais, dorsocentrais, da fossa do escudo, pré-escutelares e supra-alares finas e alongadas, de coloração marrom-escuro com brilho dourado; Cerdas do lobo mediano do escutelo e dos laterais, fortes e longas. Cerdas pré e pós espiraculares ausentes. Tegumento da pleura torácica variando de marrom à marrom-claro. Escamas mesepimerais superiores (EMms), escamas pré-alares inferiores (EPali), escamas mesocatepisternais inferiores (EMsi) e escamas mesepimerais anteriores (EMma), presentes. Cerdas mesepimerais superiores (SMms), cerdas pré-alares (SPal), mesocatepisternais inferiores de cor marrom, finas e alongadas. *Pernas*: Predominantemente escuras. Fêmur posterior com uma ampla mancha ventral de escamas branco-prateadas. Articulações tíbio-tarsal com marcação clara. Articulações dos tarsômeros das pernas posteriores com anel de escamas claras, formando um anel. *Asas*: Veias costa, subcosta e radial, densamente cobertas de escamas escuras e mais alargadas do que nas demais. *Abdômen*: Tergos recobertos predominantemente por escamas escuras, com discreto brilho metálico; tergos II – V com uma faixa estreita basal de escamas claras. Lateral dos tergos VI – VIII com uma pequena mancha de escamas claras na porção lateral.

Macho: Terço final da probóscide com anel de escamas claras; Vértice e occipício cobertos de escamas douradas, estreitas com escamas eretas, pretas, bifurcadas no ápice, escamas da margem ocular brancas. *Tórax*: Escudo coberto de escamas bronzeadas com brilho dourado apresentando duas áreas glabras estreitas, que se estendem do extremo anterior até a porção anterior da área pré-escutelar; cerdas acrosticais, dorsocentrais, pré-escutelares e supra-alares alongadas e finas, de coloração marrom-escuro com brilho dourado. Escutelo com as cerdas dos lobos mediano e laterais alongadas, finas, com brilho dourado. Tergos abdominais com uma faixa basal de escamas branco-prateadas. Fêmures com a face ventral coberta de escamas brancas formando uma ampla mancha ventral, quase alcançando a porção apical; Articulações tíbio-tarsal e dos tarsômeros das pernas posteriores, com um anel de escamas brancas. *Asas*: Escamas da costa

mais escuras que as demais, com uma faixa de escamas douradas um pouco antes do ápice da asa.

Genitália: (Fig. 7) Gonocoxito cônico, alongado e coberto de cerdas finas, cujo tamanho é variável, sendo a maioria longas. Ápice do gonocoxito com uma ornamentação de cerdas curtas que se diferem das demais. Lobo subapical do gonocoxito proeminente, não dividido com uma fileira de 8 (8-9) cerdas fortes; não possui cerda diferenciada em folha. Edeago fortemente esclerotizado.

Pupa: (Fig. 8) *Cefalotórax:* de tonalidade marrom-bronzeado; cerda 1-CT geralmente com três ramos (2-5), 2-CT normalmente com três ramos (2-5), 3-CT com três ramos (2-4), 4-CT geralmente com três ramos (2-5), 5-CT normalmente com quatro ramos (2-6), 6-CT usualmente com três ramos (2-6), 7-CT com um ou dois ramos; 8-CT frequentemente com quatro ou cinco ramos, raramente seis (3-6); 9-CT normalmente com dois ou três ramos (1-4); 10-CT frequentemente com quatro ramos (2-4); 11-CT com dois ramos; 12-CT geralmente com três ramos (2-4). *Trompa respiratória:* Mais longa do que estreita, alongada distalmente. Área de traqueóides com esclerotinização mais acentuada. *Abdômen:* ligeiramente bronzeado, margem anterior dos tergos escura, principalmente nos tergos I-IV. Cerdas 1-I - VII múltipla (2-7); 2-I, VIII simples; 6 - I, II simples; 6 III-VII geralmente com três ramos (2-6); 7, 8-I - VII frequentemente com três ramos (1-5); 9-I - VI simples; 9-VII - VIII variando de 3 - 8 ramos; 10, 11-III - VII normalmente simples (1-2); 0, 14 II - VIII simples, curtas e pouco evidentes. *Lobo genital:* levemente bronzeado; No macho apresenta-se mais alongado e afilado do que na fêmea, na qual é arredondado. *Paleta:* Escora e nervura mediana mais escura que as margens; Nervura mediana distinta até o ápice; margens externa e interna sem espículas. Cerdas P-1, 2 simples.

Larva de quarto estágio: *Cápsula cefálica:* forma arredondada, mais larga do que longa. Dorsomento com 12 a 15 dentes, variando de 5-7 para cada lado do dente médio. Cerda 1-C simples, alongada e espessa; 2-C ausente; 3, 4-C simples; 5, 6, 7-C franjadas, 5-C normalmente com quatro ramos (3-5), 6-C com três (2-4) e 7-C com 5 (4-8); 8-C frequentemente com três ramos (3-5); 9-C usualmente com seis ramos (4-7); 10-C com um ou dois ramos, raramente com três; 11-C com dois ou três ramos; 12-C normalmente com quatro ramos, raramente com seis (3-6); 13-C habitualmente com três ramos (3-5); 14-C normalmente simples, podendo ser dupla;

15-C com três ramos (3-6). Antena espiculosa. *Segmento VIII*: Pécten com três à quatro fileiras de escamas, cujo formato varia de triangular a quadrangular; Cerda 1-VIII usualmente com seis ramos, cinco em menor freqüência; 2, 4-VIII geralmente simples; 3-VIII normalmente com oito ramos (6-8); 5-VIII com 2 ou 3 ramos. *Sifão*: Pécten sifonal normalmente com 14 espinhos (13-17); Porção pré-apical rodeada de espinhos, fortes e proeminentes. *Segmento X*: Sela espiculosa, principalmente na porção distal. Cerda 1-X com dois ou três ramos; 2-X dupla; 3-X simples; 4-X composta de 12 grupos de cerdas, cada um composta de 8-10 cerdas, inseridas na grade.

As variações observadas quanto ao número de cerdas, da pupa e da larva estão listadas nas tabelas III e IV, respectivamente.

Distribuição geográfica: América do Norte, Estados Unidos. **América Central**, Belize Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicarágua, Panamá, Trinidad e Tobago. **América do Sul**, Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Paraguai, Peru, Suriname, Uruguai, Venezuela, Guiana Francesa.

Material tipo: Holótipo larva. **TRINIDAD AND TOBAGO, Saint Joseph**, Demera, 1 fêmea, XII/1915, Moore, H. W. B. col. (USMN).

Material examinado: **BRASIL, São Paulo**, Campos do Jordão, 29 espécimes ♀ e 16 espécimes ♂ com exúvias da larva e da pupa e genitálias dos machos associadas, montadas em lâmina, 17/II/2006, Sallum *et al.* Col. (FSP – USP).

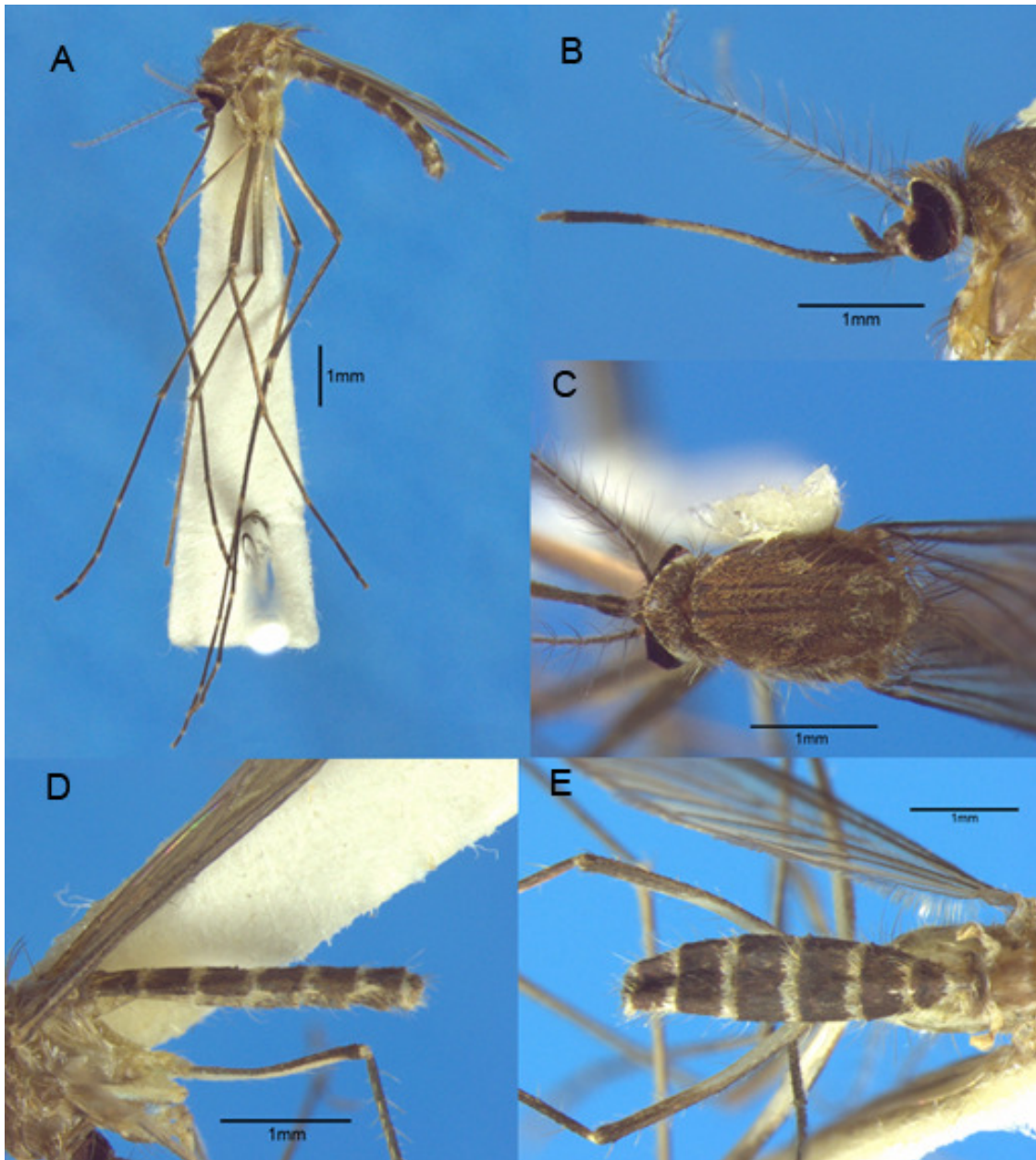


Figura 6: *Cx. (Cux.) coronator*, Dyar & Knab, 1906. Campos do Jordão – SP. **A:** Vista geral ♀; **B:** Probóscide; **C:** Vista dorsal do escudo; **D:** Vista lateral dos tergos abdominais; **E:** Vista dorsal dos tergos abdominais.

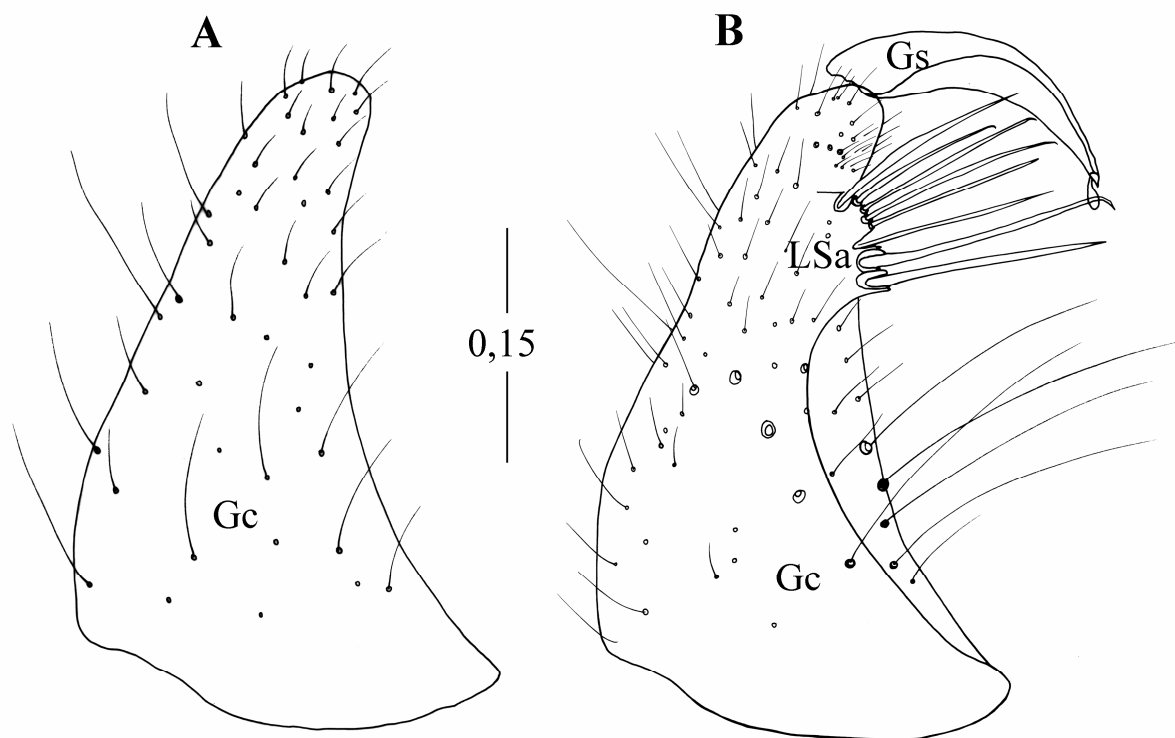


Figura 7: *Cx. (Cux.) coronator*, Campos do Jordão – SP. Genitália – **A**: vista lateral; **B**: vista medial. Gc: gonocoxito; Gs: gonostilo; LSa: lobo subapical. Escala em milímetros (mm).

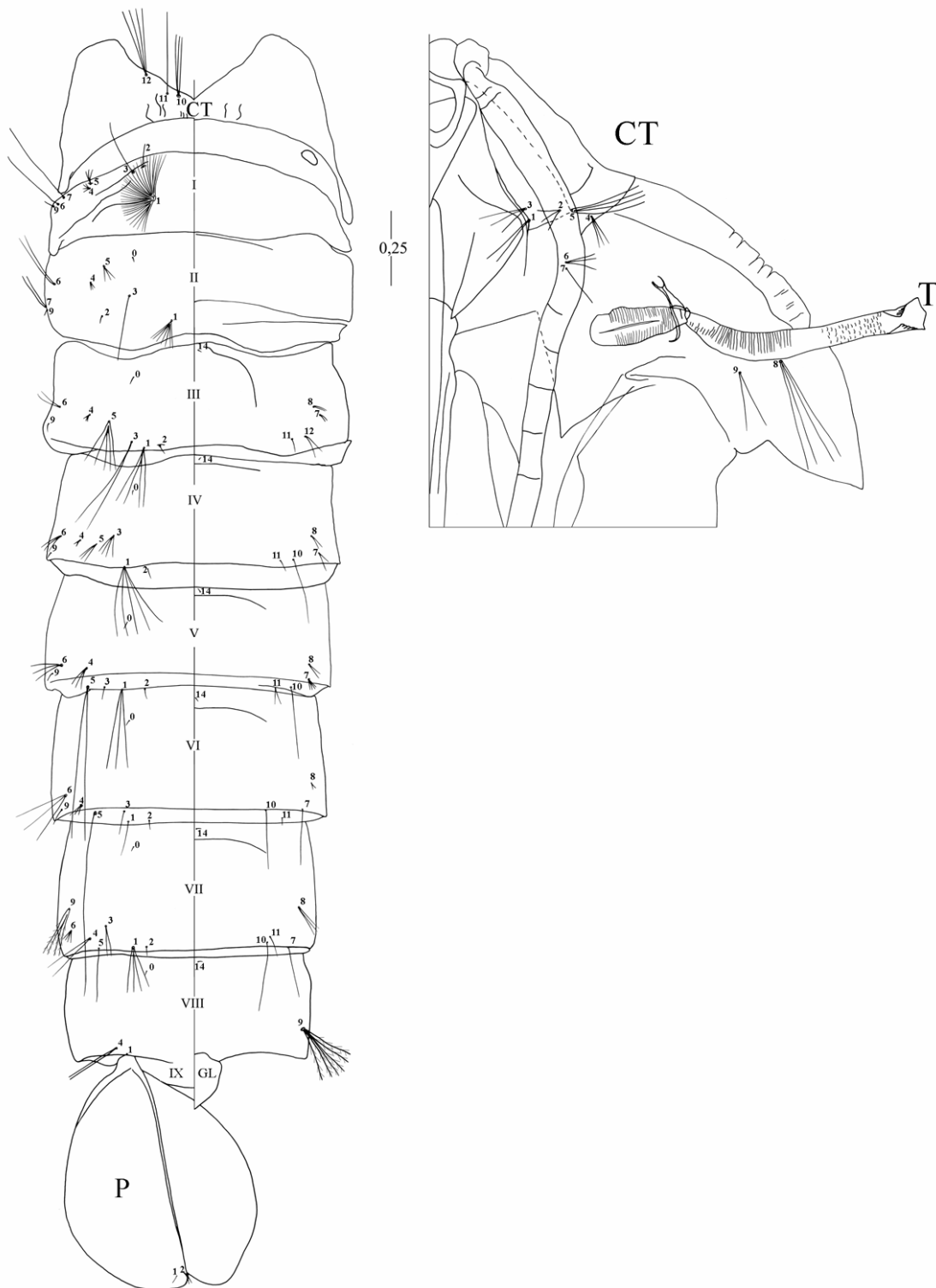


Figura 8: *Cx. (Cux.) coronator*, pupa. Campos do Jordão – SP. CT: cefalotórax; GL: lobo genital; P: paleta; T: trompa; I-IX: segmentos abdominais. Escalas em milímetros (mm).

Tabela III: Número de ramos de cerdas da pupa de <i>Culex (Cux.) coronator</i> ^a												
Cerde No.	Cefalotórax CT	Segmentos abdominais									Paleta P	
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX		
0	-	-	1 13 - 18	1	1	1	1	1	1	1	-	-
1	2 - 5 (3) ^b	n.c.	(18)	4 - 7 (4)	4 - 7 (5)	3 - 6 (4)	2 - 4 (4)	2 - 4 (3)	-	1	1	1
2	2 - 4 (3)	1 - 2 (1)	1	1 - 2 (1)	1	1 - 2 (1)	1	1	-	-	-	1
3	1 - 4 (2)	1 - 2 (1)	1 - 2 (1)	2	2 - 8 (6)	1 - 2 (2)	1 - 3 (1)	1 - 3 (2)	-	-	-	-
4	1 - 4 (3)	3 - 6 (5)	2 - 5 (3)	2 - 6 (4)	1 - 3 (3)	2 - 6 (3)	1 - 3 (3)	1 - 3 (2)	1 - 2 (1)	-	-	-
5	2 - 6 (4)	1 - 4 (3)	2 - 5 (3)	2 - 4 (3)	2 - 4 (2)	1 - 3 (2)	1 - 2 (2)	1 - 2 (1)	-	-	-	-
6	2 - 5 (3)	1	1	2 - 6 (3)	2 - 4 (2)	2 - 4 (3)	2 - 4 (3)	3 - 5 (5)	-	-	-	-
7	1 - 4 (2)	1 - 2 (2)	1 - 2 (1)	1 - 6 (3)	2 - 3 (3)	1 - 5 (4)	1	1 - 2 (1)	-	-	-	-
8	3 - 6 (4)	-	-	2 - 5 (3)	2 - 3 (3)	1 - 3 (3)	1 - 3 (3)	2 - 4 (3)	-	-	-	-
9	1 - 4 (2)	1	1	1	1	1	1	3 - 5 (3)	6 - 9 (6)	-	-	-
10	2 - 4 (4)	-	-	1 - 2 (1)	1 - 2 (1)	1	1	1 - 2 (1)	-	-	-	-
11	2	-	-	1	1 - 2 (1)	1	1	1 - 2 (1)	-	-	-	-
12	2 - 4 (3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	1	1	1	1	1	1	-	-	-

a: baseado em contagens feitas em 7 a 27 cerdas; b: moda, quando distinto; n.c. não contadas.

Tabela IV: Número de ramos de cerdas de larva de quarto instar de *Culex (Cux.) coronator*^a

Cerdeja	Cabeça		Tórax					Segmentos abdominais						
	Nº	C	P	M	T	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	X
0	-	13 - 21 (18)	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
1	1	1	1 - 3 (2)	1 - 3 (2)	3 - 6 (4)	2 - 4 (2)	1 - 3 (1)	1 - 3 (1)	3 - 5 (3)	2 - 3 (2)	1 - 2 (2)	5 - 8 (6)	2 - 3 (2)	
2	-	1	2 - 3 (2)	1 - 3 (2)	1 - 2 (1)	1	1 - 4 (4)	1 - 2 (1)	1	1 - 2 (2)	1	1	2 - 3 (2)	
3	1	1	1 - 2 (1)	2 - 5 (3)	1 - 2 (2)	1 - 2 (2)	1 - 2 (1)	1 - 2 (2)	1	1 - 2 (1)	1 - 2 (2)	6 - 8 (8)	1	
4	1	1 - 2 (1)	1 - 2 (2)	2 - 5 (2)	8 - 9 (9)	2 - 5 (3)	2 - 3 (2)	1 - 2 (1)	4 - 8 (7)	2 - 3 (2)	1	1	nc	
5	3 - 5 (4) ^b	1	1	1 - 2 (1)	5 - 6 (6)	3	2 - 4 (2)	3	2 - 4 (3)	3 - 4 (4)	1 - 3 (1)	2 - 3 (3)	-	
6	2 - 4 (3)	1 - 3 (3)	1	1 - 2 (1)	3	2 - 3 (3)	1 - 3 (2)	2 - 3 (2)	2	1 - 2 (2)	11 - 12 (11)	1a-S	2	
7	4 - 8 (6)	1 - 3 (2)	1	4 - 7 (7)	2	4 - 7 (4)	5 - 8 (7)	3 - 9 (4)	4 - 8 (8)	1	1	1b-S	1 - 2 (2)	
8	3 - 5 (3)	2	4 - 6 (4)	5 - 12 (6)	-	1 - 2 (1)	1 - 2 (1)	1 - 2 (2)	2	1 - 2 (2)	6	1c-S	1 - 2 (2)	
9	4 - 8 (6)	1	2 - 5 (4)	1 - 6 (3)	2 - 3 (2)	1 - 2 (1)	1 - 2 (2)	1 - 2 (1)	1	1 - 3 (2)	5 - 8 (5)	2-S	1 - 3 (3)	
10	1 - 3 (2)	1	1	1	1 - 2 (1)	1 - 2 (1)	1	1 - 2 (1)	1 - 2 (1)	1	1	-	-	
11	2 - 3 (2)	2 - 5 (3)	1 - 3 (1)	1 - 3 (1)	4 - 7 (6)	2	1 - 3 (3)	1 - 4 (1)	1 - 2 (1)	1	1 - 2 (2)	-	-	
12	3 - 6 (4)	1	1	1 - 2 (2)	2 - 4 (2)	2 - 3 (2)	1 - 3 (3)	2	1 - 2 (2)	1 - 2 (1)	1	-	-	
13	3 - 5 (3)	-	5 - 10 (9)	1 - 4 (2)	8 - 13 (13)	2 - 3 (2)	2 - 3 (2)	3 - 5 (5)	11 - 13 (11)	3 - 4 (4)	-	-	-	
14	1 - 2 (1)	1	13 - 22 (18)	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	
15	3 - 6 (3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

a: baseado em contagens feitas em 5 a 27 cerdas; b: moda, quando distinto; n.c. não contadas.

Culex usquatus Dyar, 1918

(Figs. 9,10 e 11)

Culex usquatus Dyar, 1918d: 122, localidade tipo Panamá (descrição).

Dyar, 1922: 19 (notas sobre a genitália masculina); Bonne & Bonne-Wepster, 1925: 229 (redescrição); Dyar, 1928: 387 (redescrição); Edwards, 1932: 105 (catálogo); Vargas, 1952: 173 (checklist); Carpenter & LaCasse, 1955: 277 (revisão); Stone, 1959: 245 (catálogo); Belkin *et al.* 1965: 63 (checklist); Forattini, 1965: 121, 123 e 127 (livro); Bram, 1967: 45-53 (revisão); Stone *et al.* 1967: 216, 217 (catálogo); Forattini *et al.* 1987: 190 (ecologia); Forattini *et al.* 1995: 272 (ecologia); Smith *et al.* 2006: 330 (registro de ocorrência).

Fêmea: (Fig. 9) Mosquitos de pequeno a médio porte. *Cabeça* – Probóscide recoberta de escamas escuras, exceto pela presença de uma mancha, na porção mediana ventral, formada por escamas de coloração clara, ocupando aproximadamente um terço da probóscide. Palpos maxilares predominantemente recobertos de escamas escuras, salpicados de escamas douradas, principalmente no ápice. Vértice e occipício recoberto por escamas douradas e finas, mescladas com escamas escuras de ápice forquilhado; Margem do occipício coberta por escamas brancas. *Tórax*: Tegumento marrom-escuro; Escudo recoberto por escamas marrom-bronzeadas; Mesonoto com duas pequenas manchas circulares de escamas douradas; Região dorsocentral, entre as cerdas acrosticais e dorso centrais, glabra; Escamas da margem anterior e da fossa do escudo de coloração dourado-claro; Cerdas acrosticais, dorso centrais, da fossa do escudo, pré-escutelares e supra-alares finas e alongadas, de coloração marrom-escuro; Cerdas escutelares centrais e laterais fortes e longas; Cerdas pré e pós espiraculares ausentes. Tegumento da pleura marrom-claro; escamas mesepimerais superiores (EMms), escamas pré-alares inferiores (EPali), escamas mesocatepisternais inferiores (EMsi) e escamas mesepimerais anteriores (EMma) presentes; Cerdas mesepimerais superiores (SMms), cerdas pré-alares (SPal), mesocatepisternais inferiores marrons, finas e alongadas. *Pernas*: Predominantemente escuras. Fêmur posterior com uma ampla mancha ventral de escamas branco-prateadas. Marcação

clara, nas inserções tíbio-tarsal e dos tarsômeros, formando um anel. *Asas*: Costa, subcosta e radial, densamente cobertas de escamas escuras e mais alargadas que as demais. *Abdômen*: Tergos recobertos predominantemente por escamas escuras, com discreto brilho metálico; Tergos II – V com uma estreita faixa basal de escamas claras. Lateral dos tergos VI – VIII com uma pequena mancha de escamas claras na lateral.

Macho: Genitália - *Gonocoxito* (vista lateral – Fig.10A): Os indivíduos provenientes de Pariquera-Açú (SP) possuem o ápice do gonocoxito com um grupo de cerdas longas, cujo comprimento alcança a metade do gonostilo. *Gonocoxito* (vista medial – Fig.10B): apresenta uma única cerda, forte e longa no ápice do gonocoxito. Região entre o ápice do gonocoxito e o lobo subapical nua, sem a presença de cerdas. Lobo subapical proeminente, não dividido. Não possui cerda diferenciada em folha.

Os indivíduos de Piraquara e São José dos Pinhais (PR) diferem dos de Pariquera-Açú (SP) por apresentarem um grupo de cerdas na região entre o ápice do gonocoxito e o lobo subapical (Fig. 10C) em vista medial.

Pupa: (Fig. 11) *Cefalotórax*: Marrom-bronzeado; Cerdas 1-CT frequentemente com três ramos, raramente quatro; 2-CT normalmente com três ramos (2-4); 3-CT normalmente com três ramos (2-3); 4-CT com dois ou três ramos; 5-CT geralmente com três ramos (2-4); 6-CT com três ramos, raramente dois; 7-CT mais frequentemente com dois ramos (1-2); 8-CT usualmente com dois ramos (2-5); 9-CT normalmente com dois (1-4); 10-CT frequentemente com quatro ramos (2-4); 11-CT com dois ramos; 12-CT habitualmente com três ramos (2-4). *Trompa respiratória*: Mais longa do que estreita, alongada distalmente. Área traqueóide mais fortemente bronzeada. *Abdômen*: ligeiramente bronzeado, margem anterior dos tergos escura, principalmente nos tergos I-IV. Cerdas 1-I múltiplas; 6-I, II simples, raramente dupla; 6- III,VII na maioria das vezes com 3 ramos; 7- I,II frequentemente dupla (1-2); 9- III,VII simples; 10 e 11- III,VII normalmente simples (1-2); Cerdas 0 e 14 sempre simples. *Lobo genital*: levemente bronzeado; No macho apresenta-se mais alongado e afilado do que na fêmea, na qual é arredondado. *Paleta*: Escora e nervura mediana mais escuras que as margens;

Nervura mediana distinta até o ápice; margens externa e interna sem espículas.

Larva de quarto estágio: *Cápsula cefálica:* forma arredondada, mais larga do que longa. Dorsomente com 12 a 15 dentes, variando de 5-7 para cada lado do dente médio. Cerda 1-C simples, alongada e espessa; 2-C ausente; 3, 4 -C simples; 5, 6, 7-C franjadas, 5-C normalmente com quatro ramos (3-5), 6-C com três (2-4) e 7-C com 5 (4-8); 8-C frequentemente com três ramos (3-5); 9-C usualmente com seis ramos (4-7); 10-C com um ou dois ramos, raramente com três; 11-C com dois ou três ramos; 12-C normalmente com quatro ramos, raramente com seis (3-6); 13-C habitualmente com três ramos (3-5); 14-C normalmente simples, podendo ser dupla; 15-C com três ramos (3-6). Antena espiculosa. *Segmento VIII:* Pécten com três à quatro fileiras de escamas, cujo formato varia de triangular a quadrangular; Cerda 1-VIII com seis ramos, raramente cinco; 2, 4-VIII geralmente simples; 3-VIII normalmente com oito ramos (6-8); 5-VIII geralmente com três ramos, esporadicamente com dois. *Sifão:* Pécten sifonal normalmente com 14 espinhos (12-15); Porção apical rodeada de espinhos, fortes e proeminentes. *Segmento X:* Sela espiculosa, principalmente na porção distal. Cerda 1-X com dois ramos; 2-X dupla; 3-X simples ou dupla; 4-X composta de 12 grupos de cerdas, cada um composta de 8-10 cerdas, inseridas na grade.

As variações observadas quanto ao número de cerdas, da pupa e da larva estão listadas nas tabelas V e VI, respectivamente.

Distribuição geográfica: América do Norte, México. América Central, Panamá. América do Sul, Argentina, Brasil, Paraguai.

Material tipo: Holótipo macho (não foram encontrados mais detalhes sobre o holótipo)

Material examinado: BRASIL, Paraná, São José dos Pinhais, 4 ♂ com genitália e exúvias da larva e pupa associadas montadas em lâmina, 29/VII/2006, Calado, D. C.

col. (DZUP); Piraquara, 3 ♂ com genitália associada montada em lâmina, 25/III/2003, Anjos, A. F. col. (DZUP); Doutor Camargo, 1 ♂ com genitália e exúvias da larva e pupa associadas montadas em lâmina, 03/VII/2007, Santos, D. R. col. (DZUP); **São Paulo**, Pariquera-Açú, 2 genitálias de ♂ montadas em lâmina, 7/VII/1987, Laboratório de Entomologia (FSP – USP).

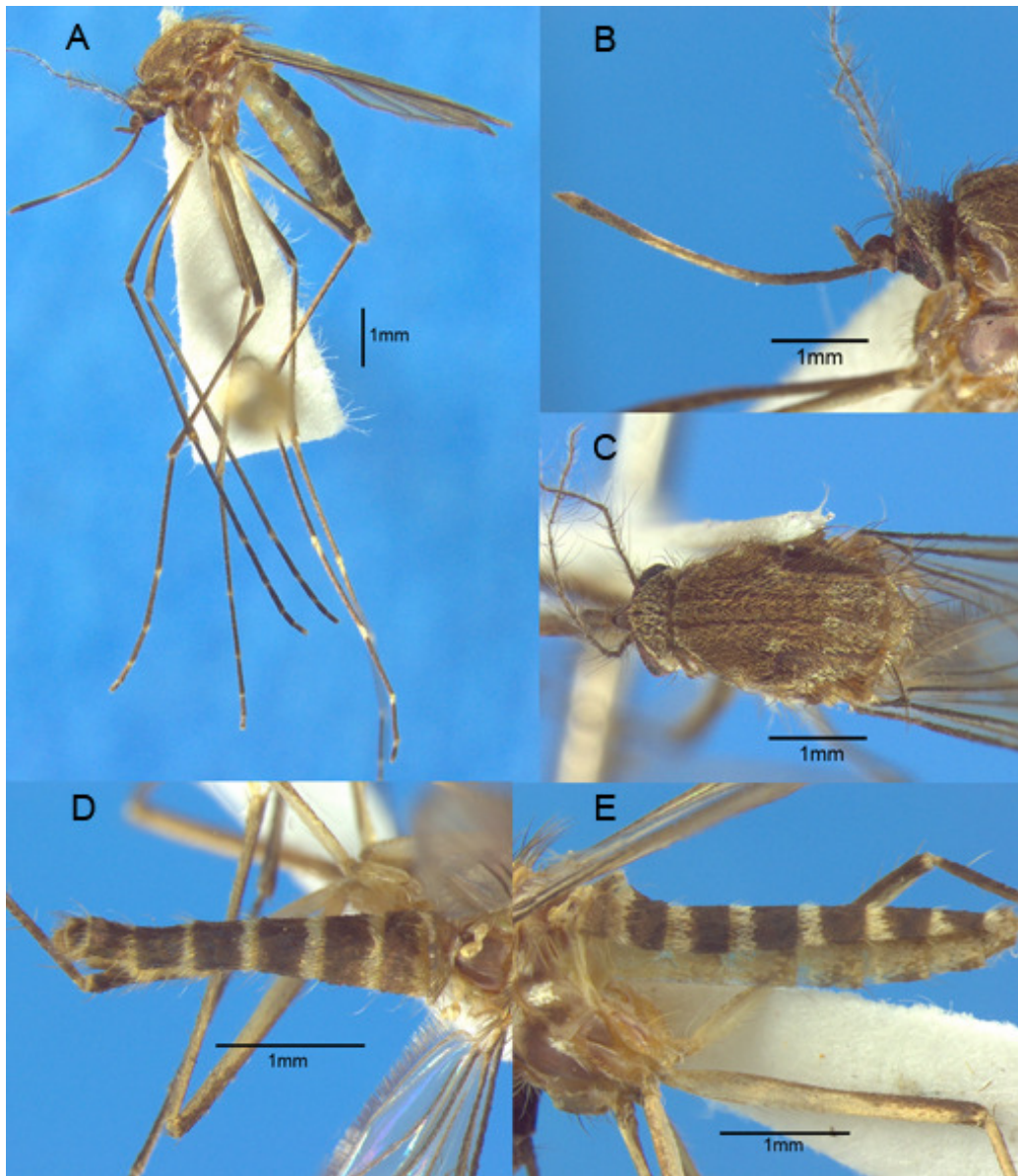


Figura 9: *Cx. (Cux.) usquatus* Dyar, 1922. São José dos Pinhais – PR. **A.** Vista geral ♀; **B.** Probóscide; **C.** Vista dorsal do escudo; **D.** Vista dorsal dos tergos abdominais; **E.** Vista lateral dos tergos abdominais.

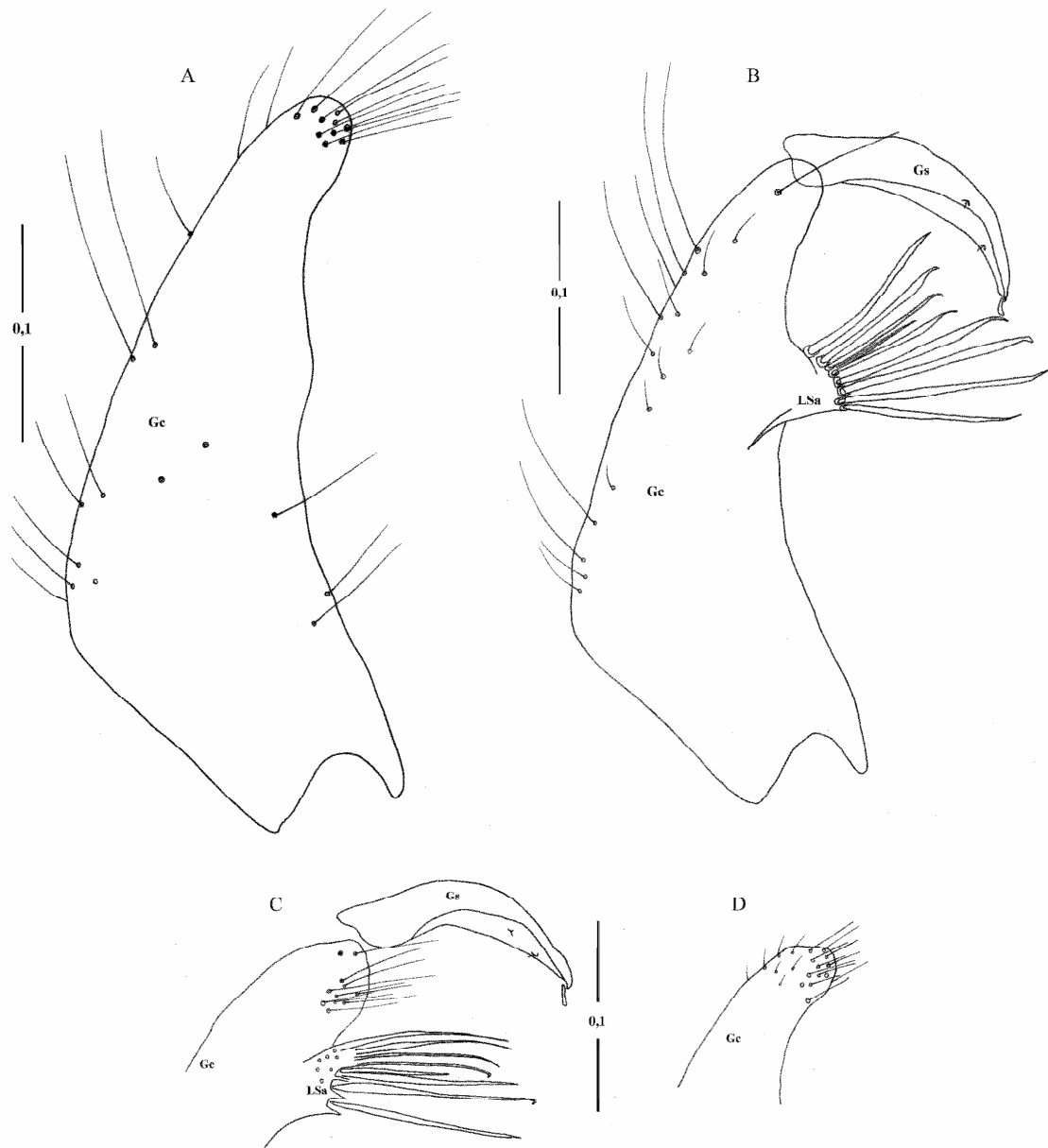


Figura 10: *Cx. (Cux.) usquatus*, Genitália – **A:** Pariquera-Açú, vista lateral. **B:** Pariquera-Açú, vista medial. **C:** Piraquara, vista medial. **D:** Piraquara, vista lateral. Gc: gonocoxito; Gs: gonostilo; LSa: lobo subapical.

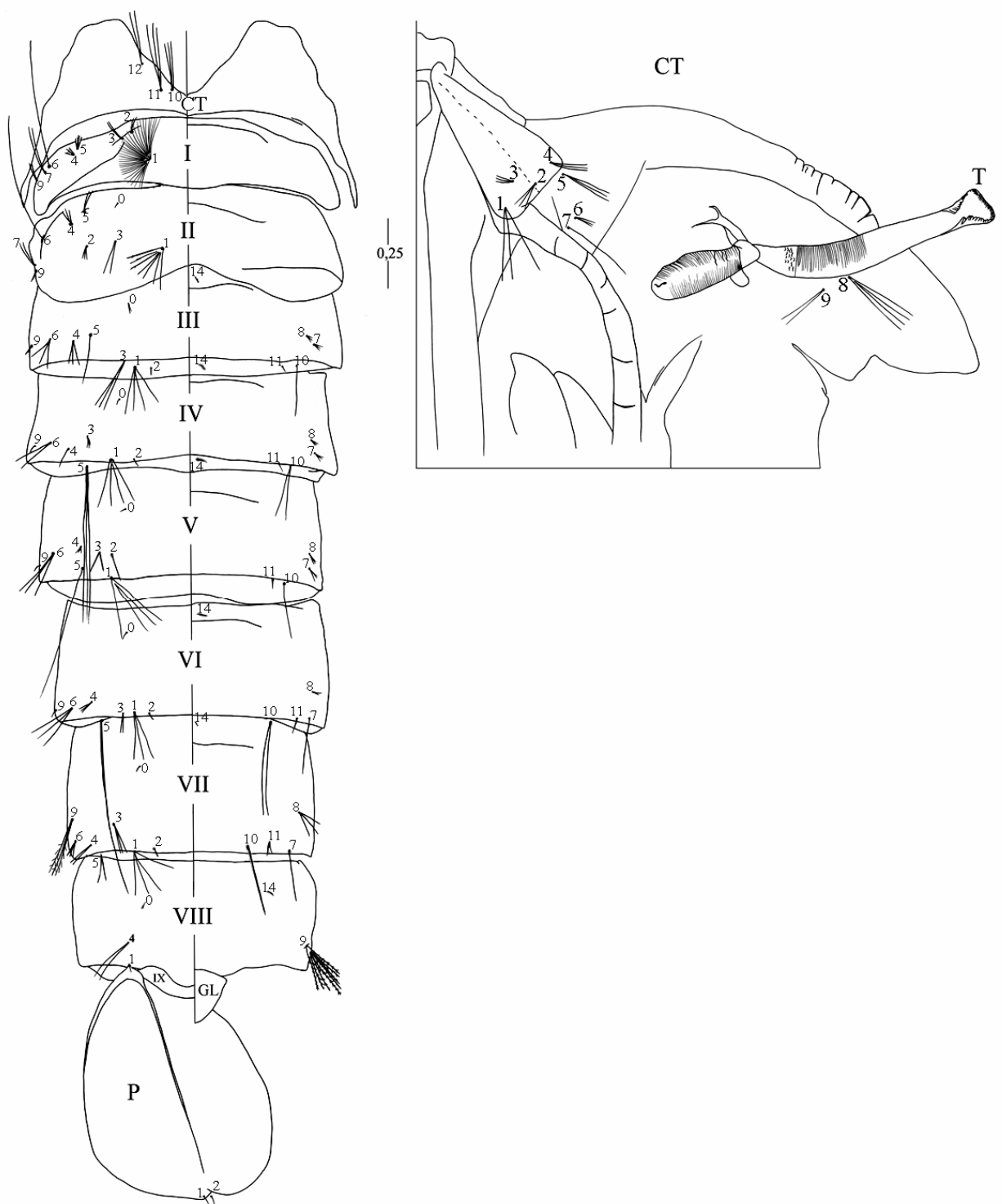


Figura 11: *Cx. (Cux.) usquatus*, pupa. São José dos Pinhais - PR. CT: cefalotórax; GL: lobo genital; P: paleta; T: trompa; I-IX: segmentos abdominais. Escalas em milímetros (mm).

Tabela V: Número de ramos de cerdas da pupa de *Culex (Cux.) usquatus*^a

Cerde No.	Cefalotórax CT	Segmentos abdominais									Paleta P	
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX		
0	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	-	-
1	3-4 (3) ^b	n.c.	11-17 (11)	4-7 (5)	5-7 (6)	1-6 (4)	3-4 (3)	2-4 (3)	-	1	1	
2	2-4 (3)	1-3 (1)	1	1	1	1-2 (1)	1	1	-	-	1	
3	2-3 (3)	1-3 (1)	1-2 (1)	1-2 (2)	1-5 (4)	2	1-4 (2)	1-2 (2)	-	-	-	
4	2-3 (2)	3-6 (5)	3-4 (3)	2-4 (3)	1-3 (2)	2-6 (3)	2-3 (3)	2	1-2 (2)	-	-	
5	2-4 (3)	2-5 (4)	3-5 (3)	3-4 (3)	1-2 (2)	1-2 (2)	2	2 (2)	-	-	-	
6	2-3 (3)	1-2 (1)	1	2-3 (3)	2-6 (3)	3-4 (3)	3-5 (5)	-	-	-	-	
7	1-2 (2)	2	1-2 (2)	1-6 (3)	2-4 (3)	2-5 (3)	1	1	-	-	-	
8	2-5 (3)	-	-	2-4 (3)	3	2-4 (3)	2-3 (2)	3-4 (3)	-	-	-	
9	1-6 (2)	1-2 (1)	1	1	1	1	1	3-6 (4)	5-9 (8)	-	-	
10	2-3 (3)	-	-	1-2 (1)	1-2 (2)	1-2 (1)	1-2 (1)	1	-	-	-	
11	2	-	-	1	1	1	1-2 (1)	1-2 (1)	-	-	-	
12	1-3 (3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
14	-	-	-	1	1	1	1	1	1	-	-	

a: baseado em contagens feitas em 7 a 27 cerdas; b: moda, quando distinto; n.c.: não contadas.

As características morfológicas externas das fêmeas de *Cx. (Cux.) coronator* e *Cx. (Cux.) usquatus* mostram-se ineficazes na separação das duas espécies. Observaram-se variações no padrão de escamas nos tergos abdominais das fêmeas destas duas espécies. Estas evidências foram consideradas como variações intraespecíficas, não utilizadas para diferenciar as espécies.

Foi realizada a quetotaxia da pupa e de parte da larva de *Cx. coronator* e *Cx. usquatus* (cabeça, segmentos abdominais VIII-X e sifão). Não foram encontradas características marcantes na quetotaxia da pupa e de parte da larva, o padrão de variação das cerdas é muito semelhante, apesar de o número amostral de *Cx. usquatus* ter sido reduzido. Para termos certeza da impossibilidade de diferenciação das duas espécies através dos imaturos é necessário comparar a quetotaxia completa da larva, o que será feito na seqüência deste trabalho.

As larvas de *Cx. coronator* e *Cx. usquatus*, assim com as demais espécies

do Complexo Coronator, têm uma característica bastante marcante, e que facilita muito o reconhecimento destas espécies, que é a presença de fortes espinhos na porção distal do sifão respiratório. De acordo com Lane (1953) exceto as espécies do Complexo Coronator, as únicas que apresentam tal característica são: *Culex brevispinosus* Bonne-Wepster & Bonne, 1919, *Culex maracayensis* Evans, 1923, *Culex beauperthuyi* Anduze, 1943 (atualmente sinonímia de *Culex saltanensis* Dyar, 1928) e *Culex covargarciai* Forattini, 1965. No entanto, nestas espécies os espinhos são mais delicados e menores, diferente do que ocorre nas demais espécies que constituem o Complexo Coronator.

Pelo fato da semelhança morfológica entre as fêmeas do Complexo Coronator, acredita-se que existam muitas imprecisões na identificação destas espécies o que nos leva a crer que também existam problemas em relação à distribuição correta destas espécies. Os trabalhos que se referem à ecologia das espécies do Complexo Coronator trazem, em sua maioria, dados sobre os imaturos, pela facilidade de reconhecimento das espécies através dos espinhos no sifão respiratório. Porém somente àqueles que criam os imaturos até a fase adulta é que chegam com precisão à espécie. Arnett (1948) comenta que *Cx. coronator* seria a espécie mais abundante no Panamá (Localidade tipo de *Cx. usquatus*, *Cx. ousqua* e *Cx. usquatissimus*). Entretanto, para o autor *Cx. ousqua* e *Cx. usquatissimus* são sinonímias de *Cx. coronator*. Root (1927) registra a ocorrência de duas formas de *Cx. coronator* no Brasil, uma “típica” e outra “atípica”. Apesar de não nomear as variações que ocorrem na genitália dos machos, possivelmente referem-se à *Cx. coronator* e *Cx. usquatus*. Estas dúvidas em relação ao posicionamento taxonômico destas espécies perduraram durante décadas, como mostra o histórico do Complexo Coronator.

Os trabalhos realizados antes da década de 1960 se referiam apenas a *Cx. coronator*, pois não havia exatidão em relação ao status dos taxa *Cx. ousqua*, *Cx. usquatus*, *Cx. usquatissimus*, *Cx. camposi*, *Cx. mooseri* e *Cx. albertoi*, se sinonímias ou subespécies de *Cx. coronator*. Deste período em diante ocorreram às primeiras especulações a respeito da existência de um complexo de espécies. Atualmente sabe-se da existência deste complexo, denominado de Complexo Coronator, citado na literatura pela primeira vez por Forattini (1965). Desde então, a identificação na maioria dos casos, é no nível de grupo em consequência da dificuldade de se

chegar a identificação precisa de espécie, sem a análise da genitália de machos.

De acordo com Bram (1967) a genitália dos machos é a única característica marcante e, portanto fundamental na distinção de *Cx. coronator* e *Cx. usquatus*. De acordo com Dyar (1918b), Dyar (1922), Dyar (1925), Bonne & Bonne-Wepster (1925) e Lane (1953) isto também ocorre com as demais espécies do Complexo Coronator, cuja distinção se dá pela genitália dos machos. Bram (1967) já acreditava que as evidências morfológicas da genitália dos machos e a distribuição das espécies do Complexo Coronator, seriam fortes indícios de que ocorreu especiação. O presente estudo mostrou que existem variações na ornamentação de cerdas da genitália de indivíduos de *Cx. usquatus* de diferentes localidades. Os indivíduos provenientes da região de Piraquara e São José dos Pinhais, Paraná, apresentam cerdas entre o ápice do gonocoxito e o lobo subapical (Fig. 10C), enquanto os indivíduos de Pariquera-Açú (São Paulo) e Doutor Camargo (Paraná) apresentam esta mesma região completamente nua (Fig. 10B). Já em vista lateral (Figs. 10A e D) não foram encontradas variações. Através destas evidências morfológicas podemos supor que se trata de espécies distintas. No entanto foram analisados poucos indivíduos e não obtivemos amostras de DNA da Região do Vale do Ribeira e/ou do Norte do Paraná, o que não nos permite afirmar tal suposição. Desta forma este fato precisa de estudos mais aprofundados.

4.2 ESTUDOS MOLECULARES

As 8 seqüências de DNA amplificadas utilizando os *primers* C1J-1718 e C1N-2191 foram de ~500 de base (pb) do gene Citocromo Oxidase subunidade I (COI), correspondente a região 5' o gene (Kumar *et. al.* 2007). Foram analisadas seqüências de *Cx. coronator* de Porto Rico – PR (3), Campos do Jordão – SP (2) e Lucélia – SP (2) e *Cx. usquatus* de São José dos Pinhais – PR (1). Dentre os 500pb do COI alinhados 451 sítios (87,5%) foram conservados, apenas 52 sítios (10,0%) foram variáveis e 20 sítios (3,88%) foram parcimoniosos informativos. A composição dos nucleotídeos esta descrita na (tabela VI).

Observou-se a sobreposição de nucleotídeos em 11 posições da seqüência

obtida do espécime CJ01-38. Nas posições 46, 166, 256, 316, 445 e 463 observaram-se picos sobrepostos de timina (T) e citosina (C) representados posteriormente por Y(T ou C). Nas posições 133, 307 e 388 observaram-se picos sobrepostos de adenina (A) e guanina (G) representados posteriormente por R (A ou G). Já nas posições 343 e 373 visualizaram-se sobreposições de picos de timina (T) e adenina (A), que foi representado posteriormente pela letra W (T ou A). Nas análises estas sobreposições foram analisadas com as letras R, W e Y.

Tabela VI: Composição de nucleotídeos de seqüências do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade I de espécies de *Culex* (*Culex*).

	T(U)	C	A	G	Total
<i>Cx tritaeniorhynchus</i>	38,0	17,8	29,4	14,8	439,0
<i>Cx quinquefasciatus</i>	39,6	16,7	28,2	15,4	454,0
SJP08	38,8	17,1	29,3	14,9	451,0
CJ0138	39,0	17,1	28,9	15,0	492,0
PR0202	38,8	17,3	28,8	15,1	503,0
PR0401	39,2	17,1	28,6	15,1	503,0
PR0412	39,2	17,1	28,7	14,9	502,0
CJ0139	38,7	17,4	28,8	15,0	413,0
66	39,4	16,9	29,2	14,5	503,0
72	39,2	17,4	28,8	14,6	500,0
Avg.	39,0	17,2	28,9	14,9	476,0

Porque as seqüências foram relacionadas distantemente, usamos *p-distance* para construir as árvores filogenéticas. Para um par de seqüências, a *p-distance* é simplesmente a proporção de locais diferentes entre as seqüências dadas. A árvore baseada no modelo *p-distance* (Fig. 12) mostra proximidade entre os exemplares de Campos do Jordão, São José dos Pinhais e um exemplar de Porto Rico agrupando-os em um cluster e entre os indivíduos de Lucélia agrupando-os em outro. Dois exemplares de Porto Rico são colocados numa posição intermediária entre os dois grupos. A topologia obtida através da análise de NJ Kimura 2-parâmetros (Fig. 13) que estima diferentes taxas de transições e tranversões sugere a presença de dois grupos geneticamente distintos, ambos monofiléticos. Espécimes oriundos de Porto Rico, São José dos Pinhais e Campos do Jordão compõe um clado com suporte de *bootstrap* (65%), no entanto as relações internas entre as espécies ainda precisam ser resolvidas, principalmente a relação de *Cx. usquatus* (SJP08) com as diferentes populações de *Cx. coronator*. Este problema ocorre, provavelmente, pelo reduzido

número de espécimes utilizados na análise. Assim como na análise *p-distance* os exemplares de *Cx. coronator* provenientes de Lucélia constituem um clado monofilético (64%) e distinto dos demais exemplares. Isto mostra que os indivíduos de Lucélia são geneticamente semelhantes entre si e diferentes dos demais espécimes.

O grupo de indivíduos do Complexo Coronator constitui um grupo monofilético, cujo suporte de *bootstrap* apresenta confiabilidade de 99% (Fig. 13). Isto é corroborado pela semelhança morfológica entre os exemplares, mesmo quando se tratando de espécies diferentes.

As topologias obtidas podem sofrer muitas mudanças adicionando-se mais indivíduos para a análise, já que observamos um número reduzido de exemplares. Isto aumentaria a confiabilidade dos dados e nos daria maiores possibilidades de análises. Heath *et al.* (2008) demonstra que a estimativa exata das análises filogenéticas depende de uma amostragem apropriada e extensiva do táxon estudado.

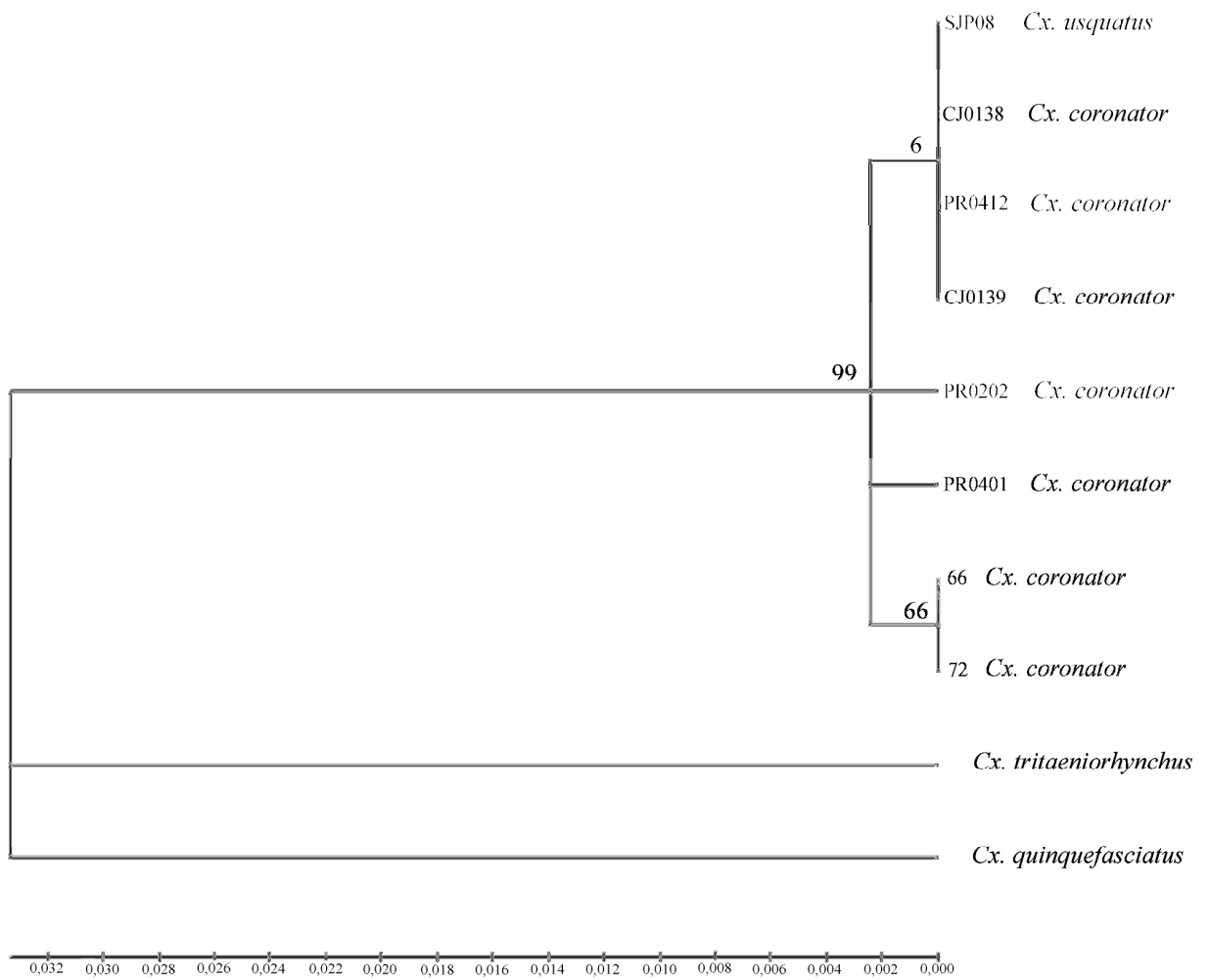


Figura 12: Topologia gerada na análise de distância, utilizando valores não corrigidos de P, com o algoritmo de Neighbor Joining.

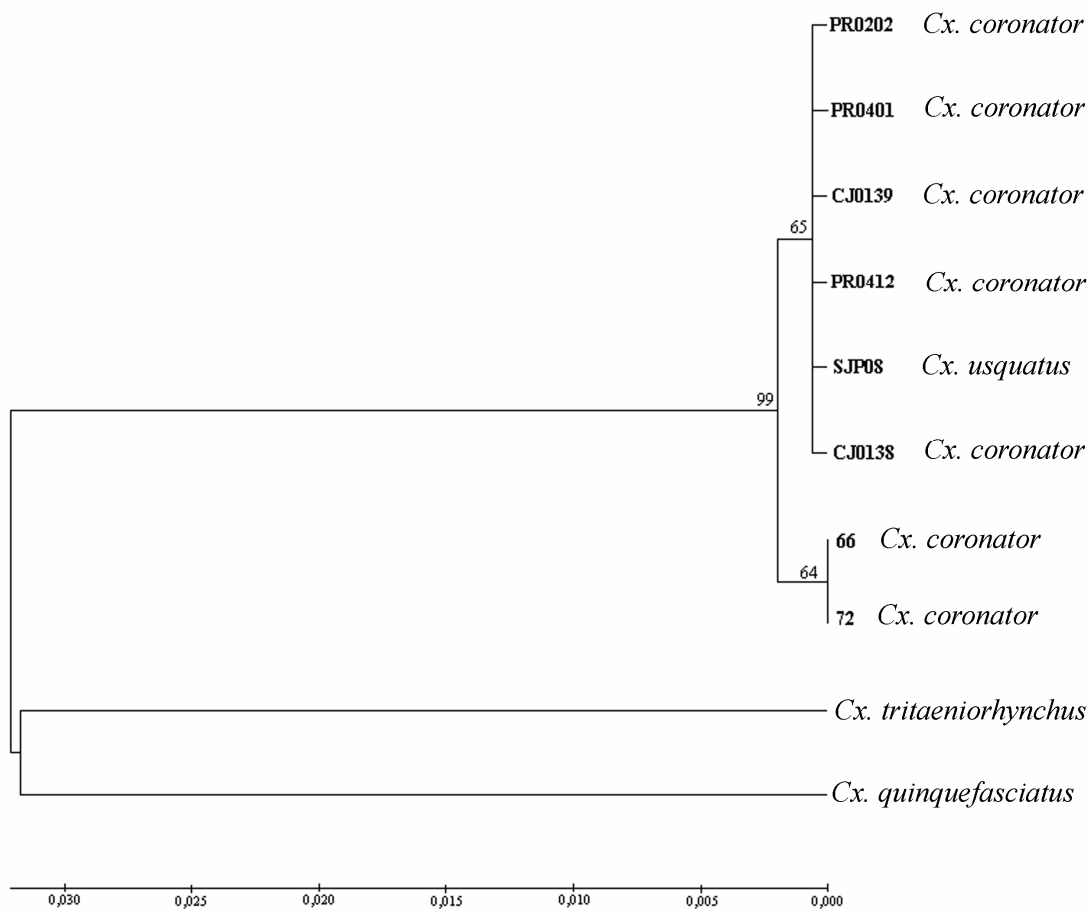


Figura 13: Topologia gerada na análise de distância empregando o modelo de evolução de nucleotídeos Kimura 2-parâmetros, 1000 replicações no teste “bootstrap” (programa MEGA).

7. CONCLUSÕES

Tendo como base as características observadas, não foram encontradas variações relevantes na morfologia da larva, pupa ou fêmea adulta capaz de diferenciar *Cx. coronator* de *Cx. usquatus*.

As variações encontradas na morfologia da genitália do macho de *Cx. usquatus*, sugerem a possibilidade da existência de uma nova espécie do Complexo Coronator, na região de Piraquara e São José dos Pinhais (Paraná).

Os dados moleculares não ofereceram informações suficientemente confiáveis na reconstrução filogenética do grupo analisado devido ao número reduzido de exemplares utilizados para as análises.

8. REFERÊNCIAS

- Ahid, S. M. M. & R. Lourenço-de-Oliveira. 1999. Mosquitos vetores potenciais de dorofilariose canina na Região Nordeste do Brasil. **Revista de Saúde Pública** **33**(6): 560-565.
- Alfonzo, D.; M. E. Grillet; J. Liria; J. Navarro; S. C. Weaver & R. Barrera. 2005. Ecological Characterization of the Aquatic Habitats of Mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Enzootic Foci of Venezuelan Equine Encephalitis Virus in Western Venezuela. **Journal Medical Entomology** **42**(3): 278-284.
- Almirón, W. R. & M. M. Brewer. 1995a. Preferencia por hospedadores de Culicidae (Diptera) recolectados en el centro de la Argentina. **Revista de Saúde Pública** **29**(2): 108-114.
- Almirón, W. R. & M. M. Brewer. 1996. Classification of immature stage habitats of Culicidae (Diptera) collected in Cordoba, Argentina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **91**(1): 1-9.
- Almirón, W. R.; M. M. Brewer & F. F. L. Almeida. 1995. New records for mosquito species (Diptera: Culicidae) in Argentina. *Journal of the American Mosquito Control Association* **11**(2): 235-236.
- Anderson, C. R.; T. H. G. Aitken, W. G. Downs & L. Spence. 1957. The isolation of St. Louis virus from Trinidad mosquitoes. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** **6**(4): 688-692.
- Anduze, P. J. 1941. Lista Provisional de los zancudos hematofagos de Venezuela (Diptera: Culicidae). **Boletín de Entomología Venezolana** **1**(1): 6-18.
- Anduze, P. J. 1941. Primer informe sobre Entomología Medica del Estado Bolívar (Venezuela). Serie 1. La fauna culicidiana. Descripción de tres especies nuevas(Diptera, Culicidae). **Revista de Sanidad y Asistencia Social** **6**: 812-836.
- Anduze, P. J. 1943a. Estudios de Entomología Medica en el Estado Merida – Venezuela: La Fauna Culicidiana. – Descripción del *Culex* (*Culex*) *albertoi* sp. n. **Boletín de Entomología Venezolana** **2** (4): 189-196.

Antunes, P. C. 1937. Informe sobre una investigacion entomologica realizada en Colombia. **Revista de la Facultad de Medicina** 6(2): 65-87.

Antunes P C & J. Lane. 1933. Nota sobre a distribuição geográfica dos culicídeos de São Paulo (Brasil). **Revista de Biologia e Hygiene** 4(3): 91-97.

Arnett R H. 1948. Notes of the distribution, habits and habitats of some Panama culicines. Part II. . **New York Entomological Society** 55: 175-194.

Arnett R H. 1950. Notes of the distribution, habits and habitats of some Panama culicines. Part IV: Ecology. **New York Entomological Society** 58: 99-116.

Barata, E. A. M. de F.; F. C. Neto; M. R. Dibo; M. de L. G. Macorís; A. A. C. Barbosa; D. Natal; J. M. S. Barata & M. T. M. Andrigueti. 2007. Captura de culicídeos em área urbana: avaliação do método das caixas de repouso. **Revista de Saúde Pública** 41(3): 375-382.

Barbosa, A. A.; M. A. Navarro-Silva & D. Calado. 2003. Atividade de Culicidae em remanescente florestal na região urbana de Curitiba (Paraná, Brasil). **Revista Brasileira de Zoologia** 20(1): 59-63.

Barghini, A.; P. R. Urbinatti & D. Natal. 2004. Atração de mosquitos (Diptera: Culicidae) por lâmpadas incandescentes e fluorescentes. **Entomología y Vectores** 11(4): 611-622.

Beebe, N. W., A. F. Van Den Hurk, H. F. Chapman, S. P. Frances, C. R. Williams & R. D. Cooper. 2002. Development and Evaluation of a Species Diagnostic Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment-Length Polymorphism procedure for Cryptic Members of the *Culex sitiens* (Diptera: Culicidae) Subgroup in Australia and the Southwest Pacific. **Journal Medical Entomology** 39(2): 362-369.

Belkin, J. N., R. X. Schick & S. J. Heinemann. 1965. Mosquito studies (Diptera: Culicidae). V. Mosquitoes originally described from Middle America. **Contributions of the American Entomological Institute** 1(5):1-95.

Belkin J.N., S. J. Heinemann & W. A. Page. 1970. Mosquito Studies (Diptera: Culicidae) XXI. The Culicidae of Jamaica. **Contributions of the American Entomological. Institute** 6: 1-458.

- Belkin, J. N. & S. J. Heinemann. 1976. Collection records of the project `Mosquitoes of Middle America`. 6. Southern Lesser Antilles: Barbados (BAR), Dominica (DOM), Grenada (GR, GRR), St. Lucia (LU), St. Vincent (VT). **Mosquito Systematics** 8(3): 237-297.
- Bertram, D. S. 1971. Mosquitoes of British Honduras, with some comments on Malaria, and on Arbovirus Antibodies in Man and Equines. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 65 (6): 742-762.
- Besansky, N. J. & G. T. Fahey. 1997. Utility of the white gene in estimating phylogenetic relationships among mosquitoes (Diptera: Culicidae) **Molecular Biology and Evolution** 14: 442-454.
- Bonne, C. & J. Bonne-Wepster. 1925. **The Mosquitoes of Surinam**. Royal Colonial Institute of Amsterdam, Dept. Trop. Hyg., Med (21) afd., Trop. Hyg. (13): 588 p. 83 figs.
- Boza, S. & M. Vargas. 2006. The morphology of the cibarial armature and sensilla of *Mansonia titillans*, *Psorophora cingulata*, *Coquillettidia arribalzagae*, *Culex coronator* and *Limatus durhamii* (Diptera: Culicidae). **Revista de Biología Tropical** 54(3): 815-820.
- Bram, R. 1967. **Classification of Culex Subgenus Culex in the new World (Diptera: Culicidae)**. Proceedings of the United States National Museum. Smithsonian Institution, Washington D. C. 120(3557): 1-122, illus.
- Calado, D. C. & M. A. Navarro-Silva. 2001. Comunidade de mosquitos (Diptera, Culicidae) em recipientes antrópicos introduzidos em área rural e urbana da região metropolitana de Curitiba, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia** 18 (Supl. 1): 51-60.
- Calderón-Arguedas, O.; A. Troyo & M. E. Solano. 2004. Diversidad larval de mosquitos (Diptera: Culicidae) en contenedores artificiales procedentes de una comunidad urbana de San José, Costa Rica. **Parasitología Latinoamericana** 59(3-4): 132-136.
- Cardoso, J. da C.; E. Corseuil & J. M. S. Barata. 2005. Culicinae (Diptera: Culicidae) ocorrentes no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia** 49(2): 275-287.

Carpenter & La Casse, 1955. **Mosquitoes of North America (North of Mexico)**. University of California Press, 495pp.

Carvalho, O. R. A. & L. G. E, Vieira. 2001. Determinação das condições ótimas para análises de RAPD em *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). **Neotropical Entomology** (10): 593-600.

CDC 2008. Center for Disease Control and Prevention – CDC - *Division of Vector-Borne Infectious Diseases – West Nile Virus* (<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/mosquitoSpecies.htm#06>). Acessado em: 12/V/2008.

Cheung, W. Y., N. Hubert & B. S. Landry. 1993. A simple and rapid DNA microextraction for plant, insect suitable for RAPD and other analysis. **PCR Methods and Applications** (3): 69-70.

Collins, F. H. & S. M. Paskewitz. 1996. A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species. **Insect Molecular Biology** 5(1): 1-9.

Consoli, R. A. G. B. & R. Lourenço -de- Oliveira. 1994. **Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro, Fiocruz, 228p.

Cook, S., M. Diallo, A. A. Sall, A. Cooper & E. C. Holmes. 2005. Mitochondrial markers for molecular identification of *Aedes* mosquitoes (Diptera:Culicidae) involved in transmission of arboviral disease in West Africa. **Journal Medical Entomology** 42(1): 19-28.

Cruickshank, R. H. 2002. Molecular markers for the phylogenetics of mites and ticks. **Systematic & Applied Acarology**, 7: 3-14.

Debboun, M.; D. D. Kuhr; L. M. Rueda & J. E. Pecor. 2005. First record of *Culex* (*Culex*) *coronator* in Louisiana, USA. **Journal of the American Mosquito Control Association** 21(4): 455-457.

Duret & Barreto, 1956. Notas sobre culicidas do Estado de São Paulo, Brasil, com descrições de três novas espécies de *Culex* (Diptera, Culicidae). **Revista Brasileira de Entomologia** 5: 81-89.

Dyar, H. G. & F. Knab. 1906. The larvae of Culicidae classified as independent organisms. **Journal of the New York Entomological Society** 14: 169-230, 12

pls.

Dyar, H. G. 1918. New American mosquitoes (Diptera: Culicidae). **Insector Inscitiae Menstruus 6**: 120-129.

Dyar, H. G. 1922. Note on the male genitalia of *Culex coronator* and allied forms (Diptera: Culicidae). **Insector Inscitiae Menstruus 10**:18-19, 1 pl.

Dyar, H. G. 1925. Some mosquitoes from Ecuador. **Insector Inscitiae Menstruus 13**: 27-31.

EBI 2009. The European Bioinformatics Institute
(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/muscle/index.html>). Acessado em 22/1/2009.

Fé, N. F.; M. das G. V. Barbosa; F. A. A. Fé; M. V. de F. Guerra & W. D. Alecrim. 2003. Fauna de Culicidae em municípios da zona rural do Estado do Amazonas, com incidência de febre amarela. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 36**(3): 343-348.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution 39**(4): 783-791.

Fernandez Z.; R. Richartzb; A. T. da Rosa & V. T. Soccol. 2000. Identificação do vírus causador de encefalomielite eqüina, Paraná, Brasil. **Revista de Saúde Pública 34**(3): 232-235.

Forattini, O. P. 1965. **Entomologia Médica**. São Paulo, EDUSP, vol. 2, 506 p.

Forattini, O.P. 1996. **Culicidologia Médica**. São Paulo, EDUSP, vol. 1, 548 p.

Forattini, O. P. 2002. **Culicidologia Médica**. São Paulo, EDUSP, vol. 2, 864p.

Forattini, O. P.; A. de C. Alves; D. Natal & J. L. F. Santos. 1986. Observações sobre atividade de mosquitos Culicidae em mata primitiva da encosta no Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública 20**(1): 1-20.

Forattini, O. P.; A. de C. Gomes; D. Natal; I. Kakitani & D. Marucci. 1987. Frequência domiciliar e endofilia de mosquitos Culicidae no Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública 21**(3): 188-192.

- Forattini, O. P.; I. Kakitani; E. Massad & D. Marucci. 1995. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment. 10 – Survey of adult behaviour of *Culex nigripalpus* and others species of *Culex* (*Culex*) in South-Eastern Brazil. **Revista de Saúde Pública** 29 (4): 271-277.
- Forattini, O. P.; M. A. M. Sallum & I. Kakitani. 1988. Catálogo das Coleções Entomológicas da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo – (2ª Série II) – Culicidae. **Revista de Saúde Pública** 22 (6): 519-547.
- França, G. S. 2005. Seqüenciamento e análise da região ITS2 de *Anopheles (Kertezia) cruzii* (Diptera, Culicidae) provenientes da população da Floresta Estadual do Palmito – Paranaguá – PR. 36p. (Monografia do curso de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Paraná).
- Gomes, A. C. & O. P. Forattini. 1990. Abrigos de mosquitos *Culex* (*Culex*) em zona rural (Diptera: Culicidae). **Revista de Saúde Pública** 24 (5): 394-397.
- Goddard, J.; W. C. Varnado & B. A. Harrison. 2006. Notes on the Ecology of *Culex coronator* Dyar & Knab, in Mississippi. **Journal of the American Mosquito Control Association** 22 (4): 622-625.
- Hammon, W. McD. & W. C. Reeves, 1943. Laboratory transmission of St. Louis encephalitis virus by three genera of mosquitoes. **The Journal of Experimental Medicine** 78: 241-253.
- Harbach, R.E. & K. L. Knight. 1980. **Taxonomists' Glossary of Mosquito Anatomy**. New Jersey, Plexus Publishing, Inc., 415p.
- Heath, T. A.; S. M. Hedtke & D. M. Hillis. 2008. Taxon sampling and accuracy of phylogenetic analyses. **Journal of Systematics and Evolution** 43: 239-257.
- Jones, J. W.; M. J. Turell; M. R. Sardelis; D. M. Watts; R. E. Coleman; R. Fernandez; F. Carbajal; J. E. Pecor; C. Calampa & T. A. Klein. 2004. Seasonal Distribution, Biology, and Human Attraction Patterns of Culicinae mosquitoes (Diptera: Culicidae) in a forest near Puerto Almendras, Iquitos, Peru. **Journal Medical Entomology** 41(3): 349-360.
- Komp, W. H. W. 1936. An annotated list of the mosquitoes found in the vicinity of an endemic focus of yellow fever in the Republic of Colombia. **Proceedings of the Entomological Society of Washington** 38 (4): 56-70.

- Kumar, N. P., A. R. Rajavel, R. Natarajan & P. Jambulingam. 2007. DNA barcodes can distinguish species of Indian mosquitoes (Diptera: Culicidae). **Journal Medical Entomology** **44**(1): 1-7.
- Kumar, S.; M. Nei, J. Dudley & K. Tamura. 2008. Mega: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. **Briefings in Bioinformatics** **9**(4): 299-306.
- Lane, J. 1939. **Catalogo dos mosquitos Neotrópicos**. Boletim Biológico - Série Monográfica, N° 1, 218 pp.
- Lane, J. 1951. Synonymy of Neotropical Culicidae (Diptera). **Proceedings of the Entomological Society of Washington** **53**(6): 333-336.
- Lane, J. 1953. **Neotropical Culicidae**. São Paulo, EDUSP, vol.1, 1112p.
- Lopes, J. & A. L. Lozovei. 1995. Ecologia de mosquitos (Diptera: Culicidae) em criadouros naturais e artificiais de área rural do Norte do Estado do Paraná, Brasil. I - Coletas ao longo do leito de ribeirão. **Revista de Saúde Pública** **29**(3): 183-191.
- Lopes, J.; F. J. de A. Oliveira; V. D. R. B. de Oliveira & M. A. P. Tonon. 1995. Alterações na densidade populacional e diversidade de Culicidae (Diptera) na área urbana do Município de Londrina, estado do Paraná, Sul do Brasil em consequência de modificações ambientais. **Semina** **16**(2): 238-243.
- Lopes, J.; J. A. C. Zequi; V. Nunes; O. de Oliveira; B. P. de O. Neto & W. Rodrigues. 2002. Immature Culicidae (Diptera) collected from the Igapó Lake located in the urban area of Londrina, Paraná, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology** **45**(4): 465-471.
- Lopes, J.; M. A. N. da Silva; A. M. Borsato; V. D. R. B. de Oliveira & F. J. de A. Oliveira. 1993. *Aedes (Stegomyia) aegypti* L. e a culicideofauna associada em área urbana da região sul, Brasil. **Revista de Saúde Pública** **27**(5): 326-333.
- Martinez Palacios, A. 1950. Identificación de los mosquitos Mexicanos del subgenero *Culex* (Diptera: Culicidae) por la genitalia masculina. **Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural** **11**: 183-187, illus.

- Marcondes, C. B.; A. Fernandes & G. A. Müller. 2006. Mosquitoes (Diptera: Culicidae) near a reservoir in the Western part of the Brazilian State of Santa Catarina. **Biota Neotropica** 6(3): 1-8.
- McNelly, J. R.; M. Smith; K. M. Micher-Stevens & B. A. Harrison. 2007. First Record of *Culex coronator* from Alabama. **Journal of the American Mosquito Control Association** 23(4): 473-475.
- Moritz, C., T. E. Dowling; W. M. Brown. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA. Relevance for population biology and systematics. **Annual Review of Ecology Systematic**, 8, 269-292.
- Navarro, J. & J. Liria. 2000. Phylogenetic relationships among eighteen Neotropical Culicini species. **Journal of the American Mosquito Control Association** 16(2): 75-85.
- Pecor, J. E.; J. Jones; M. J. Turell; R. Fernandez; F. Carvajal; M. O'Guinn; M. Sardalis; D. Watts; M. Zyzak; C. Calampa & T. A. Klein. 2000. Annotated Checklist of the mosquito species encountered during arboviral studies in Iquitos, Peru (Diptera: Culicidae). **Journal of the American Mosquito Control Association** 16(3): 210-218.
- Pecor, J. E.; R. E. Harbach; E. L. Peyton; D. R. Roberts; E. Rejmankova; S. Manguin & J. Palanko. 2002. Mosquito Studies in Belize, Central America: Records, Taxonomic Notes, and a Checklist of species. **Journal of the American Mosquito Control Association** 18(4): 241-276.
- Reinert. 1975. Mosquito generic and subgeneric abbreviations (Diptera: Culicidae). **Mosquito Systematics**, 7: 105-110.
- Reinert, J.F. 2001. Revised list of abbreviations for genera and subgenera of Culicidae (Diptera) and notes on generic and subgeneric changes. **Journal of the American Mosquito Control Association**, 17(1): 51-55.
- Reyes, P B. 1955. Lista de Mosquitos de Colombia, S.A. (DIPTERA, CULICIDAE) . **Anales de la Sociedad de Biología de Bogotá** 7(2): 46-94
- Reyes-Villanueva, F.; L. Barrientos-Lozano & M. A. Rodríguez-Perez. 2006. Patrón de alimentación de mosquitos (Diptera: Culicidae) transmisores del virus del Oeste del Nilo, recoletados sobre caballos y humanos en el norte de México.

Veterinaria México 37(4): 407-415.

Root, F. M. 1927c. Studies on Brazilian Mosquitoes. III. The Genus *Culex*. **American Journal of Hygiene 7: 574-598, 6pls.**

Rossi, G. C. & M. Martínez. 2003. Mosquitos (Diptera: Culicidae) del Uruguay. **Entomología y Vectores 10(4): 469-478.**

Ruiz, F., M. L. Quiñones, H. F. Erazo, D. A. Calle, J. F. Alzate, Y. Linton. 2005. Molecular differentiation of *Anopheles (Nyssorhynchus) benarrochi* and *An. (N.) oswaldoi* from Southern Colombia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 100(2): 155-160.**

Santos, C. L. S.; M. A. M. Sallum; H. M. Franco; F. M. Oshiro & I. M. Rocco. 2006. Genetic characterization of St. Louis encephalitis virus isolated from human in São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 101(1): 57-63.**

Saitou N & M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution 4: 406-425.**

Scherer, W. F.; R. W. Dickerman; A. Diaz-Najera; B. A. Ward; M. H. Miller & P. A. Schaffer. 1971. Ecologic studies of Venezuelan Encephalitis Virus in Southeastern México. 3. Infection of Mosquitoes. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 20(6): 969-979.**

Silva, A. M. da. 2002. Imaturos de mosquitos (Diptera, Culicidae) de áreas urbana e rural no norte do Estado do Paraná, Brasil. **Iheringia, Série Zoologia 92(4): 31-36.**

Singh, O. P.; G. Goswami; N. Nanda; K. Raghavendra; D. Chandra & S. K. Subbarao. 2004. An allele-specific polymerase chain reaction assay for the differentiation of members of the *Anopheles culicifacies* complex. **Journal of Biosciences 29(3): 275-280.**

Smith, J. P.; J. D. Walsh; E. H. Cope; R. A. Tennant, Jr.; J. A. Kozak III & R. E. Darsie, Jr. 2006. *Culex coronator* Dyar & Knab: A New Florida Species Record. **Journal of the American Mosquito Control Association 22(2): 330-332.**

Stone, A.; K. L. Knight & H. Starcke. 1959. A synoptic catalog of the mosquitoes of

the world (Diptera: Culicidae). **The Thomas Say Foundation vol. 6, 364 pp.**

Stone, A. 1967. A synoptic catalog, of the mosquitoes of the world, supplement III (Diptera : Culicidae). **Proceedings of the Entomological Society of Washington. 69(3): 197-224.**

Taípe-Lagos, C. B. & D. Natal. 2003. Abundância de culicídeos em área metropolitana preservada e suas implicações epidemiológicas. **Revista de Saúde Pública 37(3): 275-279.**

Teodoro, U.; A. L. F. Guilherme; A. L. Lozovei; V.L.S. Filho; O.C. Barbosa & E. M. de Lima. 1994. Mosquitos de ambientes peri e extradomiciliares na região sul do Brasil. **Revista de Saúde Pública 28(2): 107-115.**

Turell, M. J.; J. W. Jones; M. R. Sardelis; D. J. Dohm; R. E. Coleman; D. M. Watts; R. Fernandez; C. Calampa & T. A. Klein. 2000. Vector competence of Peruvian mosquitoes (Diptera: Culicidae) for epizootic and enzootic strains of Venezuelan equine encephalomyelitis virus. **Journal Medical Entomology 37(6): 835-839.**

Turell, M. J.; M. L. O'Guinn; J. W. Jones; M. R. Sardelis; D. J. Dohm; D. M. Watts; R. Fernandez; A. Travassos da Rosa; H. Guzman; R. Tesh; C. A. Rossi; G. V. Ludwig; J. A. Mangiafico; J. Kondig; L. P. Wasieloski, Jr.; J. Pecor; M. Zyzak; G. Schoeler; C. N. Mores; C. Calampa; J. S. Lee & T. A. Klein. 2005. Isolation of Viruses from mosquitoes (Diptera: Culicidae) Collected in the Amazon Basin Region of Peru. **Journal Medical Entomology, 42(5): 891-898.**

Urbínatti, P. R.; S. Sendacz & D. Natal. 2001. Imaturos de mosquitos (Diptera: Culicidae) em parque de área metropolitana aberto à visitação pública. **Revista de Saúde Pública 35(5): 461-466.**

Vargas, L. 1952. Relacion de las Especies de *Culex* de Las Americas con los Sinonimos mas Importantes. **Rev. Inst. Bol. Inst. Est. Med. Biol. Mex.9:167-206.**

Vargas & Martinez-Palacios, 1954. *Culex (Culex) coronator mooseri* N. Subsp. de Mexico. **Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales 14: 33-37, illus.**

Vasconcelos, P. F. C.; A. F. Sperb; H. A. O. Monteiro; M. A. N. Torres; M. R. S.

Sousa; H. B. Vasconcelos; L. B. L. F. Mardini & S. G. Rodrigues. 2003. Isolations of yellow fever virus from *Haemagogus leucocelaenus* in Rio Grande do Sul State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** **97**, 60-62.

Walton, C. R., G. Sharpe, S. J. Pritchard, N. J. Thelwell & R. K. Butlin. 1999. Molecular identification of mosquito species. **Biological Journal of the Linnean Society**, **68**: 241-256.

WRBU 2008. The Walter Reed Biosystematics Unit (<http://www.wrbu.org/>). Acessado em 18/VIII/2008.

Xavier, S. & S. S. Mattos. 1970. Distribuição geográfica dos culicíneos no Brasil (Diptera, Culicidae). II – Estado de Mato Grosso. **Separata da Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais** **22**(2-4): 441-460.