

Tipificación de especímenes colombianos de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) mediante “Código de Barras”

Typification of colombian specimens of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) by “Barcoding”

RICHARD HOYOS L.^{1,2}, SANDRA URIBE S.^{1,3} e IVÁN VÉLEZ⁴

Resumen: *Lutzomyia longipalpis*, es el principal vector de leishmaniasis visceral en el Neotropico y su identificación taxonómica es relevante en el contexto de la epidemiología y control de la enfermedad. La evidencia de un complejo de especies morfológicamente indistinguibles y la similitud morfológica de las hembras con otras especies del subgénero *Lutzomyia* y con la serie *longipalpis*, dificultan la identificación taxonómica cuando no se dispone de machos. En el presente estudio usamos la secuencia propuesta a nivel mundial como código de barras genético para diferenciar especies animales, para caracterizar especímenes pertenecientes a *L. longipalpis* de tres localidades de Colombia y evaluar su utilidad para separarlos de especies cercanas como *L. gomezi*, *L. cruciata* y *L. bifoliata*. El fragmento amplificado y secuenciado exhibió una longitud de 548 pb encontrándose 26 haplotipos para 33 individuos de *L. longipalpis*, un haplotipo para *L. gomezi*, un haplotipo para *L. cruciata* y dos haplotipos para *L. bifoliata*. Las distancias genéticas (K2P) entre haplotipos de *L. longipalpis* (0,05-0,07) y las agrupaciones en un dendrograma de NJ, separaron adecuadamente los individuos de *L. longipalpis* de los individuos de especies cercanas. Los individuos de *L. longipalpis* se separaron en dos grupos, uno que relaciona los haplotipos de Neiva y El Callejón, y otro para Girón. Las distancias genéticas entre los dos grupos de *L. longipalpis* fueron superiores a las registradas a nivel intraespecífico para especies previamente estudiadas con base en la secuencia código de barras como *L. trinidadensis* (0,042) y *L. panamensis* (0,02).

Palabras clave: Citocromo oxidasa I. Distancias genéticas. Neighbor-joining.

Abstract: *Lutzomyia longipalpis*, is the main vector of visceral leishmaniasis in the Neotropic and the taxonomic identification is relevant for epidemiologic studies and for the disease control. The evidence supporting the existence of a *L. longipalpis* species complex morphologically indistinguishable besides similarity with females belonging to the *Lutzomyia* subgenus and *longipalpis* series, difficult taxonomical identification when there are not available males. In this study, we used the sequence proposed worldwide as DNA barcode to distinguish animal species to characterize specimens belonging to *L. longipalpis* from three Colombian localities (Neiva, El Callejón, Girón) and evaluate their usefulness in separating them from closely related species such as *L. gomezi*, *L. cruciata* and *L. bifoliata*. The amplified and sequenced fragment exhibited a length of 548 bp and 26 haplotypes for 33 individuals of *L. longipalpis*, one haplotype for *L. gomezi*, one haplotype for *L. cruciata* and two haplotypes for *L. bifoliata* were found. Genetic distances (K2P) between *L. longipalpis* haplotypes (0.05-0.07) and clusters in a NJ dendrogram, effectively separated *L. longipalpis* from individuals belonging to closely related species. Individuals of *L. longipalpis* were separated in two groups, one included haplotypes from Neiva and El Callejón, and the other from Girón. The genetic distance found between the two groups of *L. longipalpis* were significantly higher than those found at the intraspecific level for species previously studied on the basis of the barcode sequence as *L. trinidadensis* (0.042) and *L. panamensis* (0.02).

Key words: Cytochrome Oxidase I. Genetic distances. Neighbor-joining.

Introducción

Lutzomyia longipalpis (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae), es una especie del subgénero *Lutzomyia*, caracterizada por la presencia de una corta espermateca anillada y un par de setas simples y persistentes en la base de la coxita del macho, también, en el parámetro, se encuentra un par de setas curvadas en el margen dorsal medio (Young y Duncan 1994). Esta especie se considera el principal vector de leishmaniasis visceral en el Neotrópico y fue descrita por primera vez a partir de colecciones hechas en Brasil por Lutz y Neiva en 1912 (Grimaldi *et al.* 1989; Lainson y Rangel 2005).

La distribución geográfica de *L. longipalpis* va desde el Sur de México hasta el norte de Argentina, pero es discontinua, ocurriendo primariamente en zonas con hábitats secos en Centroamérica y el norte de Suramérica, aunque también ha sido asociada con bosque húmedo en la bahía ribereña del Amazonas (Lanzaro *et al.* 1993).

En Colombia, *L. longipalpis* se encuentra asociado a bosque seco tropical de áreas del valle del río Magdalena, los departamentos de Santander y localidades de la costa caribe colombiana como Córdoba, Sucre y Guajira (González *et al.* 2006); sin embargo, en años recientes ha sido también colectada aunque en muy bajas densidades, en localidades y ecosistemas donde no había sido previamente registrada, ampliando su rango geográfico de distribución (Travi *et al.* 2002; Flórez *et al.* 2006; Viveros *et al.* 2010).

Diversos estudios han señalado un considerable aislamiento geográfico entre las poblaciones de *L. longipalpis* relacionado con su baja capacidad de vuelo, poca dispersión, y presencia de barreras climáticas y geográficas entre los sitios donde se encuentra (Morrison *et al.* 1993; Arrivillaga *et al.* 2002). La alta divergencia genética entre poblaciones y otras diferencias como las encontradas a nivel molecular en los péptidos producidos por la saliva (Maxadilan) de individuos de regiones geográficas diferentes (Warburg *et al.* 1994; Lan-

¹ Laboratorio de Sistemática y Biología de Insectos (Insectario), Grupo de investigación en Sistemática Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Calle 59A N° 63-20, A.A. 3840, Medellín, Colombia. Teléfono: (054) 4309394. ² M. Sc. Est. de Doctorado en Biología. Universidad de Antioquia. richard_hoyoslopez@yahoo.com. Autor para correspondencia. ³ M. Sc., Ph. D. Profesor Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. suribesoto@gmail.com. ⁴ M. Sc., Ph. D. Director Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales (PECET), Universidad de Antioquia, Calle 62 #52-59, A.A. 1226, Medellín, Colombia. idvelez@pecet-colombia.org.

zaro *et al.* 1999; Yin *et al.* 2000), han sugerido la existencia de un complejo de especies, las cuales podrían a su vez diferir en aspectos relacionados con su papel como vector (Ward *et al.* 1983; Ward *et al.* 1985; Lanzaro *et al.* 1993; Mutebi *et al.* 1998; Yin *et al.* 1999; Uribe 1999; Uribe *et al.* 2001; Arrivillaga *et al.* 2002, 2003; Watts *et al.* 2005). Adicionalmente, las hembras de *L. longipalpis* presentan rasgos morfológicos en las espermatecas muy similares a las del subgénero *Lutzomyia* y la serie *longipalpis*, y en especial a las de la especie *Lutzomyia cruzi* Mangabeira, 1938 (Martins *et al.* 1984; Young y Duncan 1994; Lanzaro y Warburg 1995; Vigoder *et al.* 2010). Por lo general, las características morfológicas de las espermatecas son fundamentales en la identificación taxonómica y en ausencia de machos, se dificulta la identificación y separación de las especies en zonas donde ocurren de forma simpátrica. En este contexto, disponer de una herramienta como las secuencias del código de barras genético para diferenciar *L. longipalpis* de forma rápida y eficiente sería de gran utilidad.

La iniciativa código de barras (BOLD) asigna secuencias de un fragmento del gen mitocondrial Citocromo oxidasa I (COI) a especies animales para facilitar el inventario de biodiversidad y la identificación de especies (Hebert *et al.* 2003), y aparece como una excelente herramienta en el caso de insectos de importancia médica, donde se requiere saber de forma rápida y acertada cuales son las especies presentes en un área de transmisión (Besansky *et al.* 2003; Azpurua *et al.* 2010; Jinbo *et al.* 2011).

La iniciativa ha tenido gran acogida por la conectividad y el lenguaje común de las secuencias de ADN, que permite a los investigadores de diferentes partes del mundo avanzar en estudios de taxonomía y sistemática de diversos grupos de organismos y en este caso particular de insectos vectores de enfermedades. Sin embargo, problemas como secuencias nucleares de origen mitocondrial (NUMTs), endosimbiontes, utilidad relativa en filogenia, concepto de especie, estandarización metodológica en el grupo de estudio, y la controversia en el uso de un solo marcador para un amplio rango de taxa (Moritz y Cicero 2004; Meier *et al.* 2006; Song *et al.* 2008; Casiraghi *et al.* 2010) hacen indispensables evaluar el fragmento propuesto como código de barras en cada grupo de especies a investigar, para validar su utilidad particular.

Es claro, que la iniciativa código de barras no es funcional para todos los grupos de especies y la variabilidad que exhibe, permite niveles de resolución que varían a lo largo de los grupos taxonómicos (Meier *et al.* 2006).

La tipificación molecular con haplotipos de la secuencia barcode a ejemplares del género *Lutzomyia* se ha iniciado recientemente incluyendo ejemplares de Panamá (Azpurua *et al.* 2010), con la idea de su uso potencial para diferenciar especies de importancia en la transmisión de leishmaniasis. En este sentido, el presente estudio pone a disposición de la comunidad científica las secuencias del principal vector de esta enfermedad (forma visceral) en Colombia y en particular de especímenes provenientes de los sitios donde se han registrado los importantes brotes de transmisión. Se asignan haplotipos de COI a especímenes machos *L. longipalpis* provenientes de las localidades de Neiva, El Callejón y Girón (Colombia).

Secuencias “barcode” de esta especie no se encontraron disponibles en las bases de datos de Genbank o CBOL al momento de la realización del estudio.

Materiales y Métodos

Los sitios de muestreo para *L. longipalpis* en Colombia son representativos de las regiones y ecosistemas colombianos donde se encuentra esta especie, de acuerdo con registros previos (Lanzaro *et al.* 1998; Uribe *et al.* 2001) y que fueron de fácil acceso en términos de seguridad de los investigadores. Los sitios seleccionados fueron: El Callejón (Departamento - Cundinamarca) (4°17'00,85"N 74°02'01,71"W), Girón (Departamento - Santander) (6°59'33,33"N -73°03'03"W) y Neiva (Departamento - Huila) (2°54'53,28"N 75°16'46,26"W), las cuales son áreas activas para la transmisión de leishmaniasis visceral (González *et al.* 2006). Las capturas se realizaron entre los años 2009 y 2010, con ocho trampas de luz tipo CDC miniatura incluyendo un área lineal de 500 metros desde el domicilio hasta relictos de bosque. Las trampas se dejaron funcionando desde las 18:00 p.m hasta las 6:00 a.m del día siguiente. Adicionalmente se usó trampa Shannon en inmediaciones del domicilio, desde las 18:00 a las 24:00 p.m.

Los individuos se almacenaron en viales individuales Eppendorf® de 1,5 ml y se llevaron al laboratorio para su posterior procesamiento e identificación. Bajo estereomicroscopio y en una gota de solución salina, los especímenes fueron procesados así: se cortó la cabeza, alas, y abdomen, que posteriormente fueron aclarados en lacto-fenol (1:1) para la identificación morfológica. El tórax y las patas se removieron cuidadosamente para la extracción de ADN, manteniéndose a 4°C en una gota de isopropanol al 100%. Para la observación morfológica detallada y verificación taxonómica tradicional, las partes correspondientes se montaron en lámina porta y cubreobjetos con bálsamo de Canadá. Para la determinación taxonómica se usaron las claves de Young (1979), Young y Duncan (1994), y Galati (2009) y se contó con la ayuda del experto Charles Porter del CDC (Center For Disease Control, Atlanta).

Igual procedimiento se realizó para los especímenes de las especies *Lutzomyia bifoliata* (Osorno, Morales, Osorno & Hoyos, 1970), *Lutzomyia gomezi* (Nitzulescu, 1931) (colectadas en Río Claro-Antioquia, Colombia) y *Lutzomyia cruciata* (Coquillett, 1907) (San Francisco del Coray - Honduras) que fueron incluidos en el estudio como punto de comparación en términos de distancias y agrupaciones.

Para la extracción de ADN se usó el método Porter y Collins (1991), y las partes removidas de los individuos confirmados taxonómicamente como *L. longipalpis*. Los oligonucleótidos que se utilizaron para amplificar el fragmento “código de barras” de Citocromo Oxidasa I (548 pb), fueron LCO1490 - GGTCACAAATCATAAAGATATTGG (forward) y HCO2198 - TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA (reverse) (Hebert *et al.* 2003).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue llevada a cabo en un termociclador PTC-100 (MJ Research) bajo las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos; seguido de 35 ciclos a 94°C por un minuto, 45°C a 1:50 minutos, 72°C a 1:50 minutos, y un paso final de 72°C a 5 minutos. La PCR se realizó en un volumen de 50 uL que contenía: buffer PCR 10X (NH₄SO₄), MgCl₂ (25 mM), oligonucleótidos (2 mM), DNTPs (100 mM), 4 uL ADN-muestra y 0,5 unidades de Taq polimerasa (Fermentas®).

Para visualizar los productos de la PCR se preparó un gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1X (Tris-Borato 40 mM, EDTA 1 mM a pH = 8.0), para sembrar 6 uL de cada muestra-producto de PCR (4/5 de ADN problema y 1/5 de EZ-Vis-

sion) con los controles positivos y negativos, y marcador de peso molecular (DNA Ladder-100 pb). Al gel se le aplicaron un voltaje de 90 voltios con una fuente de poder, durante 45 minutos para que el ADN migrara y luego se transfirió a una fuente de luz U.V para observar el resultado y fotografiar con cámara digital (Easy Kodak Share).

El fragmento amplificado se secuenció en ambos sentidos de la cadena, en un secuenciador automático ABI 310 en el Center of Disease Control (CDC - USA) gracias a todos los trabajos colaborativos con esa entidad. Los cromatogramas fueron editados manualmente en Bioedit v7.0.9 (Hall 1999) y alineados en ClustalW (Larkin *et al.* 2007) teniendo en cuenta la secuencia de referencia para Citocromo oxidasa I de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Genbank: NC_010241.1), y posteriormente evaluar la composición nucleotídica, variabilidad nucleotídica por sitio (entropía) y caracterización de mutaciones no informativas (patrón de saturación) mediante el software DAMBE (Xia 2002).

La descripción de la variabilidad de *L. longipalpis* y su comparación con los especímenes de las otras especies cercanas se realizó en términos de la variabilidad haplotípica, divergencias en las distancias genéticas correspondientes y sustituciones entre las secuencias.

El alineamiento final fue utilizado para calcular distancias métricas usando el modelo biparamétrico de Kimura (K2P) (Nei y Kumar 2000). Se calcularon diferencias nucleotídicas pareadas entre secuencias para haplotipos por localidad de *L. longipalpis* y secuencias de las especies relacionadas para calcular patrones de divergencia intra/interespecifica, además se realizó un dendrograma de Neighbor-Joining para representar las distancias genéticas mediante el software MEGA v4.1 (Tamura *et al.* 2007), teniendo en cuenta una prueba de bootstrap (1000 réplicas) para soportar las agrupaciones inferidas. También se utilizaron las secuencias registradas previamente por Azpurua *et al.* (2010), para construir un dendrograma de Neighbor-Joining (bootstrap = 1000 réplicas) y registrar la formación de agrupamientos y separación de especies del género *Lutzomyia* y los haplotipos colombianos de *L. longipalpis* secuenciados y alineados.

Resultados

El alineamiento fue de 548 pb y correspondió a las posiciones 1433-1947 del gen Citocromo Oxidasa I de *A. aegypti*, este segmento corresponde al propuesto por Hebert *et al.* (2003) como código de barras para la identificación de especies. Las secuencias mostraron un alto sesgo de A + T ($X = 68\%$) en relación con el contenido G + C ($X = 32\%$), como se ha registrado en los genes mitocondriales de artrópodos e insectos (Crease 1999; Hoy 2006). El contenido individual promedio de nucleótidos fue: A = 39,3%, G = 15,2%, C = 16,8%, T = 28,7%.

El alineamiento permitió discriminar 461 sitios conservados y 87 sitios variables (41 sitios parsimoniosamente informativos) (Tabla 1): 37 cambios sinónimos en la tercera posición del codón, 49 no sinónimas y un sitio que no pudo ser categorizado ya que hacía falta un nucleótido para completar el último codón. Se caracterizaron 26 haplotipos en las 33 secuencias y en la mayoría de las localidades se obtuvieron únicos haplotipos a excepción de cuatro individuos de Girón (LlongipalpisGiron61, LlongipalpisGiron71, LlongipalpisGiron181, LlongipalpisGiron351), tres individuos de El Callejón (LlongipalpisElCallejonB19, LlongipalpisElCallejonB20,

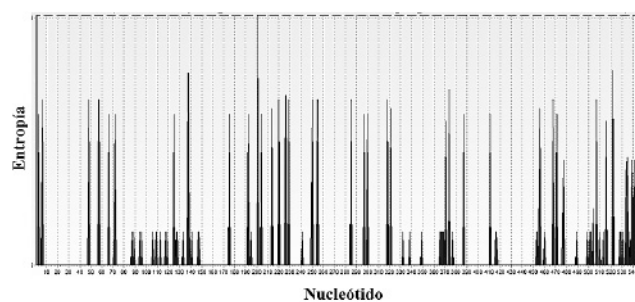


Figura 1. Entropía de la secuencia de nucleótidos dentro de la región del gen Citocromo oxidasa I - código de barras.

LlongipalpisElCallejonB21) y tres individuos de Neiva (LlongipalpisNeiva2.9, LlongipalpisNeiva2.13, LlongipalpisNeiva4.1); El mayor número de haplotipos fue observado en Callejón y Girón.

El análisis de entropía evidenció una variabilidad constante a lo largo del fragmento con tendencia a aumentar en las posiciones 190-255 (12 sustituciones) y 500-548 (21 sustituciones) (Fig. 1). La relación entre transiciones/transversiones, mostró un aumento gradual de las tasas de sustitución nucleotídica con respecto a las distancias genéticas entre las especies, especialmente de las transiciones, aunque sin presentar saturación de sustituciones (Fig. 2).

Las distancias genéticas (K2P) calculadas para haplotipos de *L. longipalpis* por localidad fueron variables presentando un intervalo de 5,0% (Neiva) a 7,0% (Girón), estos valores intra-específicos son mayores a los registrados para otras especies de amplia distribución e importancia vectorial (*L. trinidadensis*, *L. gomezi*, *L. panamensis*: < 4,0%) (Azpurua *et al.* 2010), sin embargo, las distancias inter-específicas con *L. bifoliata*, *L. gomezi* y *L. cruciata* se ubicaron entre el 12-18% originando una brecha con los haplotipos de *L. longipalpis* pertenecientes a diferentes localidades (Tabla 2). El dendrograma de Neighbor-Joining (Fig. 3) permitió agrupar y diferenciar los haplotipos de *L. longipalpis* de otras especies del subgénero *Lutzomyia* con significativos valores de bootstrap (> 70), mostrando la utilidad del fragmento secuenciado para distinguir a *L. longipalpis* de especies del subgénero *Lutzomyia* cercanas evolutivamente. A nivel intra-específico a pesar de las politomías entre haplotipos de una misma localidad, es evidente la formación de agrupamientos discretos entre secuencias locales, con excepción de dos haplotipos de Neiva (L.longNeiva2.2 y L.longNeiva2.19) que

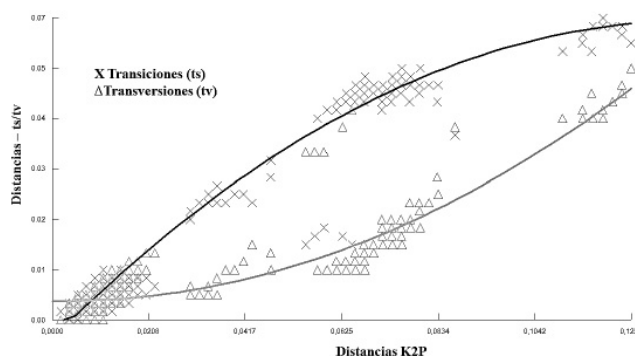


Figura 2. Distancias genéticas estimadas con el modelo Kimura-2 parámetros en relación con las tasas de transiciones y transversiones.

Tabla 1. Sitios polimórficos de las 33 secuencias pertenecientes a ejemplares colombianos de *L. longipalpis*.

Haplotipos	Sitios Polimórficos				
	1-----2-----3-----4-----5-----				
	4567788990011122233344479990012224558901233466667778111555667789000011122233333444444				
	368761279466937957838917852351440691055708128967891477167356081799124703628914579014678				
El Callejón					
LlongcallejonB20	AAGGGA	ACTT	ATTA	ATCT	TGG
LlongcallejonB19
LlongcallejonB21
LlongcallejonB23	T.....	C.....
LlongcallejonB24	G.....	A.A.....
LlongcallejonB25	T.....
LlongcallejonB26	A.....
LlongcallejonB27	A.....
LlongcallejonB28	C.....	A.....
Llongcallejon51	A.....	G.....
Llongcallejon121	A.....
Llongcallejon131	A.....
Llongcallejon141	A.....
Llongcallejon171	A.....	T.....
Llongcallejon191	A.....	T.....
Llongcallejon231	A.....
Llongcallejon241	A.....
Llongcallejon271	A.....
Girón					
Llonggiron31	TGATA.G.....	C.....	T.....	GAC.TGAATA.TAAGAAG.....	TT.ATG...G.TA.....G..CG.G..AC.....
Llonggiron61	TGATA.G.....	C.....	T.....	GA.TGAATA.TAAGAAG.....	TT.AT...G.TA.....G..CT.....
Llonggiron71	TGATA.G.....	C.....	T.....	GA.TGAATA.TAAGAAG.....	TT.AT...G.TA.....G..CT.....
Llonggiron181	TGATA.G.....	C.....	T.....	GA.TGAATA.TAAGAAG.....	TT.AT...G.TA.....G..CT.....
Llonggiron201	TGATA.G.....	C.....	T.....	GA.TGAATA.TAAGAAG..G.....	TT.AT...G.TA.....G..C...C...TA..T.
Llonggiron211	TGATA.G.....	C.....	T.....	GA.TGAATA.TAAGAAG.....	TT.AT...TA.....G..CT.....
Llonggiron281	TGATA.G.....	C.....	T.....	GA.TGAATA.TAAGAAG.....	TT.AT...G.TA.....G..T.....
Llonggiron351	TGATA.G.....	C.....	T.....	GA.TGAATA.TAAGAAG.....	TT.AT...G.TA.....G..CT.....
Llonggiron371	TGATA.G..ATAATTC	CAAAAA.CCGA..	TGAATA.TAAGAAGTG.TTTT.AC	AT...GT	T...GG.CTA.GCT.....
Llonggiron401	TGATA.G.....	C.....	T.....	GA.TGAATA.TAAGAAG.....	TT.AT...TA.....G..CCT.....
Neiva					
Llongipalpisneiva2.2	G.....	GA.....
Llongipalpisneiva2.9	.GAT.....	T.....	T.ATA.TAA..A.....	T..T.....G..T.....
Llongipalpisneiva2.19	A.....	G.....
Llongipalpisneiva2.13	.GAT.....	T.....	T.ATA.TAA..A.....	T..T.....G..T.....
Llongipalpisneiva4.1	.GAT.....	T.....	T.ATA.TAA..A.....	T..T.....G..T.....

se ubican dentro del grupo formado por los haplotipos de El Callejón. El dendrograma construido utilizando las secuencias caracterizadas por Azpurua *et al.* (2010) en Genbank, permitió separar claramente a *L. longipalpis* de otras especies pertenecientes a diferentes subgéneros, grupos y series del género *Lutzomyia* (Fig. 4).

Discusión

Los resultados indican que el fragmento de Citocromo oxidasa I usado como código de barras para la identificación taxonómica de especies, permite discriminar haplotipos de *L. longipalpis* de secuencias pertenecientes a *L. gomezi*, *L. cruciata* y *L. bifoliata* ubicadas dentro del subgénero *Lutzomyia*, presentando un patrón de variación nucleotídica a lo largo de la secuencia, que posibilita la rápida identificación molecular de especímenes colectados en focos de transmisión de leishmaniasis.

Estudios de “código de barras” han sido aplicados a otros insectos de interés médico y veterinario determinando un patrón de variación intra-específico no mayor al 4%: Culicidae (0-1,8%) (Kumar *et al.* 2007), Tabanidae (0-3,3%) (Cywinska *et al.* 2010) y Simuliidae (0-3,84%) (Rivera y Currie 2009). En Phlebotominae el análisis de las secuencias registradas por Azpurua *et al.* (2010) revela distancias intra-especie no mayores a 4% para *L. trinidadensis*, *L. gomezi* y *L. panamensis*, en nuestro estudio encontramos porcentajes de divergencia mayores (5-7%) para individuos de *L. longipalpis* provenientes de varias localidades de Colombia, que presentan diferentes condiciones locales a nivel ecológico y geográfico (González *et al.* 2006), así como una baja capacidad de dispersión del insecto a nivel local (< 1 km) (Morrison *et al.* 1993), evidenciando procesos adaptativos que sugieren la probable existencia de un complejo de especies en Colombia, como se ha demostrado en Brasil (Bauzer *et al.* 2007) y Venezuela (Arrivillaga *et al.* 2000).

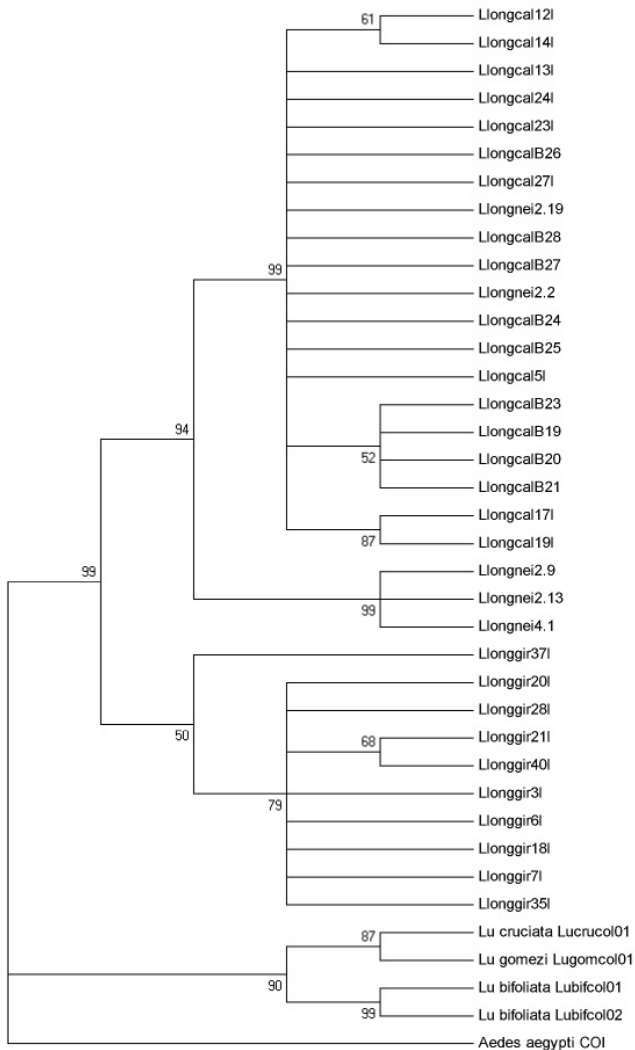


Figura 3. Dendrograma de Neighbor-Joining con el modelo K2P y bootstrapp de 1000 réplicas, mostrando valores de bootstrap cuando estos son superiores al 50% en los haplotipos colombianos del fragmento COI-barcode para *L. longipalpis*.

Para *L. longipalpis* se registraron haplotipos únicos por localidad, reflejando una alta segregación geográfica, lo cual fue confirmado por los agrupamientos en el dendrograma de Neighbor-Joining, con haplogrupos relacionados (Neiva y El Callejón) y divergentes (Girón / Neiva + El Callejón). Esta relación evolutiva cercana entre individuos de Neiva y

Tabla 2. Valores de distancias genéticas bajo el modelo biparamétrico de Kimura. Las distancias genéticas estimadas se muestran en negrillas y en *italica* la desviación estándar.

	<i>L. cruciata</i>	<i>L. gomezi</i>	<i>L. bifoliata</i>	Callejón	Girón	Neiva
<i>L. cruciata</i>	-	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01
<i>L. gomezi</i>	0,14	-	0.01	0.01	0.01	0.01
<i>L. bifoliata</i>	0,18	0,16	-	0.01	0.01	0.01
Callejón	0,15	0,16	0,12	-	0.01	0.01
Girón	0,15	0,17	0,14	0,06	-	0.01
Neiva	0,15	0,16	0,13	0,05	0,07	-

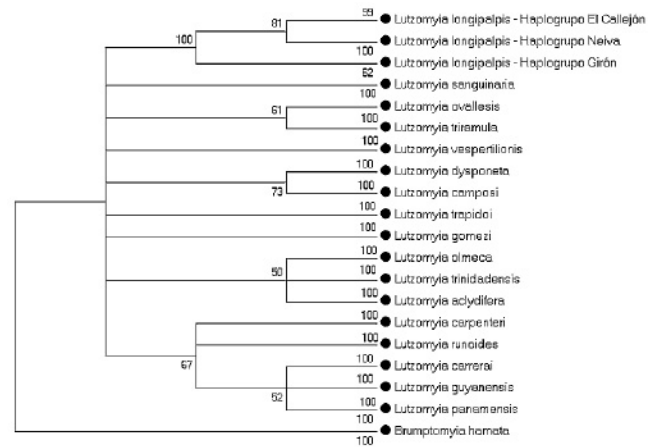


Figura 4. Dendrograma de Neighbor-Joining con el modelo K2P y bootstrap de 1000 réplicas, mostrando valores superiores al punto de corte (50%) de los haplotipos caracterizados para *L. longipalpis* y las secuencias registradas por Azpurua *et al.* (2010).

El Callejón fue también registrada por Uribe *et al.* (2001) al evaluar las relaciones filogenéticas de especímenes del intervalo de distribución de *L. longipalpis* mediante el gen ND4. Las distancias genéticas estimadas y las relaciones evolutivas inferidas (Girón-Neiva + El Callejón) con los haplotipos de COI son similares a los haplotipos caracterizados con ND4 (Uribe *et al.* 2001) y COI (Arrivillaga *et al.* 2002), pero difieren de los resultados publicados por Lanzaro *et al.* (1998), al obtener bajas distancias de Nei a partir de isoenzimas con individuos de Neiva, Melgar (Cundinamarca) y Palo Alto (Santander), concluyendo que *L. longipalpis* en Colombia constituye una sola especie con baja variabilidad genética.

El nivel de divergencia inter-específico presentó un intervalo de valores (12-18%) no solapado con los obtenidos en *L. longipalpis*, probando la eficiencia del marcador para diferenciar especies; así mismo, es destacable la alta divergencia entre haplotipos de *L. longipalpis* de diferentes localidades, haciendo este marcador atractivo para futuros estudios en esta especie. En este sentido, sería importante construir una librería con secuencias de COI de *L. longipalpis*, incluyendo el mayor número de localidades donde se ha registrado la especie, y en particular, aquellas diferentes a bosque seco tropical (Norcasia, PECET, datos no publicados) entre otras (López *et al.* 1996; González *et al.* 2006), esto permitiría evaluar la utilidad de la secuencia “códigos de barra” para esta especie en el rango completo de su distribución y precisar el aspecto de la existencia del complejo de especies *L. longipalpis* para el país.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad Nacional de Colombia-Sede Medellín por la financiación de este trabajo enmarcado en el Proyecto DIME QUIPU 20101009543 y al Dr Charles Porter del CDC por su apoyo constante y asesoría.

Literatura citada

ARRIVILLAGA, J.; RANGEL, Y.; OVIEDO, M.; FELICIANGE-LI, M. 2000. Genetic diversity among Venezuelan populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Journal of Medical Entomology 37: 325-330.

- ARRIVILLAGA, J.; NORRIS, D.; FELICIANGELI, M.; LANZARO, G. 2002. Phylogeography of the neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* inferred from mitochondrial DNA sequences. *Infection, Genetics and Evolution* 2: 83-95.
- ARRIVILLAGA, J.; MUTEPI, J.; PINANGO, H.; NORRIS, D.; ALEXANDER, B.; FELICIANGELI, M.; LANZARO, G. 2003. The taxonomic status of genetically divergent populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) based on the distribution of mitochondrial and isozyme variation. *Journal of Medical Entomology* 40: 615-627.
- AZPURUA, J.; CRUZ, D.; VALDERRAMA, A.; WINDSOR, D. 2010. *Lutzomyia* Sand Fly Diversity and Rates of Infection by *Wolbachia* and an Exotic *Leishmania* Species on Barro Colorado Island, Panama. *PLoS* 4: 1-8.
- BESANSKY, N.; SEVERSON, D.; FERDING, D. 2003. DNA barcoding of parasites and invertebrate disease vectors: what you don't know can hurt you. *TRENDS in Parasitology* 19: 545-546.
- BAUZER, L.; SOUZA, N.; MAINGON, R.; PEIXOTO, A. 2007. *Lutzomyia longipalpis* in Brazil: a complex or a single species? A mini-review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102 (1): 1-12.
- CASIRAGHI, M.; LABRA, M.; FERRI, M.; GALIMBERTI, A.; MATTIA, F. 2010. DNA barcoding: a six-question tour to improve users' awareness about the method. *Briefings in Bioinformatics* 11: 440-453.
- CREASE, T. J. 1999. The complete sequence for the mitochondrial genome of *Daphnia pulex* (Cladocera: Crustacea). *Gene* 233: 89-99.
- CYWINSKA, A.; HANNAN, M.; KEVAN, P.; ROUGHLEY, R.; IRANPOUR, M.; HUNTER, F. 2010. Evaluation of DNA barcoding and identification of new Haplomorphs in Canadian deerflies and horseflies. *Medical and Veterinary Entomology* 24: 382-410.
- FLÓREZ, M.; MARTÍNEZ, J.; GUTIÉRREZ, R.; LUNA, K.; SE-RRANO, H.; FERRO, C.; ANGULO, V.; SANDOVAL, M. 2006. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at a suburban focus of visceral leishmaniasis in the Chicamocha Canyon, Santander, Colombia. *Biomédica* 26: 109-120.
- GALATI, E. 2009. Bioecologia e Identificação de Phlebotominae: Classificação, Morfologia e Terminologia e Identificação de Adultos. Vol I-II. Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública. Universidade de São Paulo, 275 p.
- GONZÁLEZ, C.; CABRERA, O. L.; MUNSTERMANN, L. E.; FERRO, C. 2006. Distribución de vectores de *Leishmania infantum* en Colombia. *Biomédica* 26 (Suppl I): 64-72.
- GRIMALDI, G.; TESH, R.; MACHAMON, D. 1989. A review on the geographic distribution and epidemiology of Leishmaniasis in the new world. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 41: 687-725.
- HALL, T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.
- HEBERT, P.; CYWINSKA, A.; BALL, S.; DEWAARD, D. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings Royal Society of London* 270: 313-321.
- HOY, M. 2006. *Insect molecular genetics: an introduction to principles and applications*. Academic press, San Diego, 544 p.
- JINBO, U.; KATO, T.; ITO, M. 2011. Current progress in DNA barcoding and future implications for entomology. *Entomological Science* 14: 107-124.
- KUMAR, P.; RAJAVEL, A.; NATARAJAN, R.; JAMBULIGAM, P. 2007. DNA barcodes can distinguish species of Indian mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 44: 1-7.
- LAINSON, R.; RANGEL, E. 2005. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis; with particular reference to Brazil - A Review - *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 100 (8): 811-827.
- LANZARO, G.; WARBURG, A. 1995. Genetic variability in phlebotomine sandflies: possible implications for leishmaniasis epidemiology. *Parasitology Today* 11: 151-154.
- LANZARO, G.; OSTROVSKA, K.; HERRERO, M.; LAWYER, P.; WARBURG, A. 1993. *Lutzomyia longipalpis* is a species complex: genetic divergence and interspecific hybrid sterility among three populations. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 48: 839-847.
- LANZARO, G.; ALEXANDER, B.; MUTEPI, J.; MONTOYA, J.; WARBURG, A. 1998. Genetic variation among natural and laboratory colony populations of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae) from Colombia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 93: 65-69.
- LANZARO, G.; LOPES, A.; RIBEIRO, J.; SHOEMAKER, C.; WARBURG, A.; SOARES, M.; TITUS, R. 1999. Variation in the salivary peptide, maxadilan, from species in the *Lutzomyia longipalpis*. *Insect Molecular Biology* 8: 267-275.
- LARKIN, M.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I.; WILM, A.; LÓPEZ, R.; THOMPSON, J.; GIBSON, G.; HIGGINS, D. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.
- LÓPEZ, Y.; OSORIO, L.; ÁLVAREZ, G.; ROJAS, J.; JIMÉNEZ, F.; GÓMEZ, C. 1996. Sandfly *Lutzomyia longipalpis* in a cutaneous leishmaniasis focus in central Colombia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 91: 415-419.
- MARTINS, A.; FALCÃO, A.; SILVA, J.; DIAS, E. 1984. Nota sobre *Lutzomyia (Lutzomyia) cruzi* (Mangabeira, 1938); com a descrição da fêmea (Diptera.; Psychodidae.; Phlebotominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 79: 439-442.
- MEIER, R.; SHIYANG, K.; VAIDYA, G.; NG, P. 2006. DNA barcoding and taxonomy in Diptera: A tale of high intraspecific variability and low identification success. *Systematic Biology* 55: 715-728.
- MORITZ, C.; CICERO, C. 2004. DNA Barcoding: Promise and Pitfalls. *PLoS Biology* 2: 1529-1531.
- MORRISON, A.; FERRO, C.; MORALES, A.; TESH, R.; WILSON, M. 1993. Dispersal of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. *Journal of Medical Entomology* 30: 427-435.
- MUTEPI, J.; ROWTON, E.; HERRERO, M.; PONCE, C.; BELLI, A.; VALLE, S.; LANZARO, G. 1998. Genetic variability among populations of the sand fly *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from Central America. *Journal Medical Entomology* 35: 169-174.
- NEI, M.; KUMAR, S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York, 333 p.
- PORTER, C.; COLLINS, F. 1991. Species-diagnostic differences in a ribosomal DNA internal transcribed spacer from the sibling species *Anopheles freeborni* and *Anopheles hermsi* (Diptera: Culicidae). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 45: 271-279.
- RIVERA, J.; CURRIE, D. 2009. Identification of Nearctic black flies using DNA barcodes (Diptera: Simuliidae). *Molecular Ecology Resources* 9: 224-236.
- SONG, H.; BUHAY, J.; WHITING, M.; CRANDALL, K. 2008. Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. *PNAS* 105: 13486-13491.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- TRAVI, B.; ADLER, G.; LOZANO, M.; CADENA, H.; MONTOYA-LERMA, J. 2002. Impact of habitat degradation on phlebotominae (Diptera: Psychodidae) of tropical dry forests in Northern Colombia. *Journal Medical of Entomology* 39: 451-456.

- URIBE, S. 1999. The status of the *Lutzomyia longipalpis* species complex and possible implications for Leishmania transmission. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 94: 729-734.
- URIBE, S.; LEHMANN, T.; ROWTON, E.; VÉLEZ, I.; PORTER, C. 2001. Speciation and population structure in the morphospecies *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva) as derived from the mitochondrial ND4 gene. Molecular, Phylogenetic and Evolution 18: 84-93.
- VIGODER, F.; ARAKI, A.; BAUZER, L.; SOUZA, N.; BRAZIL, R.; PEIXOTO, A. 2010. Lovesongs and period gene polymorphisms indicate *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) as a sibling species of the *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva, 1912) complex. Infection, Genetics and Evolution 10: 734-739.
- VIVEROS, R.; BEJARANO, E.; PEREZ, A.; ESTRADA, L.; FLÓREZ, F.; TORRES, C.; MUSKUS, C. 2010. Presencia de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) en los alrededores de un núcleo urbano del Caribe Colombiano. Biota Neotrópica 9: 277-280.
- WARBURG, A.; SARAIVA, E.; LANZARO, G.; TITUS, R.; NEVA, F. 1994. Saliva of *Lutzomyia longipalpis* sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 29: 223-230.
- WARD, R.; RIBEIRO, A.; READY, P.; MURTAGH, A. 1983. Reproductive isolation between different forms of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva), (Diptera: Psychodidae), the vector of *leishmania donovani* chagasi Cunha & Chagas and its significance to kala-azar distribution in South America. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 78: 269-280.
- WARD, R.; RIBEIRO, A.; RYAN, L.; FALCO, A.; RANGEL, E. 1985. The distribution of two morphological forms of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 80: 145-148.
- WATTS, P.; HAMILTON, J.; WARD, R.; NOYES, H.; SOUZA, N.; KEMP, S.; FELICIANGELI, M.; BRAZIL, R.; MAINGON, R. 2005. Male sex pheromones and the phylogeographic structure of the *Lutzomyia longipalpis* species complex (Diptera: Psychodidae) from Brazil and Venezuela. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 73: 734-743.
- XIA, X. 2002. DAMBE: Data Analysis in Molecular Biology and Evolution. New York, Kluwer Academic Express Editors, 284 p.
- YIN, H.; MUTEBI, J.; MARRIOTT, S.; LANZARO, G. 1999. Metaphase karyotypes and G-banding in sandflies of the *Lutzomyia longipalpis* complex. Medical & Veterinary Entomology 13: 72-77.
- YIN, H.; NORRIS, D.; LANZARO, G. 2000. Sibling species in the *Lutzomyia longipalpis* complex differ in levels of mRNA expression for the salivary peptide, maxadilan. Insect Molecular Biology 9: 309-314.
- YOUNG, D. 1979. A review of the bloodsucking psychodid flies of Colombia (Diptera: Phlebotominae and Sycoracinae). Institute of Food and Agricultural Sciences, Technical Bulletin 806: 1-266.
- YOUNG, D.; DUNCAN, M. A. 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Memoirs of the American Entomological Institute 54: 1-881.

Recibido: 9-may-2011 • Aceptado: 14-mayo-2012