



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Inventario de especies y diversidad haplotípica MtCOI de Phlebotominae
(Diptera: Psychodidae) en zonas de importancia para la transmisión de
leishmaniasis en Colombia**

Laura Cristina Posada López

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Medellín, Colombia

2016

**Inventario de especies y diversidad haplotípica MtCOI de Phlebotominae
(Diptera: Psychodidae) en zonas de importancia para la transmisión de
leishmaniasis en Colombia**

Laura Cristina Posada López

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Entomología

Directora:

Sandra Inés Uribe Soto PhD., MSc., Ingeniera Agrónoma

Codirector:

Iván Darío Vélez Bernal PhD., MSc., Médico.

Línea de Investigación:

Sistemática molecular,

Grupo de Investigación en Sistemática Molecular

Entomología médica y molecular,

Programa de estudio y control de enfermedades tropicales (UdeA)

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Medellín, Colombia

2016

Agradecimientos

A mi eterno amor, mi papa, viviré como si pudieras disfrutar mis logros.

A mis hermanas, mi sobrina y mi mama por su apoyo, amor incondicional y comprensión.

A la Dra. Sandra Uribe Soto, directora de tesis, por su orientación, disposición y apoyo en este proceso.

Al Dr. Iván Darío Vélez por permitir el desarrollo experimental de este proyecto de investigación en los laboratorios del PECET.

A Andrés Vélez por su apoyo incondicional y sus valiosos aportes.

A mis amigos del PECET: Jovany Barajas, Sandra Gómez, Sandra Ángel, Lili Poca, Anita González, Gustavo Blandón, Esteban Marín, Alex Uribe, Alejo Vergara, Rafael Vivero y Jorge Alvar, por todas sus contribuciones y su amistad.

A todos mis compañeros del PCECET.

Resumen

La leishmaniasis es transmitida por algunas especies de flebotomíneos. Dada la compleja taxonomía de este grupo tan diverso, se necesitan nuevos métodos para una rápida y práctica identificación. El objetivo de este trabajo fue realizar un inventario actualizado de especies de flebotomíneos y estimar la diversidad haplotípica de la secuencia "Barcode", en zonas endémicas para leishmaniasis. Se realizaron colectas usando trampas tipo CDC en nueve municipios, resultando en un listado de 49 especies de la subfamilia Phlebotominae. Adicionalmente, se encontró un morfotipo denominado *Trichophoromyia* sp, que corresponde a una especie no descrita. Se aportan secuencias COI para un total de 43 especies, 12 de las cuales no tenían secuencias previamente reportadas. Entre las especies colectadas, 15 (30%) son reconocidas por sus hábitos antropofílicos y antecedentes epidemiológicos en América. Se reporta por primera vez en Colombia la presencia de *Ev. (Eva) georgii* y *Pa. (Psa) pradobarrientosi*, además de nuevos registros para Caldas (3 especies) y Amazonas (7 especies).

Palabras clave: flebotomíneos, taxonomía, inventario, Barcode, COI.

Abstract

Leishmaniasis is transmitted by some species of phlebotomines. Given the complex taxonomy of this diverse group, better methods for a fast and practical identification are needed. The aim of this project was to make an updated inventory of sand fly species and estimate haplotype diversity of the "Barcode" sequence in leishmaniasis-endemic areas. Sampling was carried out using CDC light traps in nine municipalities, which has resulted a list of 49 species of the subfamily Phlebotominae. Additionally, an undescribed species belonging to a morphotype called *Trichophoromyia* sp. was found. COI sequences are provided for a total of 43 species, 12 of which had no previous reported sequences. Among the species collected, 15 (30%) are recognized for their anthropophilic behaviour and epidemiological history in América. The presence of *Ev. (Eva) georgii* and *Pa. (Psa) pradobarrientosi* is reported for the first time in Colombia, in addition to new records for Caldas (3 species) and Amazonas (7 species).

key words: Sand fly, phlebotomine, taxonomy, inventory, Barcode, COI sequence.

Contenido

Agradecimientos.....	III
Resumen.....	IV
Abstract.....	IV
Lista de tablas	X
Introducción	1
1. Capítulo 1: Marco teórico	4
1.1 Generalidades sobre los flebotomíneos.....	4
1.1.1 Clasificación taxonómica y distribución	4
1.1.2 Biología y Ecología	6
1.1.3 Ciclo de vida.....	7
1.1.4 Diagnóstico taxonómico de Phlebotominae	9
1.1.5 Identificación molecular	11
1.1.6 Importancia médica de las especies de la subfamilia Phlebotominae.....	13
1.1.7 La leishmaniasis en Colombia.....	14
1.1.8 Flebotomíneos en zonas de importancia para la transmisión de la leishmaniasis	15
1.2 Objetivos.....	17
1.2.1 General	17
1.2.2 Específicos.....	17
1.3 Hipótesis.....	17
2. Capítulo 2: Inventario de especies de la subfamilia Phlebotominae	18
2.1 Metodología.....	18
2.1.1 Área de estudio	18
2.1.2 Colecta en campo.....	20
2.1.3 Protocolos de laboratorio:.....	21
2.1.4 Importancia médica de las especies de la subfamilia Phlebotominae.....	23
2.2 Resultados.....	23
2.2.1 Material biológico estudiado	23
2.2.2 Especies de flebotomíneos determinadas por taxonomía clásica	25
2.2.3 Importancia de las especies de flebotomíneos.....	45
2.3 DISCUSIÓN	47
Capítulo 3: Inventario de códigos genéticos COI.....	51
3.1 Metodología.....	51
3.1.1 Extracción de ADN total	51
3.1.2 Amplificación del fragmento 5' del gen Citocromo Oxidasa I (COI) mediante la técnica de PCR.....	52
3.1.3 Visualización y secuenciación de los productos de PCR.....	52

3.1.4 Edición, alineamiento y análisis molecular de las secuencias	53
3.2 Resultados.....	54
3.2.1 Secuencias COI obtenidas en este estudio	54
3.2.2 Alineamiento, composición y divergencia nucleotídica	58
3.2.3 Divergencia a nivel intraespecífico.....	65
3.2.4 Divergencia a nivel interespecífico.....	68
3.2.5 Especies hipotéticas basadas en el Barcoding-gap.....	71
3.2.6 Dendrogramas Neighbor-Joining.....	72
3.3 Discusión	82
4. Conclusiones y perspectivas.....	91
4.1 Conclusiones	91
4.2 Perspectivas.....	92
Anexo 1:	93
Anexo 2:	95
Anexo 3:	96
Anexo 4:	122
Referencias bibliográficas.....	126

Lista de figuras

Figura 2-1: Ubicación de los sitios de muestreo

Figura 2-2 Trampa CDC para captura de flebotomíneos

Figura 2-3: Flebotomíneo fragmentado antes del proceso de aclarado

Figura 2-4: Montaje permanente de flebotomíneos adultos

Figura 2-5: *Br. leopoldoi*

Figura 2-6: *Br. mesai*

Figura 2-7: *Mi. (Sau) trinidadensis*

Figura 2-8 *Mi. (Mic) cayennensis cayennesis*

Figura 2-9: *Mi. (Mic) micropyga*

Figura 2-10: *Mi. (Mic) chassigenti*

Figura 2-11: *Sc. preclara*

Figura 2-12: *Sc. sordellii*

Figura 2-13: *Lu. (Hel) hartmanni*

Figura 2-14: *Lu. (Hel) tortura*

Figura 2-15: *Lu. (Trl) gomezi*

Figura 2-16: *Lu. (Trl) sherlocki*

Figura 2-17: *Lu. (Lut) bifoliata*

Figura 2-18: *Pi. (Pif) evansi*

Figura 2-19: *Pi. (Pif) nevesi*

Figura 2-20: *Pi. (Pif) rangeliana*

Figura 2-21: *Pr. camposi*

Figura 2-22: *Pr. choti*

Figura 2-23: *Ty. triramula*

Figura 2-24: *Ev. (Ald) walkeri*

Figura 2-25: *Ev. (Eva) georgii*

Figura 2-26: *Ev. (Eva) saulensis*

Figura 2-27: *Pa. (For.) aragaoi*

Figura 2-28: *Pa. (For) carpenteri*

Figura 2-29: *Pa. (For) pradobarrientosi*

Figura 2-30: *Pa. (Xip.) dreisbachi*

Figura 2-31: *Pa. (Psa) dendrophyla*

Figura 2-32: *Pa. (Psa) punctigeniculata*

Figura 2-33: *Pa. (Psa) shannoni*

Figura 2-34: *Vi. furcata*

Figura 2-35: *Ps. amazonensis*

Figura 2-36: *Ps. ayrozai*

Figura 2-37: *Ps. carrerai carrerai*

Figura 2-38: *Ps. hirsutus hirsutus*

Figura 2-39: *Ps. panamensis*

Figura 2-40: *Ps. paraensis*

Figura 2-41: *Ps. geniculatus*

Figura 2-42: *Ny. antunesi*

Figura 2-43: *Ny. trapidoi*

Figura 2-44: *Ny. umbratilis*

Figura 2-45: *Ny. yuilli yuilli*

Figura 2-46: *Ny. yuilli pajoti*

Figura 2-47: *Trichophoromyia*

Figura 2-48: *Th. howardi*

Figura 3-1: Productos de la amplificación por PCR del fragmento 5' del gen COI, en flebotomíneos colectados en la comunidad Tipisca de Puerto Nariño (Amazonas)

Figura 3-2: Comparación de secuencias del gen COI entre 43 especies de flebotomíneos de zonas de importancias médica

Figura 3-3: Comparación entre las distancias K2P intraespecie e interespecie en flebotomíneos de Colombia

Figura 3-4: Dendrograma consenso Neighbor-Joining de secuencias COI (Barcode) para los flebotomíneos incluidos en el estudio

Figura 3-5: Dendrograma consenso Neighbor-Joining de secuencias COI del género *Brumptomyia*

Figura 3-6: Dendrograma consenso Neighbor-Joining de secuencias COI del género *Sciopemyia*

Figura 3-7: Dendrograma consenso Neighbor-Joining de secuencias COI del género *Micropygomyia*

Figura 3-8: Dendrograma consenso Neighbor-Joining de secuencias COI del género *Lutzomyia*

Figura 3-9: Dendrograma consenso Neighbor-Joining de secuencias COI del género *Pintomyia*

Figura 3-10: Dendrograma consenso Neighbor-Joining de secuencias COI de flebotomíneos de los géneros *Pressatia* y *Triramula*

Figura 3-11: Dendrograma consenso Neighbor-Joining de secuencias COI del género *Evandromyia*

Figura 3-12: Dendrograma consenso Neighbor-Joining de secuencias COI del género *Psathyromyia*

Figura 3-13: Dendrograma consenso Neighbor-Joining de secuencias COI del género *Psychodopygus*

Figura 3-14: Dendrograma consenso Neighbor-Joining de secuencias COI del género *Nyssomyia*

Figura 3-15: Dendrograma consenso Neighbor-Joining de secuencias COI del género *Trichophoromyia*

Lista de tablas

Tabla 2-1: Municipios incluidos en el estudio de flebotomíneos en zonas importantes para la transmisión de la leishmaniasis en Colombia

Tabla 2-2: Importancia médica de las especies de Phlebotominae colectadas en el estudio

Tabla 3-1: Códigos de las secuencias COI relacionando especie, localidad y sexo

Tabla 3-2: Códigos de las secuencias COI de flebotomíneos colectados en Centroamérica relacionando especie, localidad y sexo

Tabla 3-3: Número de haplotipos de la secuencia COI, por especie de flebotomíneo

Tabla 3-4: Porcentaje de similitud entre las secuencias del estudio y las publicadas en base de datos

Tabla 3-5: Divergencia intraespecífica bajo el modelo K2P, entre secuencias del gen COI en flebotomíneos

Tabla 3-6: Distancias genéticas K2P entre secuencias parciales del gen COI de *Mi. micropyga*

Tabla 3-7: Distancias genéticas K2P entre secuencias parciales del gen COI de *Pi. evansi*

Table 3-8: Resultados del análisis ABGD (Results of the Automatic Barcode Gap Discovery)

Introducción

La leishmaniasis es un grupo de enfermedades causada por tripanosomátidos del género *Leishmania*, es endémica en 98 países y según la OMS anualmente se presentan dos millones de casos nuevos. En Colombia se presentan tres manifestaciones clínicas de la enfermedad, siendo la leishmaniasis cutánea la más común. El país ocupa el segundo lugar en incidencia en América, después de Brasil (OPS 2007, Murray *et al*, 2005, Reithinger *et al*. 2007).

El agente causal de esta enfermedad es transmitido a través de la picadura de hembras de la subfamilia Phlebotominae Rondani, 1840. Se estima que en total hay cerca de 950 especies flebotomíneos en el mundo, 550 en América (Duckhouse DA & Lewis DJ, 1980; Galati, 2014).

Colombia cuenta con una gran diversidad de especies de flebotomíneos con características morfológicas particulares y cuyo papel en la transmisión de la leishmaniasis por lo general corresponde a especies determinadas (Alvar 2001), razón por la cual su determinación taxonómica es crucial para entender aspectos biológicos y ecológicos que determinan patrones y dinámicas de las enfermedades que transmiten.

La identificación de los flebotomíneos se basa en caracteres morfológicos; sin embargo, se evidencian limitaciones de esta aproximación de taxonomía clásica, tales como la variación dentro de una misma especie, la presencia de especies crípticas, la ausencia de características morfológicas distintivas en algunas especies, la existencia y difusión de técnicas de montaje no apropiadas, sumado a esto que se requiere un alto grado de habilidad y experticia taxonómica. Estos aspectos sugieren la necesidad de búsqueda de herramientas adicionales para la identificación rápida de especies.

Las herramientas moleculares están siendo usadas ampliamente para explorar cuestiones de taxonomía en los diferentes niveles jerárquicos. Al respecto se han usado secuencias de genes ribosomales para evaluar relaciones evolutivas al interior de la subfamilia Phlebotominae (18SrDNA y el dominio D2 en 28SrDNA) (Aransay *et al*, 1999), y al interior del género *Lutzomyia* (Beati *et al*, 2004; Kato *et al*, 2007; Kato *et al*, 2008) ya que esta región tiene una mayor tasa de mutación; sin embargo, se ha planteado el uso de otros genes mitocondriales (por ejemplo, el citocromo b y NADH deshidrogenasa 1 y 4), y genes nucleares (como ITS2) para resolver relaciones intraespecíficas y subgenéricas

(Beati *et al.* 2004; Vivero *et al.* 2007; Vivero *et al.* 2009). A raíz de la propuesta de utilizar las secuencias de ADN como una herramienta de apoyo para el estudio de la diversidad biológica, Hebert y colaboradores sugieren el uso y análisis del fragmento 5' del gen mitocondrial citocromo c oxidasa subunidad I (COI), llamado código de barras de ADN, para inventarios rápidos de biodiversidad (Herbert y Gregory, 2005). Posteriormente esta región pasa de ser de importancia para facilitar los inventarios de la biodiversidad a ser una eficaz herramienta para la identificación de especies (Azpurua *et al.*, 2010; Contreras, 2013; Contreras *et al.*, 2014; Pinto *et al.*, 2015; Romero *et al.*, 2016).

La iniciativa de código de barras de ADN ha sido bien recibida por la conectividad y el lenguaje común de las secuencias de ADN, permitiendo a los investigadores de todo el mundo avanzar en la taxonomía y los estudios sistemáticos de los diversos grupos de organismos, principalmente en insectos de importancia médica, donde se requiere la identificación rápida y precisa de las especies que están presentes en un área de transmisión.

En cuanto a inventarios de especies de flebotomíneos, basados en identificación por taxonomía clásica el trabajo más relevante para Colombia es el de Bejarano y colaboradores en el 2006, donde se presenta la distribución geográfica de 163 especies de flebotomíneos en el país, de las cuales 14 especies han sido señaladas como de importancia médica (Bejarano, 2006; Vélez *et al.* 1991; Santamaría *et al.* 2006; Ferro *et al.* 2011).

A pesar de la eficacia de los códigos de barras del ADN en otros taxa y de las dificultades de identificación o separación morfológica de algunas especies de flebotomíneos, existen pocos estudios sobre *Barcode* y en general sobre taxonomía integrativa de flebotomíneos en Colombia.

A la fecha se destaca el trabajo desarrollado por Contreras y colaboradores en la zona cafetera (2014), donde se asignaron los haplotipos de la secuencia de código de barras a 148 individuos pertenecientes a 36 especies. Este trabajo utilizó esta metodología como una herramienta válida para la identificación molecular de especies de flebotomíneos, en combinación con la morfología.

Es importante resaltar que para el país, solo se cuenta con la secuencia Barcode del 35% del total de especies, lo que corresponde a 57 de las 163 (Azpurua *et al.*, 2010; Contreras

et al, 2014; Hoyos *et al*, 2012; Romero *et al*, 2016); esto sin tener en cuenta que el número total de especies descritas podría incrementar considerablemente (se ha hablado de 172 especies descritas para el país), lo que sugiere la necesidad de continuar ampliando la librería del fragmento 5' del gen COI, incluyendo todas las especies faltantes y sobre todo, aquellas de las que se ha comprobado juegan un papel importante como vectores de leishmaniasis en otros países del continente. Esto con la idea de llegar a una rápida y práctica identificación molecular de flebotomíneos presentes en zonas importantes de transmisión de la enfermedad.

En este sentido, validar una técnica de identificación molecular para especies de flebotomíneos, como apoyo a la taxonomía, será especialmente útil en los casos en los cuales la morfología presenta limitaciones (Rangel *et al*, 1996; Dujardin *et al.*, 1999; Uribe, 1999).

La actualización del listado de especies de flebotomíneos y la precisión de aquellas de importancia médica, será información contrastable y aportante en estudios epidemiológicos. Sin embargo, su mayor contribución será en el área de taxonomía, al aportar nuevos registros geográficos e incluso especies no descritas actualmente.

El presente estudio aportó un inventario actualizado de especies de flebotomíneos y estimó la diversidad haplotípica del grupo mediante el uso de la secuencia ADN de Códigos de barras "Barcode", en zonas de importancia para la transmisión de leishmaniasis en Colombia.

Se evaluó la utilidad del "Barcode", como herramienta para la identificación de especies y se amplió la librería genética en términos de este fragmento para el país y para especies similares en países de Centroamérica como *Mi. cayennensis cayennensis* (Panamá), *Pi. evansi* (Honduras, Nicaragua), *Ps. panamensis* (Costa Rica, Panamá), *Ny. trapidoi* (Costa Rica). Además, se confirmó que el uso del "código de barras" permite la asociación entre machos y hembras de grupos de especies con hembras isomórficas.

Es importante mencionar que una mayor disponibilidad de secuencias para una misma especie, proporcionará una visión más completa y explícita en cuanto a la posibilidad de utilizar la secuencia COI como un marcador molecular en esta región.

1. Capítulo 1: Marco teórico

1.1 Generalidades sobre los flebotómíneos

Los flebotómíneos son pequeños dípteros de la familia Psychodidae, hematófagos en su mayoría y con importancia en salud pública por su papel como vectores de la leishmaniasis. Además, son transmisores de *Bartonella bacilliformis* agente causal de la Bartonelosis, del virus de la estomatitis vesicular y de algunos arbovirus, probablemente Phlebovirus (Anderson et al. 1997; Montoya-Lerma y Ferro, 1999).

1.1.1 Clasificación taxonómica y distribución

Los flebotómíneos pertenecen al orden Diptera, suborden Nematocera, familia Psychodidae y subfamilia Phlebotominae. La taxonomía de este grupo es generalmente basada en caracteres morfológicos. Se ha propuesto múltiples esquemas de clasificación para la subfamilia Phlebotominae, inicialmente Barretto (1961) y Duckhouse (1973) hicieron revisiones sobre el grupo; Newstead en 1914 sugirió una división basada en características de la genitalia masculina, además de la venación alar, la fórmula palpal y antenal. Theodor (1948) propuso la división de la subfamilia en 4 géneros *Phlebotomus* y *Sergentomyia* para las especies del viejo mundo, mientras que *Brumptomyia* y *Lutzomyia* para las del nuevo mundo.

Fairchild (1955) dividió Phlebotominae, en dos tribus Bruchomyiini y Phlebotomini, incluyendo *Phlebotomus*, *Warileya* y *Hertigia*; *Phlebotomus* en cinco subgéneros: (1) *Phlebotomus*, (2) *Sergentomyia*, (3) *Psychodopygus*, (4) *Viannamyia* y (5) *Brumptomyia*.

Barretto (1962) sugirió para las especies americanas de Phlebotominae los géneros *Warileya*, *Brumptomyia* y *Lutzomyia*. Este último a su vez dividido en 15 subgéneros. Theodor (1965) adoptó los géneros: *Hertigia*, *Warileya*, *Brumptomyia* y *Lutzomyia*; este último dividido en 8 subgéneros propuestos anteriormente en la clasificación de Barretto y 16 grupos de especies equivalentes a subgéneros.

Forattini (1971, 1973) consideró para la subfamilia los géneros *Warileya* y *Brumptomyia*, mientras que las especies antes incluidas en el género *Lutzomyia* las dividió en 5 géneros

(1) *Lutzomyia*, (2) *Psychodopygus*, (3) *Pintomyia*, (4) *Pressatia* y (5) *Viannamyia*; no obstante, esta clasificación no fue muy aceptada entre los taxónomos ya que la mayoría de las especies fueron agrupadas a partir de características artificiales (Young & Fairchild, 1974; Lewis et al. 1977).

En 1994 Young & Duncan realizaron una revisión del género *Lutzomyia* y siguieron básicamente la clasificación de Lewis et al. (1977), adoptando los subgéneros *Coromyia*, *Psathyromyia* y *Sciopemyia*.

La clasificación que actualmente cuenta con mayor acogida entre los taxónomos para Phlebotominae, corresponde a la propuesta por Galati (1995) basada en el análisis de 88 caracteres cuantitativos y cualitativos de la subfamilia con un énfasis especial en los grupos encontrados en América; esta propuesta divide la subfamilia en dos tribus: Hertigiini (dos subtribus: Hertigiina e Idiophlebotomina) y Phlebotomini (dividida en Australophlebotomina, Phlebotomina, Brumptomyiina, Sergentomyiina, Lutzomyiina y Psychodopygina, todas las especies encontradas en América se distribuyen en las últimas 4 subtribus). De acuerdo a esta última clasificación se tiene para la subtribu Hertigiina los géneros *Hertigia* (Fairchild, 1949) y *Warileya* (Hertig, 1948); para la subtribu Idiophlebotomina los géneros *Spelaeophlebotomus* (Theodor, 1948), *Idiophlebotomus* (Quate & Fairchild, 1961) y *Chinius* (Leng, 1987); la subtribu Phlebotomina con *Phlebotomus* (Rondani, 1840) como único género; Australophlebotomina con *Australophlebotomus* (Theodor, 1948); para la subtribu Brumptomyiina tenemos los géneros: *Brumptomyia* (Franca & Parrot 1921) y *Oligodontomyia* (Galati, 1995); la subtribu Sergentomyiina aparece con 3 géneros: *Sergentomyia* (Franca & Parrot 1920), *Deanemyia* (Galati, 1995) y *Micropygomyia* (Barretto, 1962), este último con 4 subgéneros; en la subtribu Lutzomyiina se agrupan 9 géneros: (1) *Sciopemyia* (Barretto, 1962), (2) *Lutzomyia* (França, 1924), (3) *Migonemyia* (Galati, 1995), (4) *Pintomyia* (Costa Lima, 1932), (5) *Dampfomyia* (Addis, 1945), (6) *Expapillata* (Galati, 1995), (7) *Pressatia* (Mangabeira, 1942), (8) *Trichopygomyia* (Barretto, 1962) y (9) *Evandromyia* (Mangabeira, 1941); finalmente tenemos la subtribu Psychodopygina con 7 géneros (1) *Psathyromyia* (Barretto, 1962), (2) *Viannamyia* (Mangabeira, 1941), (3) *Martinsmyia* (Galati, 1995), (4) *Bichromomyia* (Artemiev, 1991), (5) *Psychodopygus* (Mangabeira, 1941), (6) *Nyssomyia* (Barretto, 1962) y (7) *Trichophoromyia* (Barretto, 1962).

De acuerdo a esta última clasificación se tiene 28 géneros descritos, distribuidos en 8 subtribus y dos tribus de la familia Phlebotominae con cerca de 900 especies, las cuales

tienen una amplia distribución mundial en áreas tropicales y subtropicales, desde bajas altitudes a nivel del mar, hasta los 3.200 msnm aproximadamente (Young y Duncan, 1994; Galati, 2014; Montoya-Lerma y Ferro, 1999). Para América se ha reportado la existencia de 512 especies, distribuidas desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Argentina (Young y Duncan 1994; Bejarano 2006; Galati 2003; Galati 2014).

1.1.2 Biología y Ecología

Los flebotomíneos tienen metamorfosis completa (holometábolos) (Young y Duncan, 1994; Killick-Kendrick 1999; Munstermann, 2004). Se registran como sitios de postura lugares ricos en materia orgánica donde se desarrollan los estadíos larvarios (Young y Duncan, 1994; Munstermann, 2005).

Por lo general los flebotomíneos adultos inician esta etapa con muy pocas reservas de energía para el vuelo y la supervivencia, por tanto, requieren rápidamente una fuente de carbohidratos, por lo que buscan alimentarse de azúcares encontrados en la savia de plantas y frutas maduras (Chianotis, 1974), también se alimentan de sustancias azucaradas producidas por áfidos (Killick-Kendrick, 1987; Wallbanks *et al.* 1990).

Para fines reproductivos, posterior a la cópula la hembra procede a la ingesta sanguínea, que es realizada en un amplio rango de vertebrados endotérmicos (ganado, perros, roedores y humanos) y exotérmicos (reptiles y anfibios) (Travi y Montoya, 1994); el fin de la ingesta es la síntesis de reservas de lípidos y carbohidratos involucrados en la producción de huevos, esto a partir del alto contenido proteínico de la sangre del vertebrado (Pennington y Wells, 2005). Los flebotomíneos se alimentan por medio de un mecanismo conocido como telmofagia, que es básicamente una acumulación de sangre en la superficie de la piel del hospedero, producida por un corte en capilares superficiales producido por el insecto (Black y Kondratieff, 2005). La saliva de los flebotomíneos al igual que otros insectos hematófagos, contiene una cantidad de productos farmacológicamente activos que alteran los sistemas hemostáticos, inflamatorios e inmunes del hospedero, con el fin de favorecer el proceso de alimentación (Valenzuela, 2005). El proceso de alimentación es favorecido por la presencia de atrayentes propios del vertebrado como olores característicos de algunos animales, el CO₂, el calor, entre otros (Hamilton Y Ramsoondar, 1994).

Existen también algunas especies de flebotomíneos que son autógenas, es decir que las hembras no requieren de la ingesta sanguínea para producir un pequeño número de huevos, por lo menos durante el ciclo de la primera oviposición (Zhioua y Chelbi, 2005), por ejemplo *Lu. lichyi* (Floch y Abonnenc, 1950). Sin embargo, la liberación de espermatozoides del espermatóforo y el movimiento hacia la espermateca ocurre sólo en hembras que se alimentan de sangre (AFPMB 2001; Ilango 2005). Es esta necesidad de alimentarse de sangre la que ha contribuido a que estos insectos desempeñen un papel como vectores de diversos agentes patógenos para los seres humanos (Killick-Kendrick, 1999; Munstermann, 2004).

Los machos emergen un día antes que las hembras, ya que durante este tiempo su genitalia debe rotar 180 grados, para que pueda acoplarse apropiadamente con la de la hembra al momento del apareamiento (Klowden y Zwiebel, 2005). En estos insectos el apareamiento se da en *leks*, sitios que las hembras visitan y donde los machos se agregan y defienden su territorio (Jones y Quinnell, 2002). Una vez el macho tiene éxito en su cortejo, se genera la cópula, donde el macho sujeta a la hembra e introduce su edeago en ella para depositar espermatozoides y secreciones en la bursa copulatrix (Klowden y Zwiebel, 2005), posteriormente el espermatozoides es almacenado en la espermateca de la hembra, donde permanece hasta la fertilización de los huevos justo antes de la oviposición (Travi y Montoya, 1994).

En cuanto a su capacidad de vuelo, los flebotomíneos se conocen como voladores débiles y con poca capacidad de dispersión (Killick-Kendrick, 1999; Munstermann, 2004), también son reconocidos por sus hábitos crepusculares y nocturnos (Desde las 16:00 hasta las 07:00 horas del día siguiente), momento en que la temperatura disminuye y la humedad aumenta (Alexander, 2000; Casanova, 2001).

1.1.3 Ciclo de vida

El desarrollo de los flebotomíneos ocurre a lo largo de varios estados de desarrollo como en todos los holometábolos: huevo, larva (4 instares), pupa y adulto (Young y Duncan, 1994). La duración y características del ciclo de vida de estos insectos se ha conocido gracias a estudios de crías en colonias bajo condiciones de laboratorio, principalmente de especies que se han relacionado con la transmisión de la leishmaniasis como *Lu. (Lutzomyia) longipalpis* y *Pintomyia (Pifanomyia) ovallesi* (Morales et al. 1984; Ferro et al.

1998; Montoya *et al* 1998; Neira *et al.* 1998; Cabrera *et al.* 1999; Cabrera *et al.* 2000; Escovar *et al.* 2004, Morales *et al.* 2005).

El desarrollo óptimo de los flebotómíneos ocurre en un rango de temperaturas entre 17°C y 31°C. Temperaturas superiores a 40°C pueden causar daño a los huevos y las larvas, mientras que temperaturas inferiores a 10°C pueden causar retraso del desarrollo. La exigencia de humedad es muy alta, sin embargo, los suelos permanentemente húmedos no son buenos criaderos (Lucientes *et al.* 2005). Posterior a la ingesta sanguínea inicia el desarrollo de los huevos, proceso que tarda entre 6 y 9 días. Durante la oviposición las glándulas accesorias de la hembra segregan una sustancia pegajosa para anclar los huevos depositados de forma aislada o en masa sobre sustratos ricos en materia orgánica, que por lo general presentan alta humedad relativa (Alexander, 1994; Feliciangeli, 2004; Mascari, 2008). Los huevos de los flebotómíneos son ovalados, ligeramente curvos, de color claro a oscuro, miden entre 300 y 500 μm , presentan protuberancias propias de la especie o complejo de especies y forman patrones típicos (irregulares, polígonos, eclipses, crestas, fosas, montañas). Estos patrones superficiales permiten separar especies que presentan dificultad en la taxonomía por métodos tradicionales, como las especies del grupo verrucarum (Sierra *et al*, 2000).

La hembra deposita entre 40-70 huevos según la especie, tamaño y calidad de la ingesta sanguínea (Sierra *et al*, 2000), la oviposición se da sobre sustratos húmedos y la eclosión tarda de 8 a 15 días dependiendo de condiciones ambientales (Barreto, 1941; Young & Duncan, 1994). Posterior al tiempo de incubación de los huevos (4-20 días) ocurre la eclosión del primer estadio larval. La etapa larval se completa en 18 días, pero normalmente dura más tiempo dependiendo de la temperatura. Las larvas se alimentan de materia orgánica y su desarrollo incluye cuatro etapas: larva de primero, segundo, tercer y cuarto instar, que se diferencian entre sí por el tamaño. Se caracterizan por ser pequeñas, alargadas, presentan una capsula cefálica esclerotizada bien desarrollada que se diferencia del resto del cuerpo (Pessóá y Barreto, 1948; Cáceres, 1989; Young & Duncan, 1994). Las larvas del cuarto instar se diferencian por tener un esclerito oscuro, en el dorso del octavo segmento abdominal (Alexander, 1994; Montoya y Ferro, 1999). El último estadio larval tiene el tórax abultado y deja de alimentarse para refugiarse en un lugar apropiado donde se convierte en pupa. La pupa presenta un color pardo, tamaño de 2-4 mm, algo alargada, vermiforme, casi descubierta de cerdas y está anclada al sustrato por medio del último segmento abdominal, que le permite conservar una posición erecta

(Young y Duncan 1994). El desarrollo de la pupa tarda entre 10 a 20 días, en condiciones óptimas, y cuando está lista para la emergencia, el adulto completamente formado en el interior de la pupa, rompe la envoltura mediante movimientos constantes en la parte inferior, abandonando así la exuvia (Young y Duncan, 1994; Montoya y Ferro, 1999). El promedio de vida de la forma adulta es de 25-30 días (Artemiev *et al.*, 1972; Young *et al.*, 1981; Killick Kendrick, 1987; Young & Duncan, 1994; Alexander, 2000; Feliciangeli, 2004).

Los adultos son pequeños (2 a 3mm de longitud) y el color puede variar de amarillo o gris plateado pálido a casi negro, se caracterizan por tener tres pares de patas largas, alas lanceoladas, tórax giboso, cuerpo revestido de cerdas largas y finas que le confieren aspecto hirsuto (Young y Duncan, 1994; Montoya y Ferro, 1999; Ibáñez, 1999; Galati, 2003). La cabeza es pequeña, presenta ojos compuestos y antenas largas, iguales en machos y hembras (Young y Duncan, 1994). La cabeza forma un ángulo casi recto con el tórax. El abdomen posee diez segmentos, los tres últimos modificados que constituyen la genitalia.

1.1.4 Diagnósis taxonómica de Phlebotominae

La identificación taxonómica se basa en caracteres del estado adulto, asociados a la cabeza (palpómeros, flagelómeros, ascoides y cibario), tórax (longitud de venas alares, longitud y espinas de fémur, quetotaxia y setas en pleuritos) y abdomen (genitalia masculina y femenina) (Theodor, 1965; Young y Duncan, 1994; Galati, 2014). En lo que respecta a la caracterización de estados inmaduros de flebotomíneos a partir de especímenes de colonia, se realizaron algunas descripciones de huevos a partir de la ultraestructura del corión que fueron útiles para diferenciar especies del género *Lutzomyia* (Endris *et al.* 1987; Feliciangeli *et al.* 1993; Pérez y Ogasuku, 1997; Bejarano *et al.* 2003; Sierra *et al.* 2000).

En cuanto a los estadios de larva hay pocos estudios que sugieren el uso de los patrones morfológicos de quetotaxia, nomenclatura y numeración de las setas de la larva de cuarto instar. La identificación basada en estos caracteres resulta difícil ya que no existe uniformidad nomenclatorial. Como resultado de estas dificultades no se cuenta hasta la fecha con claves taxonómicas para la identificación de estados inmaduros, lo que en parte se atribuye a la dificultad para encontrarlos en la naturaleza.

A continuación, se da una descripción general de las estructuras de importancia en la identificación taxonómica de adultos:

Cabeza: Externamente la cápsula cefálica está formada por los ojos compuestos que ocupan la mayor parte, en general con una distancia inter-ocular característica en algunas especies. Las partes bucales están dispuestas en una probóscide, que se compone de tres piezas únicas: el labro-epifaringe en posición dorsal, la hipofaringe en posición intermedia y el labio ventralmente; y dos estructuras pareadas, mandíbulas y maxilas. En la parte posterior de la cabeza se observa la faringe que en su margen superior puede presentar estrías o espinas, denominándose faringe armada o desarmada. La faringe se conecta al cibario por el puente posterior y la protuberancia posterior. El cibario presenta dientes horizontales y verticales cuyo número, disposición y forma son característicos y diagnósticos de cada especie; otros caracteres importantes en el cibario son la presencia de áreas pigmentadas y un arco cibarial que puede estar completo, incompleto o ausente (Young y Duncan, 1994; Galati, 2014). El palpómero se encuentra dividido en cinco segmentos, el primero y el segundo están parcialmente fusionados, la longitud y relación métrica entre palpos está relacionada con la separación de grupos y subgéneros (formulas palpaes pueden ayudar a identificar especie). Las antenas presentan: escapo, pedicelo y 14 flagelómeros. A partir del segmento II se encuentran los ascoides, conocidos como órganos sensoriales de estos insectos, cuya longitud y disposición, son un importante carácter taxonómico para la identificación de especies (Galati, 2014; Abonnenc, 1972)

Tórax: está bien desarrollado como en todos los dípteros, se divide en tres segmentos, dorsalmente es llamado noto, lateralmente pleura y ventralmente esternito, los cuales de acuerdo con Galati (2013) reciben el prefijo pro, meso y meta, respectivamente y pre y pos para definir partes de los mismos. Cada segmento está asociado a un par de patas, éstas se caracterizan por ser muy largas y delgadas, siendo las traseras ciertamente más largas que las demás (Abonnenc, 1972). Para la determinación de especies resulta útil la presencia y número de cerdas en esta estructura, además de zonas de alta pigmentación (pleuras) en algunos grupos. En cuanto a las alas, es importante para la determinación de especie la disposición de las venas radiales (M1, M2, M3, M4, R1, R2, R3, R4, R5, y rb) y la longitud de segmentos (α , β , γ , δ y π) (Young y Duncan, 1994; Galati, 2014).

Abdomen: Se encuentra constituido por 11 segmentos, los tres últimos modificados para constituir la genitalia. La genitalia femenina está formada a partir del octavo segmento

hasta el 11, y presenta un par de espermatecas, dotadas de un par de glándulas accesorias y la furca genital, estructura fuertemente esclerotizada. Las espermatecas presentan un cuerpo, en forma de saco que se conectan por medio de ductos individuales a un ducto común. La morfología y longitud de las espermatecas son de importancia taxonómica a nivel de especie y algunas características permiten las agrupaciones en subgéneros y grupos. La longitud, segmentación y relación de los ductos individuales con respecto al ducto común son de relevancia en la separación taxonómica (Young y Duncan, 1994; Galati, 2010).

La genitalia masculina externa se compone principalmente de: el gonocoxito que varía en cuanto a forma y presencia de tufos de setas, y en el cual se articula el gonoestilo que soporta un número variable de espinas accesorias, terminales y subterminales; de la base del gonocoxito emergen también los parámetros que pueden tener un patrón de inserción de setas, presentar tubérculos o espinas; otras estructuras importantes en la identificación por morfología son los lóbulos laterales y los cercos que varían en cuanto a longitud y forma, todas las estructuras antes mencionadas son pareadas. La genitalia masculina en su anatomía interna, presenta una bomba eyaculadora y unos filamentos genitales de forma y tamaño variable (Young y Duncan, 1994; Galati, 2014, Abonnenc, 1972).

1.1.5 Identificación molecular

Actualmente los marcadores moleculares y en particular las secuencias de ADN, son muy usados en entomología médica (Berlocher, 1984; Caterino *et al.* 2000; Lanteri *et al.* 2002). Los principales avances involucran estudios de taxonomía molecular y filogenia en aspectos como la diversidad genética, el flujo de genes y recientemente algo conocido como taxonomía integrativa, donde para determinar especies se acude a todas las posibles evidencias ya sean datos morfológicos, moleculares, comportamentales y ecológicos (Caterino *et al.*, 2000; Lanteri *et al.*, 2002; Padial *et al.*, 2009; Contreras, 2013). Otro aspecto importante sobre el uso de los marcadores moleculares es el planteamiento de hipótesis que expliquen la historia natural o distribución actual de las especies, mediante la identificación de diferentes haplotipos para una misma especie. Con base en datos moleculares también es posible diferenciar especies simpátricas, alopátricas y parapátricas, así mismo, obtener estimativos relevantes para entender la dinámica y la estructura de las poblaciones naturales o estudiar, aspectos como la resistencia a

insecticidas y la relación parásito-vector (Berlocher, 1984; Caterino *et al.* 2000; Lanteri *et al.* 2002; Besansky, 2003; Contreras, 2013).

Entre los marcadores moleculares, las secuencias de genes mitocondriales son ampliamente usados para realizar estudios de taxonomía y de filogenia de poblaciones o especies cercanas (Avisé, 2000; Galtier *et al.*, 2009), pues su tasa de mutación es elevada con respecto a la de otros genes (nucleares) y por lo tanto adecuada a niveles específico e intraespecífico (Avisé, 2000; Galtier *et al.* 2009). Los genes mitocondriales Citocromo B, NAD deshidrogenasa 1 y 4, ARN de transferencia para serina y subunidad pequeña ribosomal han sido evaluados como marcadores moleculares para estudiar las relaciones filogenéticas y la taxonomía de especies de flebotómíneos (Beati *et al.* 2004; Vivero *et al.* 2007; Vivero *et al.* 2009; Valderrama *et al.* 2014; Coutinho *et al.* 2008), también han sido de gran utilidad cuando se sospecha la existencia de complejos de especies (Uribe *et al.* 2001; Arrivillaga *et al.* 2002; Valderrama *et al.*, 2014). Actualmente, el fragmento 5' del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa subunidad I (COI) ha sido propuesto como Código de barras del ADN por Hebert *et al.* (2003), propuesta que hace parte de la iniciativa internacional llamada consorcio para el código de barras de la vida (CBOL: Consortium for the Barcode of Life; <http://www.barcoding.si.edu/>) como un método universal para facilitar la identificación de especies, agrupando individuos desconocidos con entidades taxonómicas definidas a priori (caracteres morfológicos), con base en la similitud de secuencias (Hebert *et al.* 2003; CBOL, 2005). Ésta 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; Cohnstaedt *et al.* 2011; Jinbo, 2011; Contreras *et al.*, 2014).

La tipificación molecular basada en la asignación de haplotipos a especímenes de Phlebotominae en América inició recientemente incluyendo ejemplares de Panamá, donde se asignó la secuencia Barcode a 19 especies (Azpurua *et al.* 2010). En el país el trabajo con esta secuencia inicio con la tipificación de especímenes de la especie *Lu. longipalpis*, pero que diferían en su distribución geográfica (Hoyos *et al.*, 2012), posteriormente en un trabajo más extenso se asignó la secuencia Barcode a 36 especies de flebotómíneos (Contreras *et al.*, 2014), recientemente Romero y colaboradores (2016) realizaron un trabajo para identificar especies de flebotómíneos en un foco mixto de leishmaniasis en la costa caribe colombiana donde asignaron la secuencia *Barcode* a 62 especímenes

pertenecientes a 19 especies. En Brasil el trabajo más relevante con esta secuencia fue llevado a cabo por Pinto y Colaboradores (2015) donde asignaron la secuencia COI a 576 individuos pertenecientes a 47 especies. Como resultado de estos trabajos en Colombia hay 57 especies de flebotómíneos que tienen asignada la secuencia *Barcode*, para América el número asciende a 91 especies.

Todos éstos constituyen aspectos a evaluar cuidadosamente, previa recomendación del uso en un grupo taxonómico particular. Ya que con el uso de códigos de barra de ADN no se trata de generar un sistema taxonómico, ni sustituir la taxonomía alfa, por el contrario, éste se presenta como una herramienta complementaria basada en técnicas de biología molecular para la correcta identificación de las especies (Padial y De la Riva, 2007). Así, la iniciativa “barcode” 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.

1.1.6 Importancia médica de las especies de la subfamilia Phlebotominae

Muchas de las especies de esta subfamilia representan un problema de salud pública, ya que son reconocidos vectores de *Leishmania*, y en menor proporción vectores de agentes infecciosos causantes de Bartonelosis y varias enfermedades arbovirales. Adicionalmente, su picadura puede producir reacciones alérgicas en la piel de las personas, conocida para muchos autores como “harara” (Theodor, 1935).

La Bartonelosis, conocida también como enfermedad de Carrión, Fiebre Oroya y Verruga peruana, es una rara enfermedad infecciosa causada por la bacteria *Bartonella bacilliformis* (Schultz, 1968), esta enfermedad es endémica en Sudamérica, reportándose en Perú (Ancash, Cajamarca, Lima, etc.), Ecuador (Loja), y Colombia (Nariño); sin embargo, poco se sabe sobre el ciclo de vida de esta bacteria fuera del huésped humano (González *et al*, 2007). En el país esta enfermedad sólo se reportó en el sur (departamentos de Nariño y Cauca) entre los años 1935 a 1945, se consideró *Lutzomyia columbiana* como posible vector, ésta especie aun es abundante en estas áreas (Montenegro *et al*, 2013).

La fiebre del flebótomo, es una fiebre aguda inespecífica, causada por una serie de distintos virus pertenecientes a la familia Bunyaviridae, género *Phlebovirus* (Tesh, 1988). Es más común en el Medio Oriente y Asia Central; donde *Phlebotomus papatasi* es el

principal vector (Tesh, 1988; Tesh *et al*, 1992). Algunos flebotomíneos también han sido implicados como vectores de varios virus de la estomatitis vesicular en el serogrupo (familia Rhabdoviridae; género *Vesiculovirus*). Algunos de los virus en este grupo causan enfermedades en animales domésticos, así como en los humanos (Comer y Tesh, 1991).

1.1.7 La leishmaniasis en Colombia

Actualmente 98 países reportan transmisión endémica de leishmaniasis y de acuerdo a la OMS se estima una prevalencia de 12 millones de casos en el mundo con una mortalidad de 30.000 casos anuales y un total de 1.3 millones de nuevos casos al año, aunque solo se reporta un número reducido de éstos; asimismo, se ha determinado que existen cerca de 350 millones de personas en riesgo de contraer esta enfermedad (Reithinger *et al*. 2007, WHO 2015).

Colombia ocupa el segundo lugar en incidencia de leishmaniasis en América después de Brasil, pasando de 5.000 a más de 15.000 casos notificados anualmente (OPS 2007, Murray *et al*. 2005, Reithinger *et al*. 2007). La enfermedad es endémica en todo el territorio colombiano a excepción de San Andrés Islas y Bogotá DC, se estima que más de 10 millones de personas se encuentran en riesgo de contraer la enfermedad, dándose la transmisión principalmente en áreas rurales (Desjeux 2002; Bejarano *et al*, 2002; Zambrano *et al*, 2011). Para el año 2015, según el SIMGILA (Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública) se reportaron 8.113 casos de leishmaniasis cutánea, 114 casos de leishmaniasis mucocutánea y 37 casos de leishmaniasis visceral.

La transmisión de la enfermedad inicia con la picadura de una hembra infectada de la subfamilia Phlebotominae a un hospedero mamífero para alimentarse de sangre; cuando el insecto pica, regurgita saliva e inocular promastigotes en la dermis, éstos alcanzan rápidamente las células dendríticas o los macrófagos, donde encuentran las condiciones adecuadas para su desarrollo y se transforman en amastigotes que se multiplican por fisión binaria al interior de las vacuolas fagocíticas (WHO, 2010). Cuando un flebotomíneo hembra ingiere sangre de un mamífero infectado, los amastigotes se transforman en promastigotes en el intestino medio del vector, posteriormente migran hacia la válvula estomodeal, donde pueden ser inoculados durante otra picadura a un nuevo vertebrado sano. El tiempo aproximado que necesita el parásito para completar su desarrollo en el vector y ser infectante, es de aproximadamente 6-9 días dependiendo de la especie de

Leishmania (Kamhawi, 2006). El agente causal de la leishmaniasis es un parásito del género *Leishmania* perteneciente a la familia Trypanosomatidae; estos parásitos desarrollan su ciclo de vida en dos hospederos diferentes: en un insecto vector (forma promastigote, flagelado) y en vertebrados (forma amastigote, no flagelado) (Reithinger et al. 2007).

Dentro del género *Leishmania* se reconoce la existencia de 21 especies patógenas al humano. En Colombia se ha reportado la presencia de siete especies del parásito que producen diferentes manifestaciones clínicas (Cochero et al. 2007, Ovalle et al. 2006, Romero & Sánchez 2007, Rodríguez-Barraquer et al. 2008, Martínez et al. 2010).

Las hembras de la subfamilia Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) son los vectores de la leishmaniasis en América (Lane 1993), esta subfamilia comprende alrededor de 512 especies (Galati, 2014) distribuidas desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Argentina, y de las cuales 30 están incriminadas como vectores de la leishmaniasis (Desjeux 1991, Young & Duncan 1994).

En Colombia se han identificado como especies de importancia médica para la transmisión de la leishmaniasis las especies *Nyssomyia umbratilis* (Scarpassa et al. 2012), *Pintomyia* (*Pifanomyia*) *longiflocosa* (Cárdenas et al. 2005), *Lutzomyia* (*Helcocyrtomyia*) *hartmanni* (Kreutzer et al. 1991; Montoya-Lerma J, 1999), *Bichromomyia flaviscutellata* (Ferro et al. 1995), *Lu.* (*Lutzomyia*) *longipalpis* (López et al. 1996), *Pi.* (*Pif.*) *evansi* (Travi et al. 1990), *Pi.* (*Pif.*) *spinicrassa* (Bejarano et al. 2003), *Ny. trapidoi* (Young et al. 1987; Travi et al. 1988; Morales et al. 1981; Muñoz 1998), *Lu.* (*Tricholateralis*) *gomezi* (Travi et al. 1988; Vélez et al. 1991; Muñoz 1998), *Psychodopygus panamensis* (Santamaría et al. 2006), *Ny. yuilli yuilli*, *Bi. olmeca bicolor* (Bejarano, 2006), *Ny. antunesi* y *Pi.* (*Pif.*) *ovallesi* (Ferro et al. 2011).

1.1.8 Flebotomíneos en zonas de importancia para la transmisión de la leishmaniasis

El conocimiento de la distribución geográfica de los insectos que desempeñan un papel como vectores es básico para el control de las enfermedades transmitidas por éstos, entre ellas la leishmaniasis, transmitida a humanos por flebotomíneos. Además de su

importancia epidemiológica esta información constituye el fundamento de los estudios biogeográficos por métodos analíticos (Bejarano *et al*, 2003).

Con referencia a las zonas importantes para la transmisión de la enfermedad, se encuentra en primer lugar el departamento de Antioquia, departamento que aporta cerca del 26% del total de casos para el país y en el cual se ha reportado un número de 58 especies de flebotómíneos (Montoya-Lerma y Ferro 1999; Bejarano 2006). Por el grado de endemidad de la leishmaniasis en este departamento, es importante conocer la distribución actualizada de las diferentes especies de flebotómíneos, aspecto de interés para establecer su papel en la epidemiología de la enfermedad.

Otra zona importante es indudablemente el departamento de Amazonas, considerado uno de los ecosistemas más mega diversos en el planeta, y con condiciones propicias para el desarrollo y co-existencia de muchas especies de flebotómíneos. Es importante mencionar que este departamento siendo el más grande en cuanto a extensión territorial y que se compone en su totalidad de territorio de la Selva Amazónica, aporta solo cerca del 0.2% de casos de leishmaniasis, aunque trabajos anteriores han reportado la presencia de alrededor de 20 especies de flebotómíneos (Wolf *et al*, 2003; SIVIGILA 2014), esto da indicios sobre un alto subregistro de la enfermedad y la necesidad de explorar a fondo esta zona, en diversos aspectos epidemiológicos incluyendo el entomológico, para obtener un listado más actualizado de las especies de flebotómíneos en la zona, y evaluar cuales podrían estar incriminados como vectores en la zona.

Por último, es importante destacar otra zona del país, el departamento de Sucre que, aunque aporta el 1% del total de casos de leishmaniasis, es de importancia dado que aporta el 16% de los casos de leishmaniasis visceral, lo que sugiere una composición de fauna flebotómica diferente a las otras zonas mencionadas anteriormente (SIVIGILA, 2014; Romero *et al*, 2013). Este departamento es el que cuenta con mayor diversidad de especies de flebotómíneos (14) entre los departamentos de la costa Caribe de Colombia, (Bejarano *et al*. 2001; Travi *et al*. 2002; Bejarano *et al*, 2003; Pérez *et al*, 2008; Romero *et al*, 2016), entre ellas, seis se encuentran asociadas al ciclo epidemiológico de la leishmaniasis cutánea y visceral (Travi *et al*, 1996; Santamaría *et al*, 2006), destacándose *Pintomyia (Pifanomyia) evansi*, la especie más abundante y principal vector de leishmaniasis visceral.

1.2 Objetivos

1.2.1 General

Realizar un inventario actualizado de especies de flebotomíneos, y estimar la diversidad haplotípica mediante el uso de la secuencia ADN de Códigos de barras “Barcode”, en zonas de importancia para la transmisión de leishmaniasis en Colombia.

1.2.2 Específicos

- Identificar las especies de flebotomíneos presentes en las zonas de estudio y señalar aquellas de importancia médica.
- Evaluar la utilidad del “Barcode”, con el fragmento del gen mitocondrial COI (propuesto como código de identificación genética de animales) como herramienta para la identificación de las especies de importancia médica.
- Ampliar la librería genética en términos del fragmento COI para flebotomíneos del país.

1.3 Hipótesis

- La variabilidad de las secuencias COI permitirá la identificación de especies de flebotomíneos, que corresponderá con las identificaciones realizadas por taxonomía clásica.

2. Capítulo 2: Inventario de especies de la subfamilia Phlebotominae

2.1 Metodología

2.1.1 Área de estudio

El área de estudio comprendió municipios en 5 departamentos (Tabla 2.1), la selección de los sitios de muestreo se realizó considerando las condiciones de acceso y seguridad, así como los datos sobre los reportes de casos de leishmaniasis durante los últimos años, a partir de información disponible en el Instituto Nacional de Salud. También se consideró incluir entre los sitios de colecta, zonas donde se estaban caracterizando focos de leishmaniasis por parte del grupo de investigación (PECET-U de A).

Estos departamentos comprenden tres de las cinco regiones naturales de Colombia. En la Región Caribe caracterizada por una alta humedad relativa (77-80%) y altas temperaturas (temperatura media 28°C), se incluyó una localidad en el municipio de Santa Marta (Magdalena), en Sucre el muestreo se realizó en zona urbana y periurbana del municipio de Ovejas, el departamento de Antioquia se incluye también en esta región ya que se realizó un muestreo en el municipio de Apartadó que hace parte de la subregión de Urabá.

En la Región Andina se incluyó la zona urbana y periurbana del municipio de Remedios (Antioquia) y localidades en tres municipios del departamento de Caldas (Norcasia, Samaná y Victoria) en un rango de altura que va de los 546 hasta los 1228 metros sobre el nivel del mar (msnm), en zonas de vida de Holdridge de Bosque muy húmedo (Norcasia), bosque húmedo (Victoria) y bosque húmedo premontano (Samaná).

La región de la Amazonía es caracterizada por un clima muy húmedo, producto de precipitaciones que superan los 3.500 mm anuales y temperaturas superiores a los 28°C, este clima es considerado como uno de los más agrestes del país, el muestreo de flebotomíneos en este departamento se llevó a cabo en la zona urbana y periurbana de la ciudad de Leticia y Los Kilómetros (municipio de Leticia), este municipio está situado sobre la margen izquierda del río Amazonas en el sur del país, tiene una altitud entre 0 y

80 msnm, una temperatura media de 25,4°C, alcanzando una máxima de 28°C y 23,5°C como mínima. En el municipio de Puerto Nariño, el muestreo se realizó en dos comunidades (Tipisca y Doce de octubre) y en la cabecera municipal, Puerto Nariño está situado a orillas del río Loretoyaco, tiene una altitud de 159 msnm y registra una temperatura media de 30 °C (Figura 2.1).

Figura 2-1: Ubicación de los sitios de muestreo



Tabla 2-1 : Municipios incluidos en el estudio de flebotomíneos en zonas importantes para la transmisión de la leishmaniasis en Colombia

Departamento	Municipio	Mes y año de colecta	Altura promedio (msnm)	Temperatura promedio (°C)	Coordenadas geográficas cabecera municipal	
					Latitud	Longitud
Antioquia	Apartadó	Julio, 2015	270	28	7°53'05"N	76°38'06"W
	Remedios	Enero, 2014	700	24	07°01'21"N	74°41'46"W
Caldas	Samaná	Marzo-septiembre, 2015	930	20	05°32'27"N	74°50'12"W
	Norcasia	Marzo, 2015	570	25	05°20'24"N	74°31'39"W
	Victoria	Mayo-septiembre, 2015	886	26	05°19'00"N	74°54'42"W
Sucre	Ovejas	Abril-enero, 2014	277	28	09°31'48"N	75°14'01"W
Magdalena	Santa Marta	Abril, 2015	6	28	11°14'50"N	74°12'06"W
Amazonas	Puerto Nariño	Septiembre-Marzo, 2016	40	28	3°46'13"S	70°22'59"W
	Leticia	Septiembre-Marzo, 2016	82	26	4°12'55"S	69°56'26"W

2.1.2 Colecta en campo

En tres de los municipios el muestreo se realizó en una única salida, en la cual se muestrearon dos noches, se seleccionaron 3 viviendas, ubicando dos trampas, una en el intradomicilio y otra en el peridomicilio, en el municipio de Santa Marta (10-13 de abril de 2015), Apartadó (24-27 de julio de 2015) y Remedios (5-7 de marzo de 2014). En Ovejas se seleccionaron 3 zonas y la colecta se realizó entre el 30 de abril de 2013 al 27 de enero de 2014. Para el municipio de Norcasia se seleccionaron 5 veredas y el muestreo se realizó durante el mes de marzo del 2015, en Samaná se realizaron muestreos en 10 veredas en un período de tiempo de 8 meses (marzo-septiembre de 2015), en Victoria se incluyeron muestreos en siete veredas entre mayo y septiembre del 2015. En Amazonas los muestreos se realizaron en tres localidades del municipio de Leticia (El Kilómetro 11, Kilometro 18 y una reserva natural), en Puerto Nariño las colectas se hicieron en 3 comunidades (Tipisca, Doce de Octubre y cabecera municipal) los muestreos en este departamento se realizaron entre septiembre del 2015 y marzo de 2016.

En todas las localidades los muestreos se hicieron usando trampas CDC (Centers for Diseases Control and Prevention) operadas entre las 18:00-6:00 horas en el intra, peri y extradomicilio (sólo en Amazonas), ubicadas a una altura de 1,30m desde el nivel del suelo. La ubicación de estas trampas se realizó, teniendo en cuenta la topografía de las zonas de estudio y considerando las características del hábitat que puedan ser atractivas para las especies fototróficas, así: en las viviendas seleccionadas se instalaron 2 trampas en el intra y peridomicilio, (n=2 trampas por ambiente domiciliar/municipio) y en el extradomicilio, en relictos de bosque (Puerto Nariño y Leticia) con la intención de capturar mayor número de especies (Figura 2.2).

Figura 2-2: Trampa CDC para captura de flebotomíneos



2.1.3 Protocolos de laboratorio:

Una vez colectados los flebotomíneos adultos, se conservaron secos en viales de 1,5 ml perforados y almacenados con sílica gel. Este material se transportó al laboratorio de Entomología Médica y Molecular del PECET, de la Universidad de Antioquia. Bajo estereomicroscopio, los flebotomíneos fueron fragmentados a nivel de los tres últimos segmentos abdominales y de la cabeza con ayuda de estiletes estériles (Figura 2.3). Posteriormente, estos segmentos abdominales y la cabeza fueron sometidos a procesos de aclaración, para remover las setas y permitir la visualización de las estructuras internas esclerotizadas que son determinantes en la identificación taxonómica, mientras que el resto del cuerpo del insecto (tórax y segmentos proximales del abdomen) se almaceno a -20°C, hasta ser utilizados en la extracción de ADN total.

Figura 2-3: Flebotomíneo fragmentado antes del proceso de aclarado



Protocolo de aclarado

El proceso de aclarado químico se realizó de siguiente manera: hidróxido de potasio (KOH) al 15% por 12 horas, un lavado con ácido acético 100%, ácido acético al 10% con dos gotas de fucsina ácida por 15 minutos, posteriores lavados con alcoholes a diferentes concentraciones por diez minutos cada concentración, en el siguiente orden 70%, 90%, 95% y 100%, finalmente se dejaron en eugenol por mínimo 10 horas, metodología modificada por David Young y Charles Porter (comunicación personal).

Protocolo de montaje permanente para adultos

El montaje se realizó posterior al proceso de aclarado en lámina portaobjetos donde se colocó una gota pequeña de medio de montaje euparal, en la que se dispuso el espécimen completo para ser fragmentado, hembra (cabeza, tórax y abdomen) y macho (cabeza y resto del cuerpo), ya que los caracteres diagnósticos para ser visualizados, se debe tener una posición específica de cada estructura (lateral, ventral). (Figura 2.4)

Figura 2-4: Montaje permanente de flebotomíneos adultos



a. Machos; **b.** Hembras.

Identificación taxonómica

La identificación de las especies de flebotomíneos se realizó mediante morfología externa e interna comparada de ejemplares adultos (macho y hembra), la cual fue realizada con microscopio marca Leica DM500. Aunque la terminología de las estructuras morfológicas y la ubicación de las diversas especies en sus respectivos géneros, subgéneros y grupos, se basó en la clasificación de Galati (1992, 2014), también se usó la clave taxonómica de Young & Duncan (1994). El material biológico procesado e identificado se conserva en la Colección de Vectores y Hospedadores Intermediarios de Enfermedades Tropicales (VHET) del Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales (PECET) y con copia al Museo Entomológico Francisco Luis Gallego de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín.

2.1.4 Importancia médica de las especies de la subfamilia Phlebotominae

Luego de la identificación de las especies, se hizo una revisión bibliográfica que permitió señalar aquellas de importancia médica según reportes de incriminación y/o asociación con la transmisión de agentes patógenos, principalmente parásitos del género *Leishmania*. A partir de esta consulta también se hicieron aportes sobre la distribución de las especies encontradas y nuevos registros para municipios, departamento y país.

2.2 Resultados

2.2.1 Material biológico estudiado

En total se identificaron 4.558 flebotomíneos (2.534 ♀ y 2024 ♂), distribuidos en 13 géneros de la subfamilia Phlebotominae (Anexos 1 y 2), los géneros con mayor número de especies corresponden a *Psychodopygus* (*Ps. ayrozai*, *Ps. paraensis*, *Ps. carrerai carrerai*, *Ps. davisii*, *Ps. amazonensis*, *Ps. geniculatus*, *Ps. hirsutus hirsutus* y *Ps. panamensis*), con el mismo número de especies está el género *Lutzomyia* (*Lu. (Lut) bifoliata*, *Lu. (Lut) lichyi*, *Lu. (Hel) hartmanni*, *Lu. (Hel) sanguinaria*, *Lu. (Hel) tortura*, *Lu. (Trl) gomezi*, *Lu. (Trl) sherlocki* y *Lu. (Trl) evangelistai*), seguido por *Psathyromyia* (*Pa. (For) aragaoi*, *Pa. (For) pradobarrientosi*, *Pa. (For) carpenteri*, *Pa. (Xip) dreisbachi*, *Pa. (Psa) punctigeniculata*, *Pa. (Psa) dendrophylla* y *Pa. (Psa) shannoni*), *Micropygomyia* (*Mi.*

(*Sau*) *atroclavata*, *Mi. (Sau) trinidadensis*, *Mi. (Mic) cayennensis cayennensis*, *Mi. (Mic) micropyga* y *Mi. (Mic) chassigneti*), *Nyssomyia* (*Ny. trapidoi*, *Ny. yuilli yuilli*, *Ny. antunesi*, *Ny. umbratilis* y *Ny. yuilli pajoti*), *Evandromyia* (*Ev. (Eva) georgii*, *Ev. (Eva) saulensis*, *Ev. (Ald) walkeri* y *Ev. (Ald) dubitans*), *Pintomyia* (*Pi. (Pif) nevesi*, *Pi. (Pif) evansi* y *Pi. (Pif) rangeliana*), *Brumptomyia* (*Br. leopoldoi* y *Br. mesa*), *Sciopemyia* (*Sc. sordellii* y *Sc. preclara*), *Pressatia* (*Pr. choti* y *Pr. camposi*), *Trichophoromyia* (*Th. howardi* y *Trichophoromyia* sp), *Tryramula* (*Ty. triramula*) y *Viannamyia* (*Vi. furcata*).

El uso de la morfología externa e interna permitió la identificación de 49 especies, se encontró un morfotipo denominado *Trichophoromyia* sp, que posiblemente sea una especie no descrita.

De acuerdo con la clasificación propuesta por Galati (1992, 2014), la nueva especie presenta caracteres que permiten incluirla en el género *Trichophoromyia*, como son quinto palpómero ligeramente más largo que el tercero, la genitalia del macho es ligeramente más grande que el tórax, el gonóstilo presenta cuatro espinas (Santos *et al*, 2014). El macho presenta diferencias morfológicas que lo separa de las 25 especies incluidas en este género (Oliveira *et al*, 2015; Fernandez *et al*, 2015, Galati, 2014), los especímenes de este morfotipo presentan semejanzas con la especie *Th. ruifreitasi*, sin embargo, los ejemplares de *Trichophoromyia* sp presentan un parámero subtriangular con unas cerdas características en la margen ventral (Figura 2.47). Las hembras al igual que muchas del grupo son indistinguibles.

Dentro del género *Trichophoromyia* las hembras no pudieron ser identificadas a nivel de especie ya que muchas de las hembras de este grupo son indistinguibles y en las colectas se registró la presencia de machos de *Th. howardi* y *Trichophoromyia* sp en las comunidades muestreadas, lo que dificulta la asociación geográfica. Los análisis moleculares no fueron útiles en este aspecto ya que no se obtuvieron secuencias de todas las hembras.

Las hembras del género *Pressatia* colectadas en Apartadó no pudieron ser identificadas a nivel de especie, ya que son indistinguibles y no se encontraron machos de este género en esta localidad para asociarlas geográficamente. Sin embargo, por análisis moleculares (Capítulo 3) estas hembras se pudieron asociar a la especie *Pr. camposi*, lo que concuerda con el registro de esta especie en una localidad de Apartadó en colectas

anteriores (Colección de Vectores y Hospedadores Intermediarios de Enfermedades Tropicales del PECET).

El mayor número de especies se encontró en Amazonas (30 especies), lo que constituye el 61% de las especies identificadas en este estudio, seguido por Caldas (15 especies), Antioquia (11) y Sucre (10) y finalmente Magdalena que aporta el 6% de las especies (3).

La especie con mayor representación fue *Pi. (Pif) evansi* colectada en Ovejas (1531, lo que corresponde al 33,6% del total de especímenes identificados) lo que coincide con lo encontrado en estudios previos realizados en el mismo municipio donde señalan esta especie como la más abundante (Lambraño *et al*, 2012; Cortes *et al*, 2009).

La especie más ampliamente distribuida fue *Lu. (Trl) gomezi*, colectada en seis municipios (Remedios, Samaná, Norcasia, Victoria, Ovejas y Santa Marta), seguida por *Ps. panamensis* en cinco municipios (Remedios, Samaná, Norcasia, Victoria y Ovejas).

2.2.2 Especies de flebotomíneos determinadas por taxonomía clásica

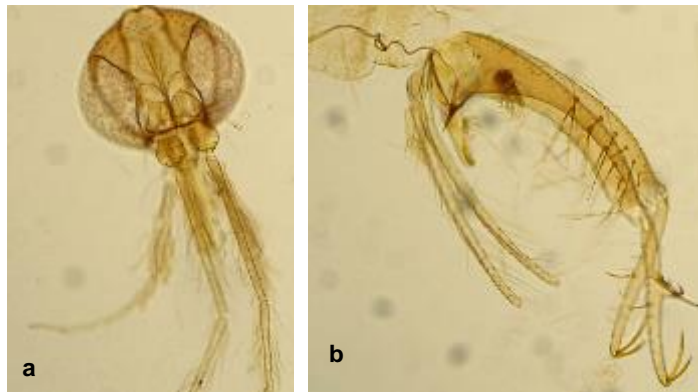
A continuación, se presenta un listado de las especies de la subfamilia Phlebotominae encontradas en el estudio:

- *Br. leopoldoi* (Rodríguez, 1953), Figura 2-5
- *Br. mesai* (Sherlock, 1962), Figura 2-6
- *Mi. (Sau) trinidadensis* (Newstead, 1922) Figura 2-7
- *Mi. (Sau) atroclavata* (Knab, 1913)
- *Mi. (Mic) cayennensis cayennesis* (Floch & Abonnenc, 1941) Figura 2-8
- *Mi. (Mic) micropyga* (Mangabeira, 1942) Figura 2-9
- *Mi. (Mic) chassigenti* (Floch & Abonnenc, 1944) Figura 2-10
- *Sc. preclara* (Young & Arias, 1984) Figura 2-11
- *Sc. sordellii* (Shannon & Del Ponte, 1927) Figura 2-12
- *Lu. (Hel) hartmanni* (Fairchild & Hertig, 1957) Figura 2-13
- *Lu. (Hel) sanguinaria* (Fairchild & Hertig, 1957)

- *Lu. (Hel) tortura* (Young & Rogers, 1984) Figura 2-14
- *Lu. (Trl.) evangelistai* (Martins & Fraiha, 1971)
- *Lu. (Trl) gomezi* (Nitzulescu, 1931) Figura 2-15
- *Lu. (Trl) sherlocki* (Martins, Silva & Falcão, 1971) Figura 2-16
- *Lu. (Lut) bifoliata* (Osorno-Mesa, Morales, Osorno & Hoyos, 1970) Figura 2-17
- *Lu. (Lut) lichyi* (Floch & Abonnenc, 1950)
- *Pi. (Pif) evansi* (Nuñez-Tovar, 1924) Figura 2-18
- *Pi. (Pif) nevesi* (Damasceno & Arouck, 1956) Figura 2-19
- *Pi. (Pif) rangeliana* (Ortiz, 1953) Figura 2-20
- *Pr. camposi* (Rodríguez, 1950) Figura 2-21
- *Pr. choti* (Floch & Abonnenc, 1941) Figura 2-22
- *Ty. triramula* (Fairchild & Hertig, 1952) Figura 2-23
- *Ev. (Ald) dubitans* (Sherlock, 1962)
- *Ev. (Ald) walkeri* (Newstead, 1914) Figura 2-24
- *Ev. (Eva) georgii* (Freitas & Barrett, 2002) Figura 2-25
- *Ev. (Eva) saulensis* (Floch & Abonnenc, 1944) Figura 2-26
- *Pa. (For.) aragaoi* (Costa Lima, 1932) Figura 2-27
- *Pa. (For) carpenteri* (Fairchild & Hertig, 1953) Figura 2-28
- *Pa. (For) pradobarrientosi* (Le Pont, Matias, Martinez & Dujardin, 2004) Figura 2-29
- *Pa. (Xip.) dreisbachi* (Causey & Damasceno, 1945) Figura 2-30
- *Pa. (Psa) dendrophyla* (Mangabeira, 1942) Figura 2-31
- *Pa. (Psa) punctigeniculata* (Floch & Abonnenc, 1944) Figura 2.32 Figura 2-32
- *Pa. (Psa) shannoni* (Dyar, 1929) Figura 2-33
- *Vi. furcata* (Mangabeira, 1941) Figura 2-34
- *Ps. amazonensis* (Root, 1934) Figura 2-35
- *Ps. davisii* (Root, 1934)

- *Ps. ayrozai* (Barretto & Coutinho, 1940) Figura 2-36
- *Ps. carrerai carrerai* (Barretto, 1946) Figura 2-37
- *Ps. hirsutus hirsutus* (Mangabeira, 1942) Figura 2-38
- *Ps. panamensis* (Shannon, 1926) Figura 2-39
- *Ps. paraensis* (Costa Lima, 1941) Figura 2-40
- *Ps. geniculatus* (Mangabeira, 1941) Figura 2-41
- *Ny. antunesi* (Countinho, 1939) Figura 2-42
- *Ny. trapidoi* (Fairchild & Hertig, 1952) Figura 2-43
- *Ny. umbratilis* (Ward & Fraiha, 1977) Figura 2-44
- *Ny. yuilli yuilli* (Young & Porter, 1972) Figura 2-45
- *Ny. yuilli pajoti* (Abonnenc, Léger & Fauran, 1979) Figura 2-46
- *Trichophoromyia* (Barretto, 1962) Figura 2-47
- *Th. howardi* (Young, 1979) Figura 2-48

Figura 2-5: *Br. leopoldoi*



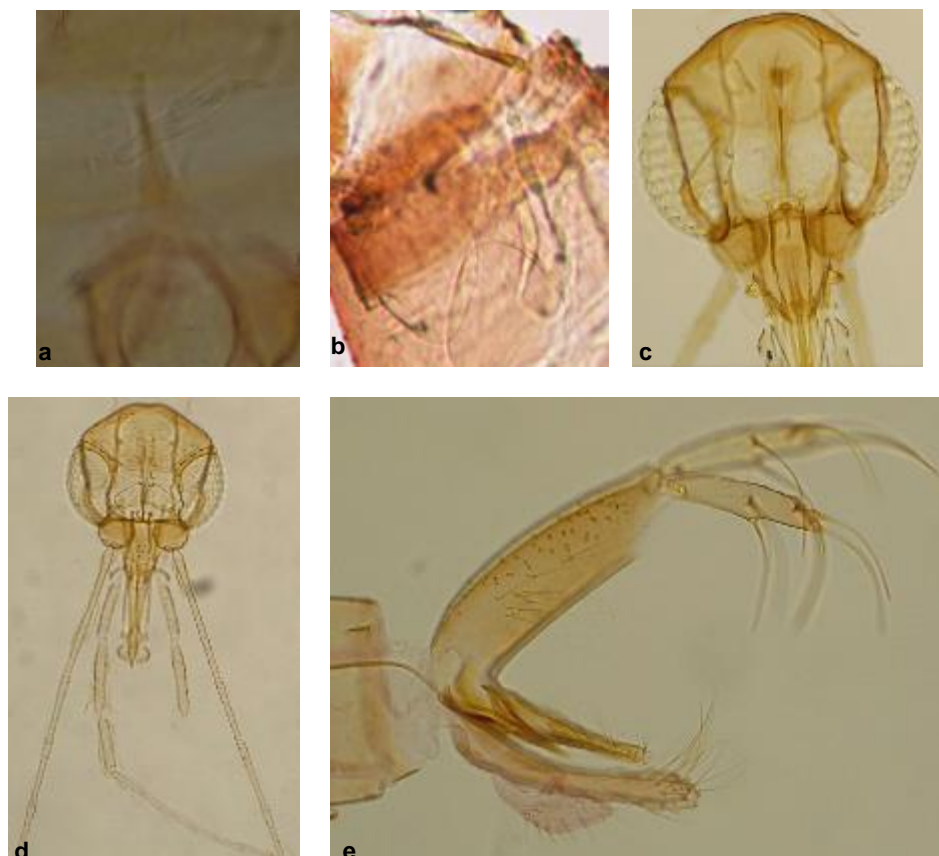
Macho. **a.** Cabeza; **b.** Genitalia externa.

Figura 2-6: *Br. mesai*



Macho. **a.** Cabeza; **b.** Genitalia externa.

Figura 2-7: *Mi. (Sau) trinidadensis*



Hembras. **a,b.** Espermatecas; **c.** Cabeza mostrando faringe con espinas. Macho. **d.** Cabeza; **e.** Genitalia externa.

Figura 2-8: *Mi. (Mic) cayennensis cayennensis*



Hembras. **a,b.** Espermatecas. Macho. **c.** Genitalia externa.

Figura 2-9: *Mi. (Mic) micropyga*



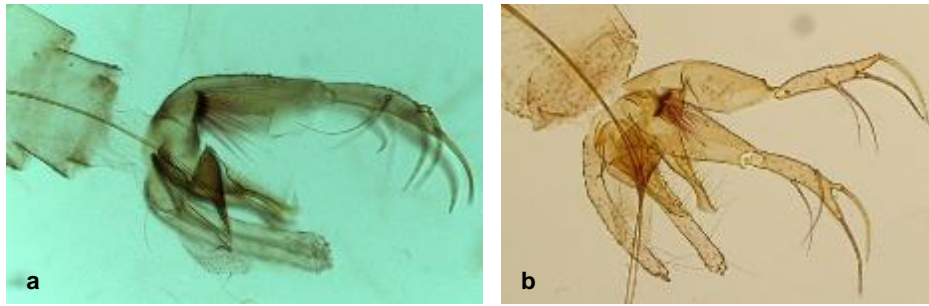
Macho. **a.** Genitalia externa.

Figura 2-10: *Mi. (Mic) chassigneti*



Hembra. **a.** Cabeza; **b.** Espermatecas. Macho. **c.** Cabeza; **d.** Genitalia externa.

Figura 2-11: *Sc. preclara*



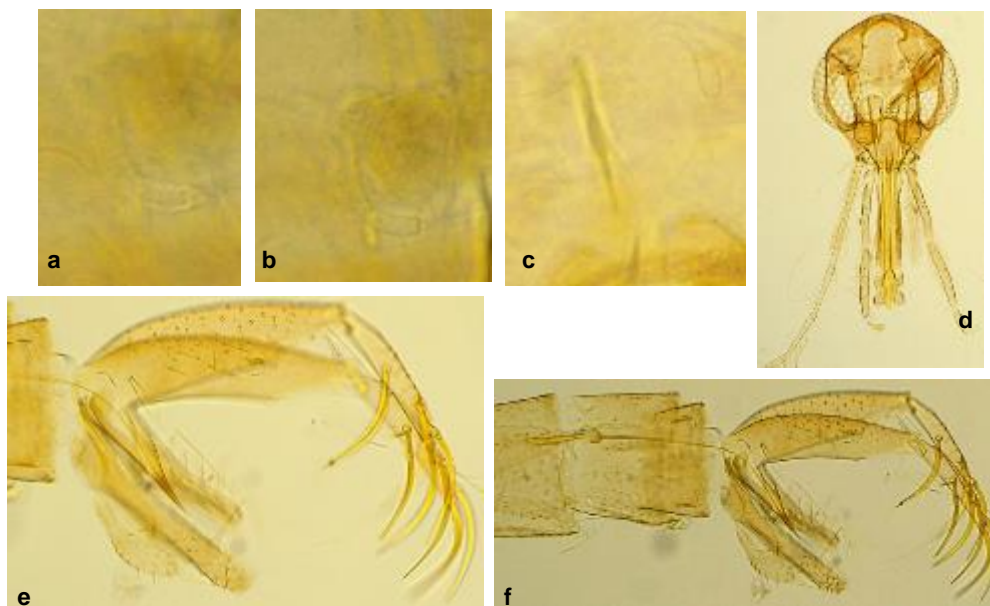
Macho. **a,b.** Genitalia externa.

Figura 2-12: *Sc. sordellii*



Hembra. **a.** Cabeza; **b.** Espermateca. Macho. **c,d.** Genitalia externa.

Figura 2-13: *Lu. (Hel) hartmanni*



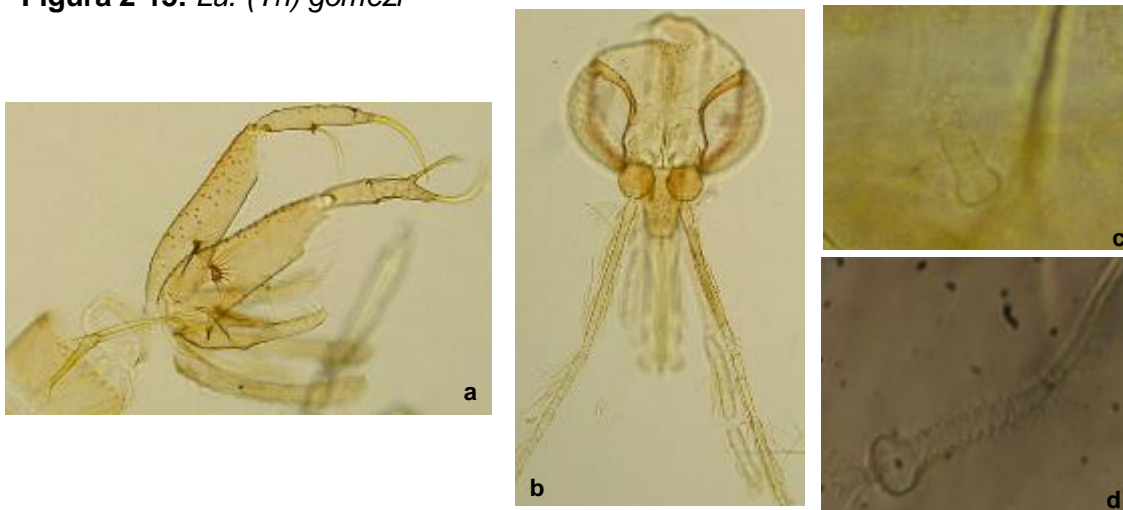
Hembra. **a,b,c.** Espermatecas; **d.** Cabeza. Macho. **e,f.** Genitalia externa.

Figura 2-14: *Lu. (Hel) tortura*



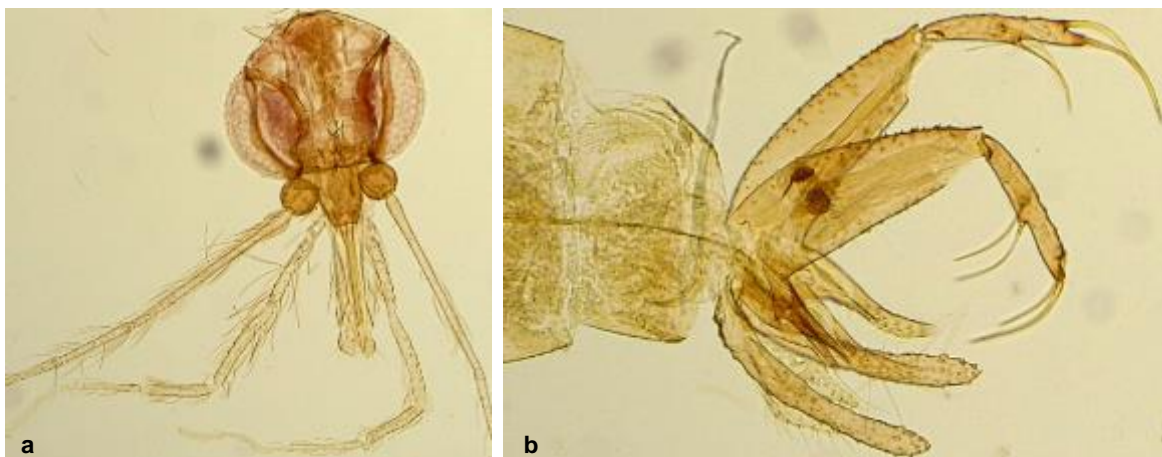
Macho. **a.** Cabeza; **b.** Genitalia externa.

Figura 2-15: *Lu. (Trl) gomezi*



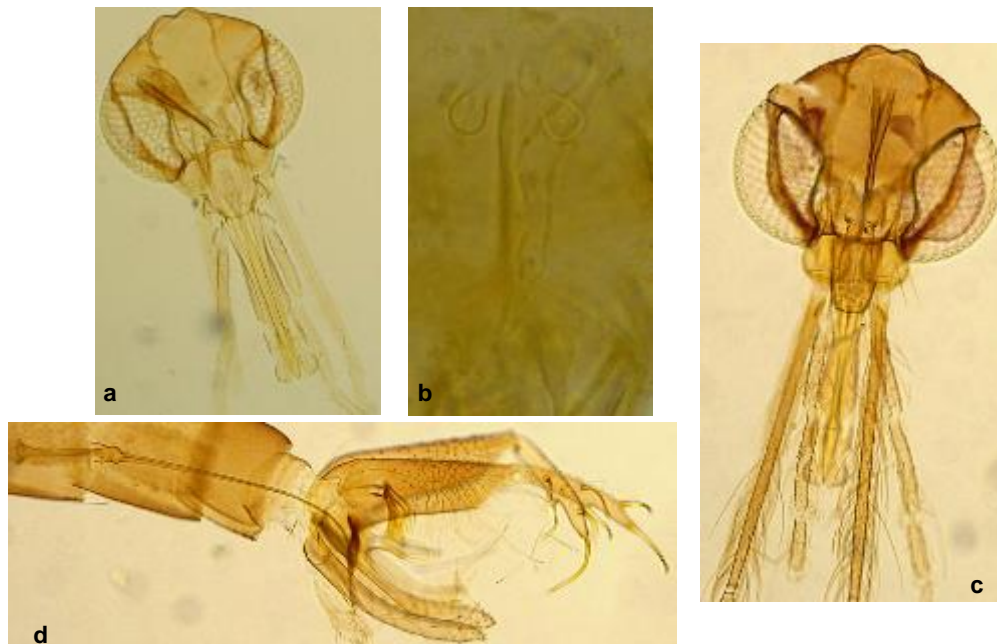
Macho. **a.** Genitalia externa; **b.** Cabeza. Hembra. **c,d.** Espermatecas.

Figura 2-16: *Lu. (Trl) sherlocki*



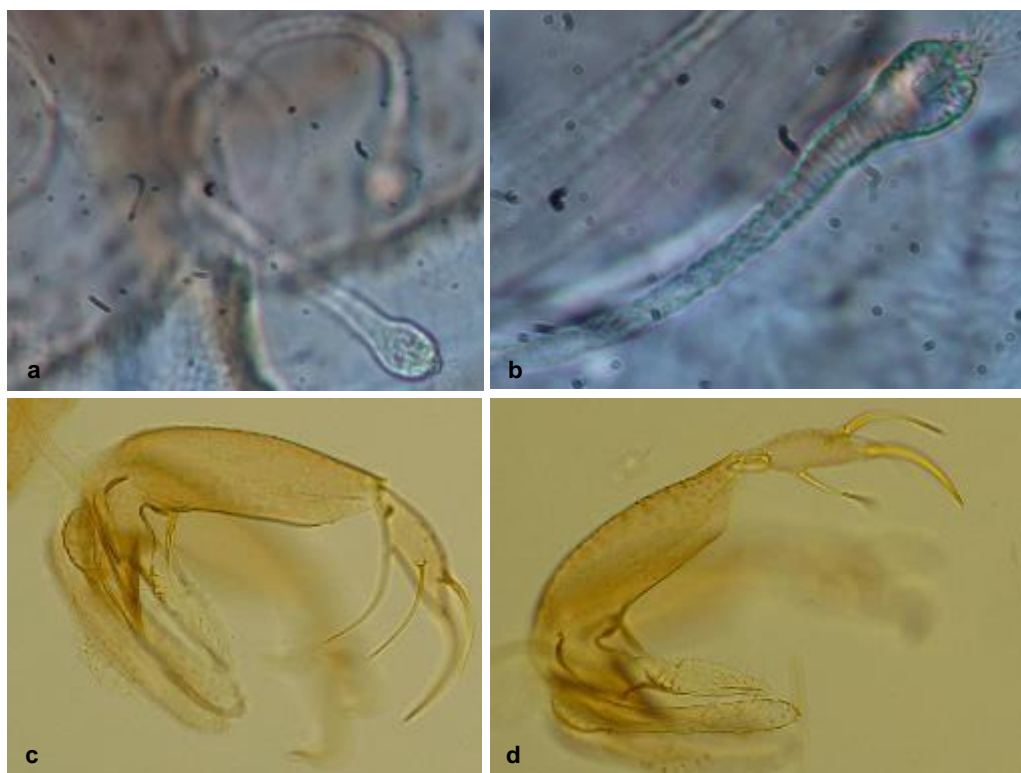
Macho. **a.** Cabeza; **b.** Genitalia externa.

Figura 2-17: *Lu. (Lutl) bifoliata*



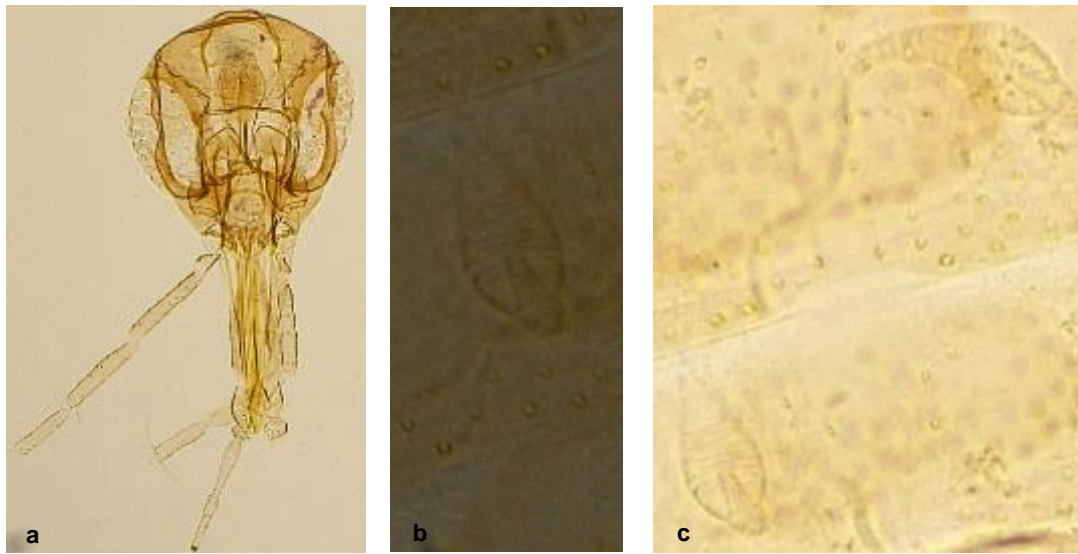
Hembra. **a.** Cabeza; **b.** Espermatecas. Macho. **c.** Cabeza; **d.** Genitalia externa.

Figura 2-18: *Pi. (Pif) evansi*



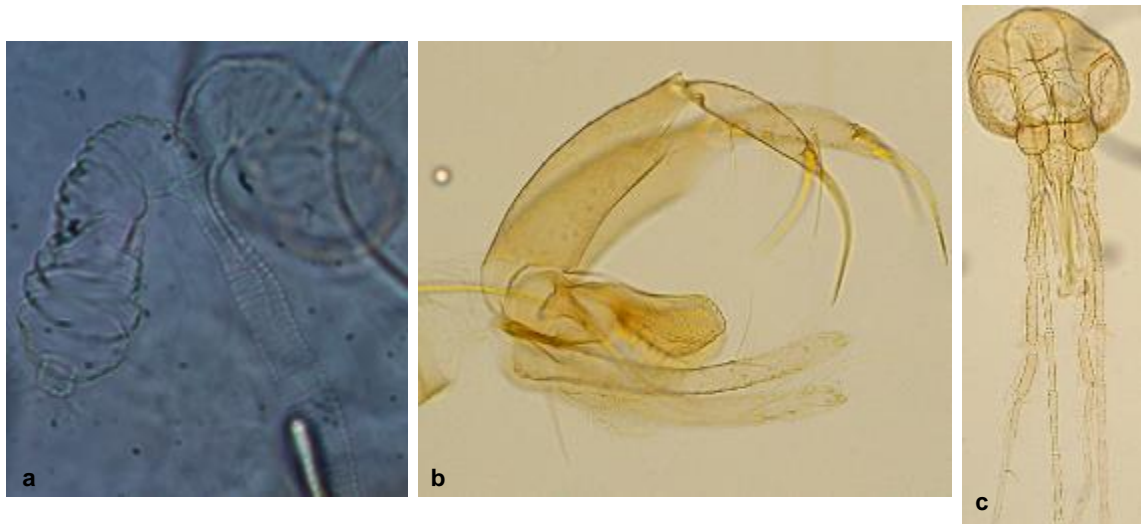
Hembra. **a,b.** Espermatecas. Macho. **c,d.** Genitalia externa.

Figura 2-19: *Pi. (Pif) nevesi*



Hembra. **a.** Cabeza; **b,c.** Espermatecas.

Figura 2-20: *Pi. (Pif) rangelianai*



Hembra. **a.** Espermatecas. Macho. **b.** Genitalia externa; **c.** Cabeza.

Figura 2-21: *Pr. camposi*



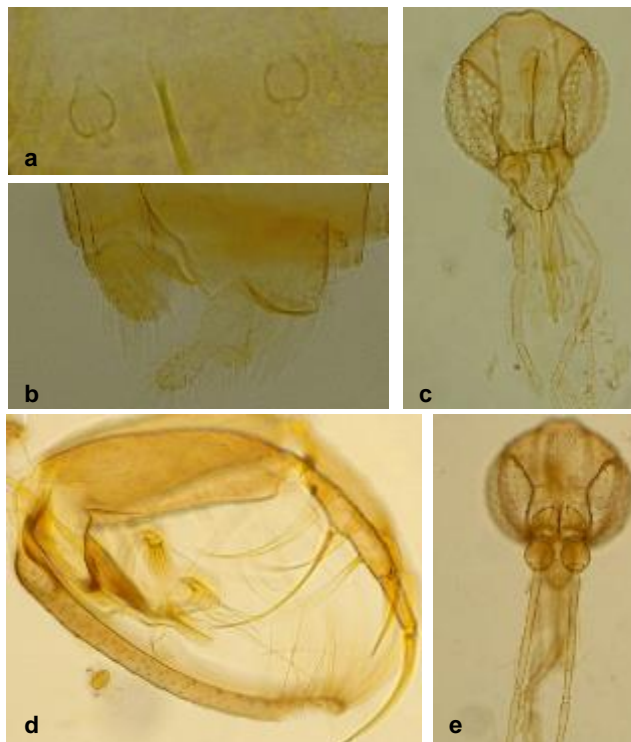
Macho. **a.** Cabeza; **b.** Genitalia externa.

Figura 2-22: *Pr. choti*



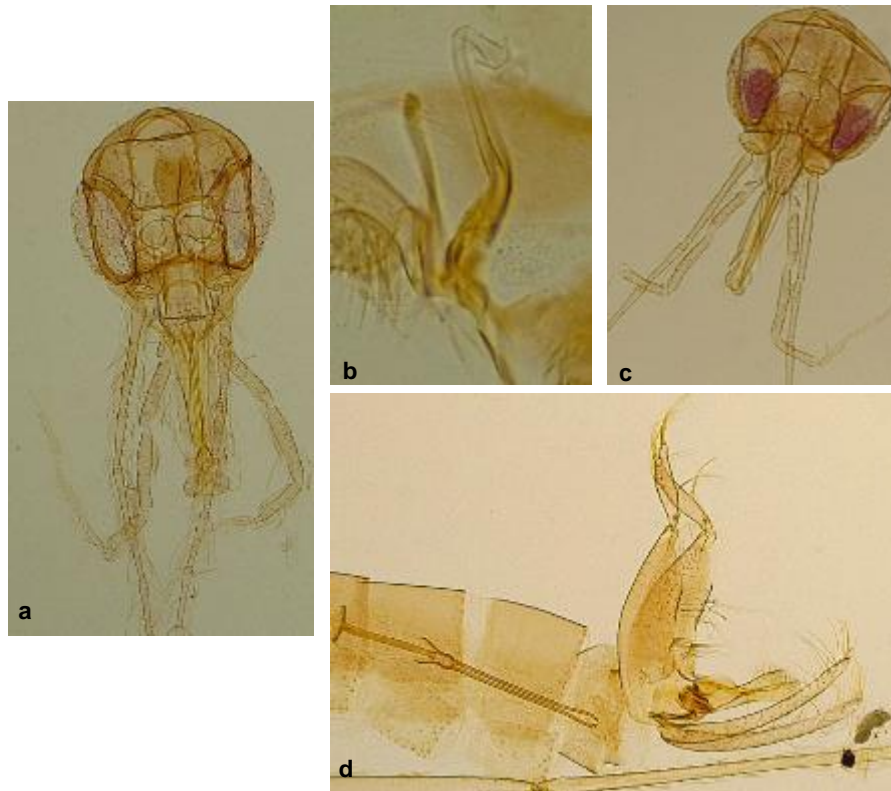
Macho. **a.** Genitalia externa.

Figura 2-23: *Ty. Triramula*



Hembra. **a.** Espermatecas; **b.** Cercos característicos del grupo; **c.** Cabeza. Macho. **d.** Genitalia externa; **e.** Cabeza.

Figura 2-24: *Ev. (Ald) walkeri*



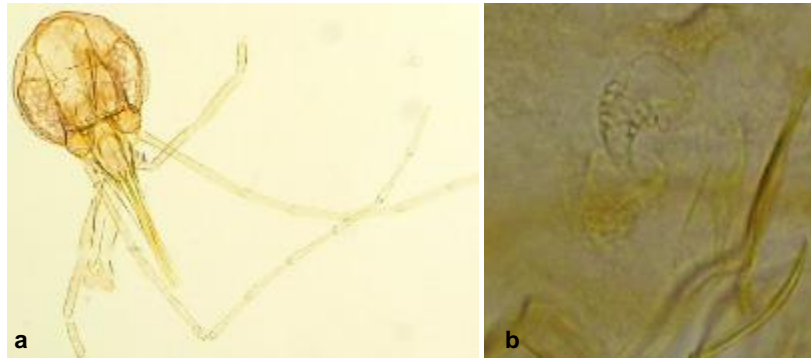
Hembra. **a.** Cabeza; **b.** Espermatecas. Macho. **c.** Cabeza; **d.** Genitalia externa.

Figura 2-25: *Ev. (Eva) georgii*



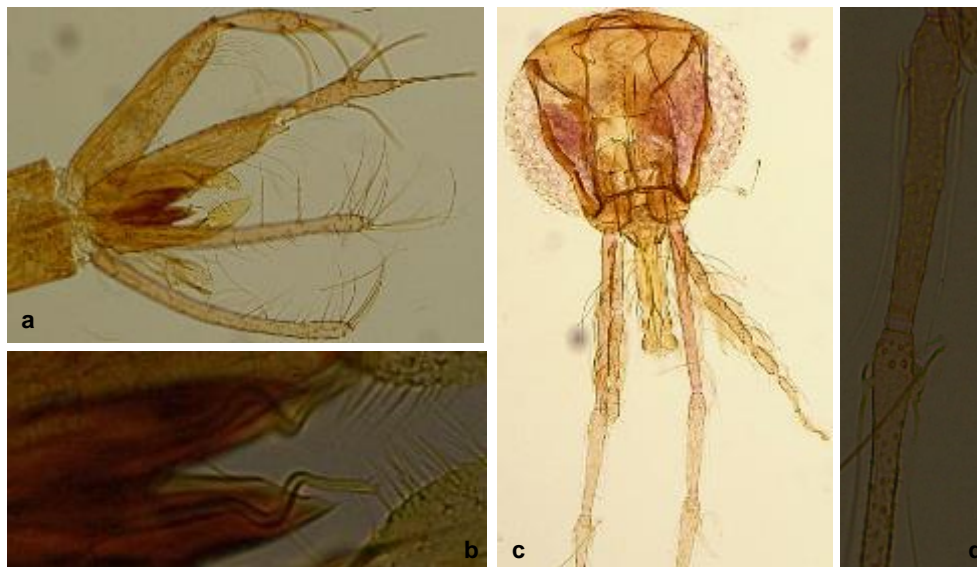
Hembras. **a.** Cabeza; **b.** Espermatecas

Figura 2-26: *Ev. (Eva) saulensis*



Hembra. **a.** Cabeza; **b.** Espermatecas

Figura 2-27: *Pa. (For.) aragai*



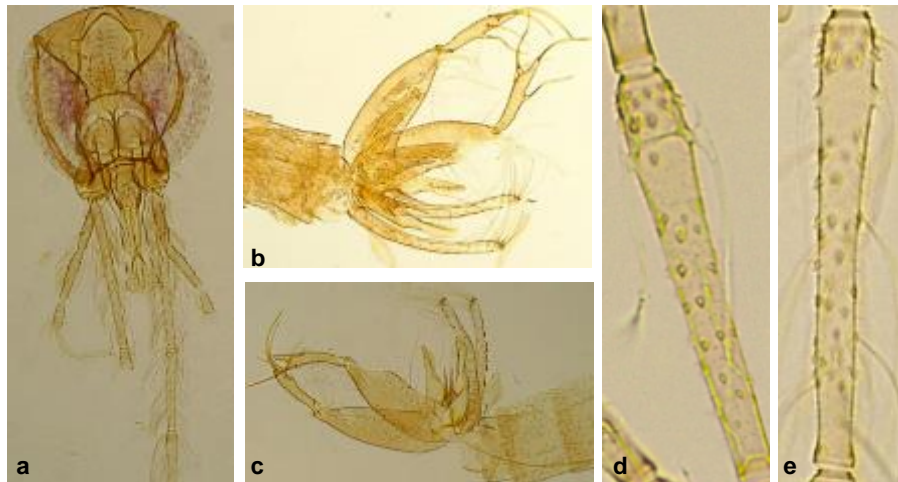
Macho. **a.** Genitalia externa; **b.** Ductos serpenteantes de la bomba eyaculadora; **c.** Cabeza; **d.** Ascoides bifurcados.

Figura 2-28: *Pa. (For) carpenteri*



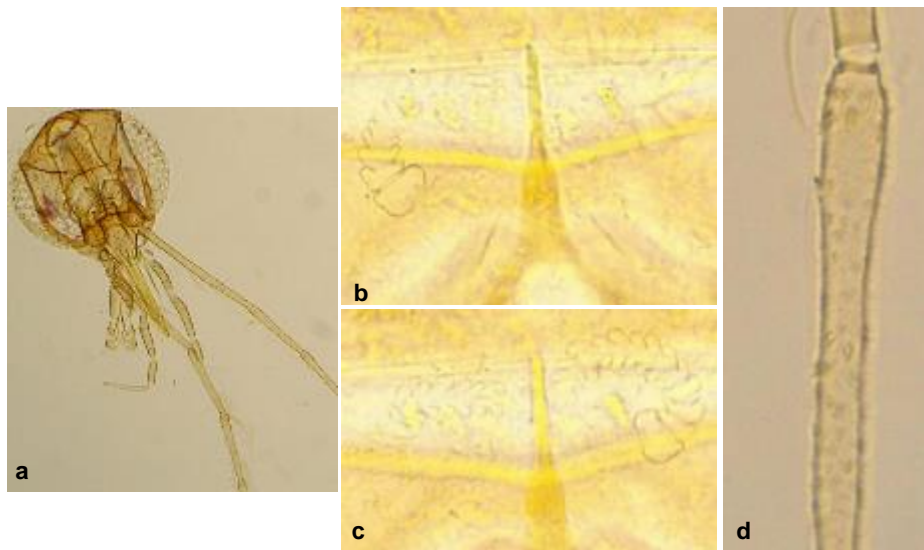
Macho. **a.** Genitalia externa.

Figura 2-29: *Pa. (For) pradobarrientosi*



Macho. **a.** Cabeza; **b,c.** Genitalia externa; **d,e.** Ascoides.

Figura 2-30: *Pa. (Xip) dreisbachi*



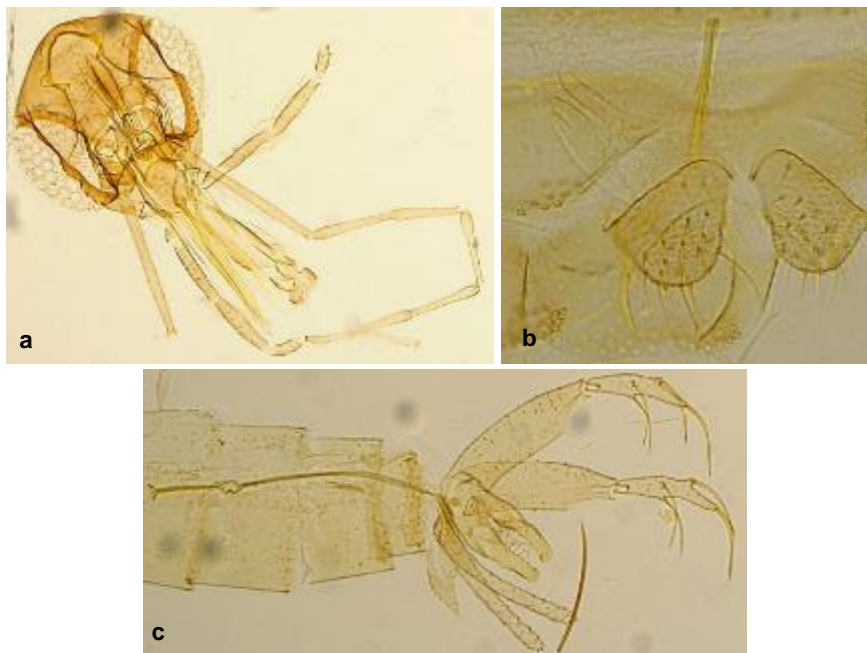
Hembra. **a.** Cabeza de la hembra; **b,c.** Espermatecas; **d.** Ascoides bifurcados.

Figura 2-31: *Pa. (Psa) dendrophyla*



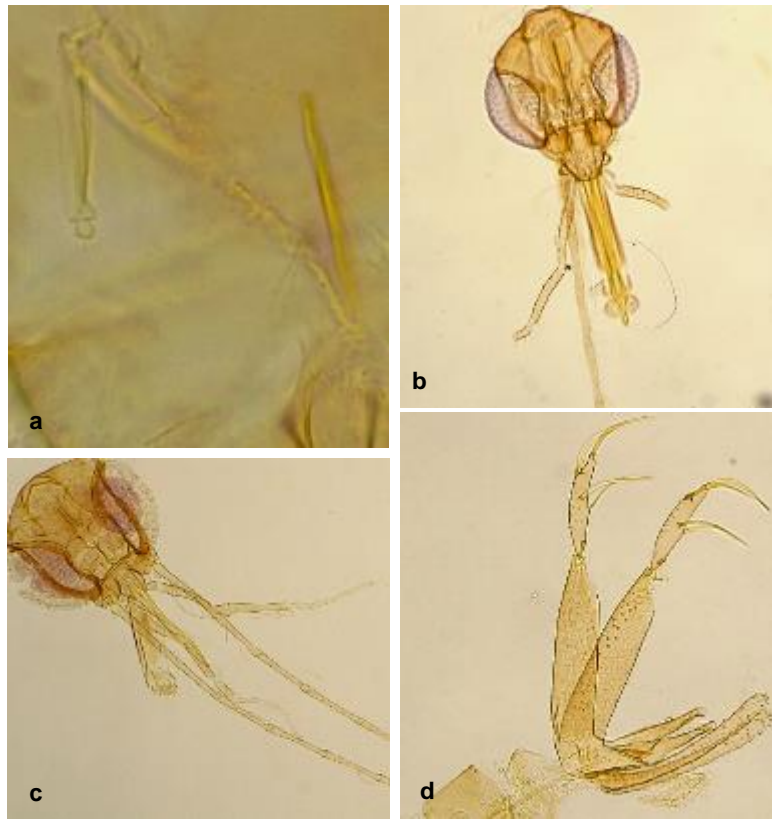
Macho. **a.** Genitalia del macho; **b.** Parámetro

Figura 2-32: *Pa. (Psa) punctigeniculata*



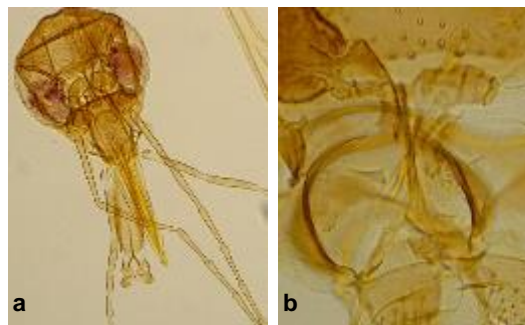
Hembra. **a.** Cabeza; **b.** Espermatecas. Macho. **c.** Genitalia externa.

Figura 2-33: *Pa. (Psa) shannoni*



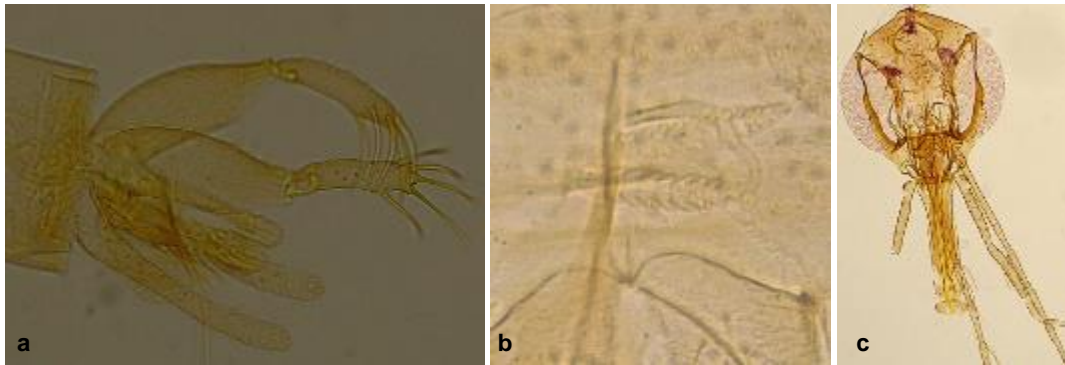
Hembra. **a.** Espermatecas; **b.** Cabeza. Macho. **c.** Cabeza; **d.** Genitalia externa.

Figura 2-34: *Vi. furcata*



Hembra. **a.** Cabeza; **b.** Espermatecas esclerotizadas.

Figura 2-35: *Ps. amazonensis*



Macho. **a.** Genitalia externa. Hembra. **b.** Espermatecas; **c.** Cabeza.

Figura 2-36: *Ps. ayrozai*



Hembra. **a.** Cabeza; **b.** Tórax con pigmentación característica de la especie; **c.** Espermatecas. Macho. **d.** Genitalia externa.

Figura 2-37: *Ps. carrerai carrerai*



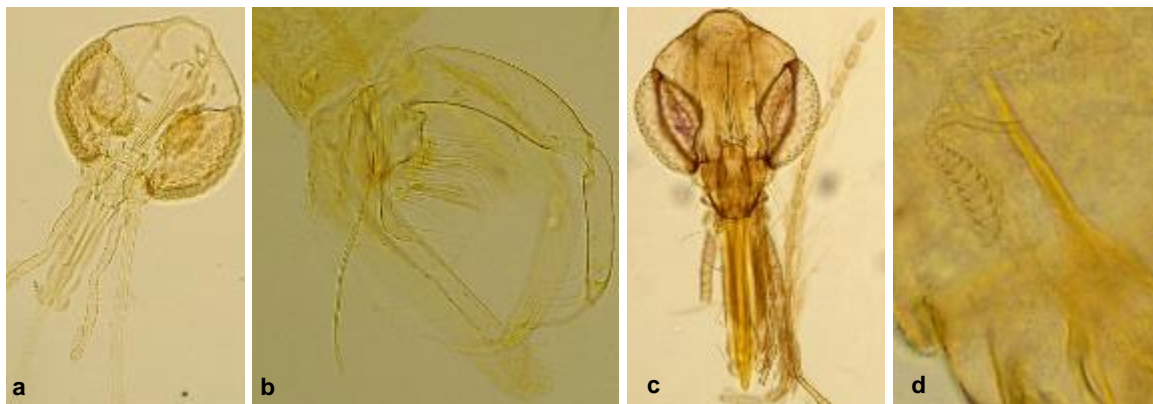
Macho. **a,b.** Genitalia externa.

Figura 2-38: *Ps. hirsutus hirsutus*



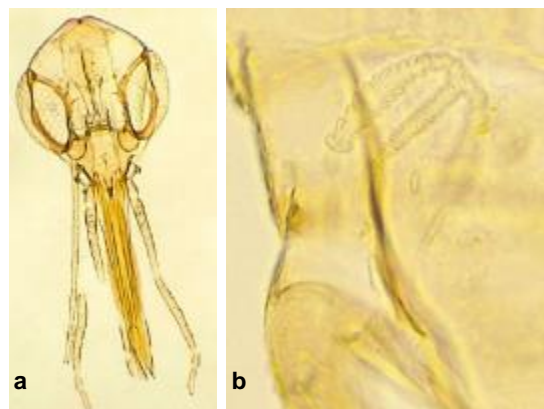
Hembra. **a.** Cabeza; **b.** Espermatecas.

Figura 2-39: *Ps. panamensis*



Macho. **a.** Cabeza; **b.** Genitalia externa. Hembra. **c.** Cabeza; **d.** Espermatecas.

Figura 2-40: *Ps. paraensis*



Hembra. **a.** Cabeza; **b.** Espermatecas.

Figura 2-41: *Ps. geniculatus*



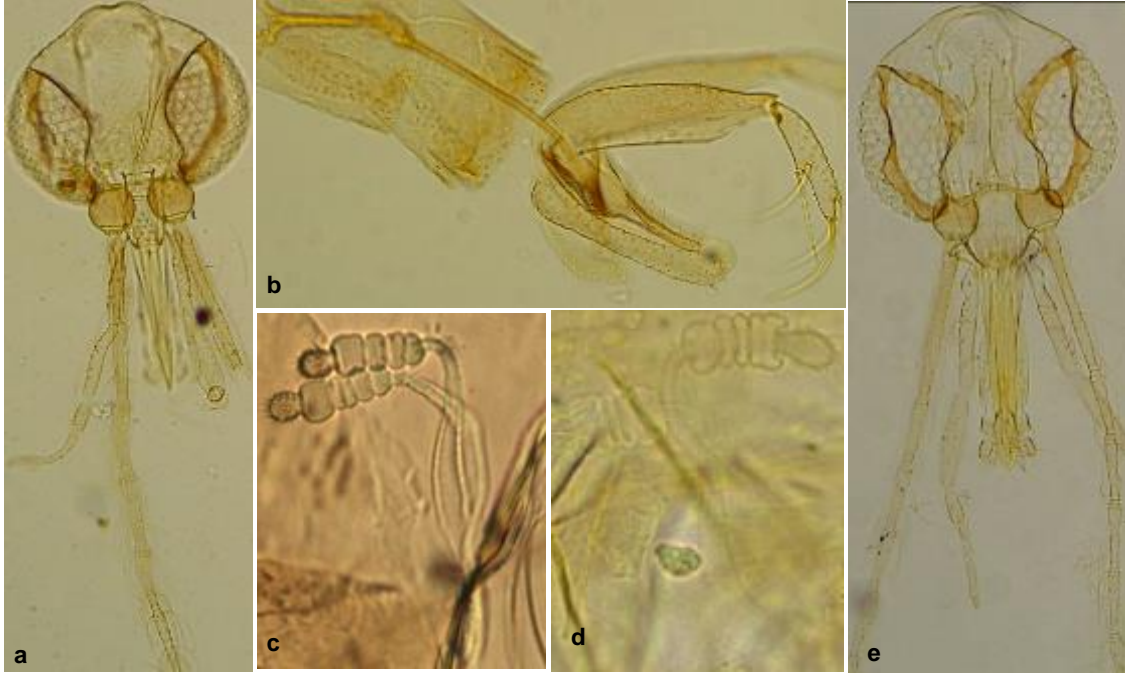
Macho. **a.** Cabeza; **b.** Genitalia externa.

Figura 2-42: *Ny. antunesi*



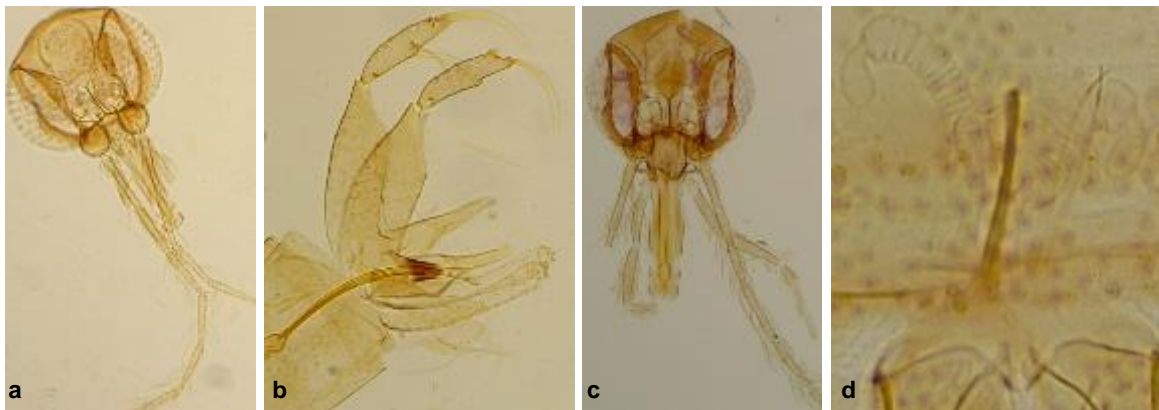
Macho. **a.** Cabeza; **b.** Genitalia externa.

Figura 2-43: *Ny. trapidoi*



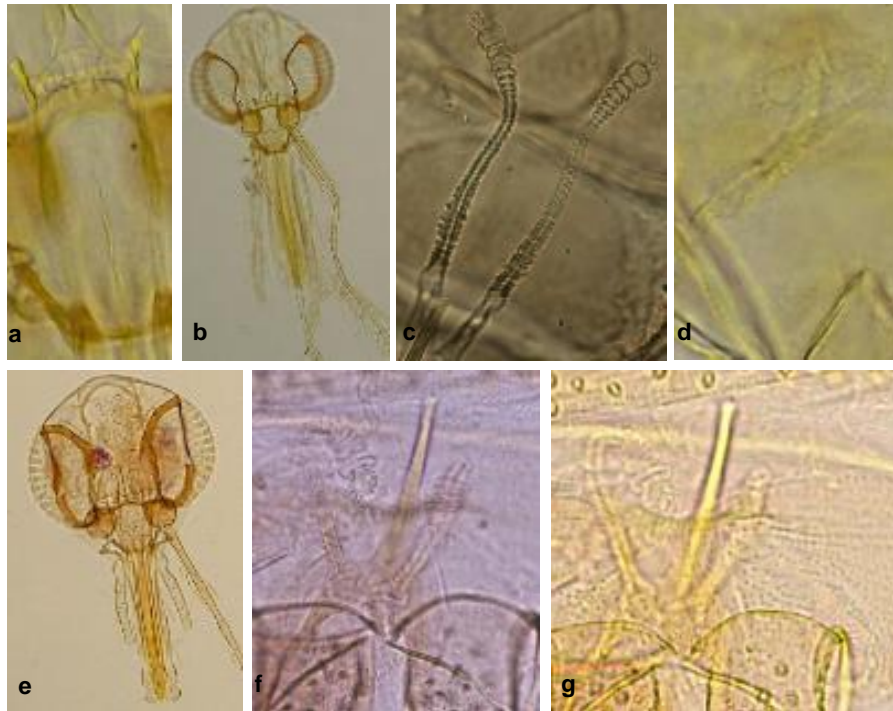
Macho. **a.** Cabeza; **b.** Genitalia externa. Hembra. **c,d.** Espermatecas; **e.** Cabeza.

Figura 2-44: *Ny. umbratilis*



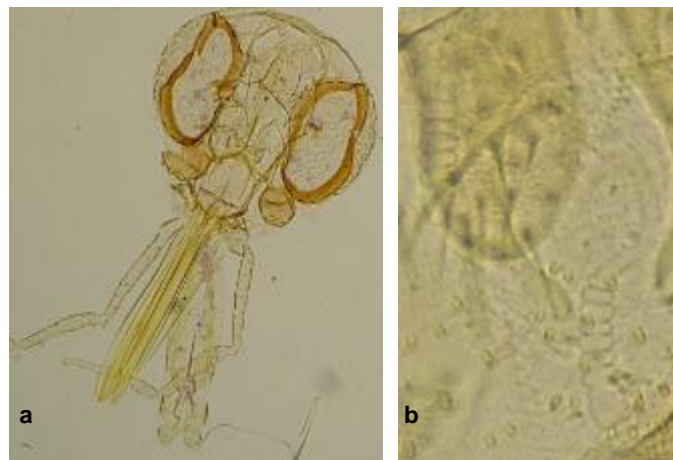
Macho. **a.** Cabeza; **b.** Genitalia externa; Hembras. **c,d.** Espermatecas; **e.** Cabeza.

Figura 2-45: *Ny. yuilli yuilli*



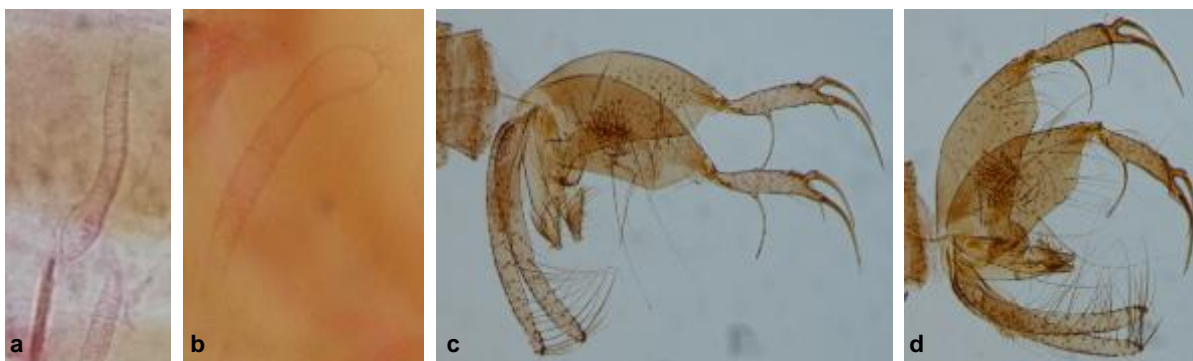
Hembra. **a.** Cibario; **b,e.** Cabeza; **c,d,f,g.** Espermatecas. (Sitios de colecta **a,b,c,d.** Caldas; **e,f,g.** Amazonas)

Figura 2-46: *Ny. yuilli pajoti*



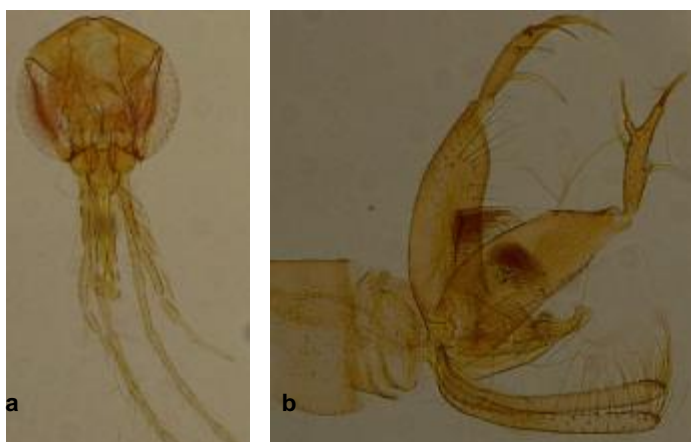
Hembra. **a.** Cabeza de la hembra; **b.** Espermatecas

Figura 2-47: *Trichophoromyia* sp



Hembra. **a,b.** Espermatecas. Macho. **c,d.** Genitalia externa.

Figura 2-48: *Th. howardi*



Macho. **a.** Cabeza; **b.** Genitalia externa

2.2.3 Importancia de las especies de flebotomíneos

Entre las especies colectadas en este estudio 15 de ellas (30%) son reconocidas por sus hábitos antropofílicos y/o antecedentes epidemiológicos en América *Lu. (Hel) hartmanni*, *Lu. (Lut) lichi*, *Lu. (Trl) gomezi*, *Pi (Pif) evansi*, *Pi (Pif) rangeliana*, *Pa. (Psa) shannoni*, *Ps. panamensis*, *Ps. ayrozai*, *Ps. carrerai carrerai*, *Ps. paraensis*, *Ps. amazonensis*, *Ny. antunesi*, *Ny. umbratilis*, *Ny. trapidoi* y *Ny. yuilli yuilli* (Tabla 2-2).

Tabla 2-2: Importancia médica de las especies de Phlebotominae colectadas en el estudio

Especie	MC	Estado vectorial	Infección natural	Infección experimental	País del reporte
<i>Lu. (Hel) hartmanni</i>	LC	AT	<i>L. (V) colombiensis</i>		Colombia, Ecuador, Panamá
			<i>L. (V) panamensis</i>		Colombia
			<i>L. equatorialis</i>		Ecuador
<i>Lu. (Lut) lichi</i>	LC	EE	<i>L. (L) venezuelensis</i>		Venezuela
		AT	<i>L. (V) braziliensis</i>		Colombia
<i>Lu. (Trl) gomezi</i>	LC	AT	<i>L. (V) braziliensis</i>	<i>L. (V) braziliensis</i>	Colombia, Ecuador, Perú, Venezuela
		EE	<i>L. (V) colombiensis</i>		Panamá
			<i>L. (V) panamensis</i>		Ecuador
		AT-EE	<i>L. (V) panamensis</i>	<i>L. (V) panamensis</i>	Panamá
<i>Pi. (Pif) evansi</i>	LV	VC	<i>L. (L) infantum</i>	<i>L. mexicana</i>	Colombia
		AT	<i>L. (L) infantum</i>		Venezuela
<i>Pi. (Pif) rangelliana</i>	LC	EE-AT	<i>L. (L) venezuelensis</i>		Venezuela
<i>Pa. (Psa) shannoni</i>	LC	EE	<i>L. (V) panamensis</i>		Panamá
		AT		<i>L. mexicana</i>	EEUU
<i>Ps. panamensis</i>	LC	EE	<i>L. (V) colombiensis</i>		Panamá
			<i>L. (L) venezuelensis</i>		Venezuela
		EE-AT	<i>L. (V) braziliensis</i>		Venezuela
		AT	<i>L. (V) panamensis</i>	<i>L. (V) braziliensis</i>	Panamá, Colombia, Venezuela
<i>Ps. ayrozai</i>	LC	AT	<i>L. (V) braziliensis</i>		Bolivia
			<i>L. (V) naiffi</i>		Brasil
<i>Ps. c. carrerai</i>	LC	AT	<i>L. (V) braziliensis</i>		Bolivia, Colombia, Ecuador, Perú, Venezuela
<i>Ps. paraensis</i>	LC	EE	<i>L. (V) braziliensis</i>		Brasil
		AT	<i>L. (V) naiffi</i>		Brasil
<i>Ps. amazonensis</i>	LC	EE	<i>L. (V) braziliensis</i>		Brasil
<i>Ny. antunesi</i>	LV	AT	<i>L. (L) infantum</i>		Brasil
		EE	<i>L. (V) linderbergi</i>		Brasil
<i>Ny. umbratilis</i>	LC	VC	<i>L. (V) guyanensis</i>		Guyana Francesa, Brasil
			<i>L. (V) braziliensis</i>		Brasil
		AT	<i>L. (V) guyanensis</i>		Bolivia, Colombia, Perú, Venezuela
		EE	<i>L. (V) guyanensis</i>		Guyana, Surinam
<i>Ny. trapidoi</i>	LC	VC	<i>L. (V) panamensis</i>	<i>L. (V) panamensis</i>	Costa Rica, Panamá
		AT	<i>L. (V) panamensis</i>		Colombia, Ecuador
<i>Ny. yuilli yuilli</i>	LC		<i>L. (V) panamensis</i>	<i>L. (V) panamensis</i>	Colombia, Brasil

Morales *et al*, 1981; Christensen *et al*, 1983; WHO 1984; Arias *et al*, 1985; Lawyer and Young 1987; Travi *et al*, 1988; Kreutzer *et al*, 1991; Alexander *et al*, 1992; Dedet, 1993; Jaramillo *et al*, 1994; Ferro y Morales, 1998; Rodríguez *et al*, 1999; Alexander *et al*, 2001; Travi *et al*, 2002; Duque *et al*, 2004; Bejarano, 2006; Santamaría *et al*, 2006; Claborn *et al*, 2009; Salomón, 2009; Ferro *et al*, 2011; Contreras *et al*, 2014; Bates *et al*, 2015.

MC Manifestación clínica **VC** Vector comprobado **AT** Aislado y tipificado **EE** Evidencia epidemiológica **LC** Leishmaniasis cutánea **LV** Leishmaniasis visceral

En la Tabla 2-2 se registran las especies de importancia médica, su estado vectorial actual, se menciona la infección natural o experimental con parásitos del género *Leishmania*, además del país donde se ha hecho el reporte. El mayor número de estas especies fue colectado en Caldas (8), seguido de Antioquia (6), Sucre y Amazonas con igual número de estas especies de importancia médica (5).

2.3 DISCUSIÓN

En este estudio se logró la identificación de 49 especies por taxonomía clásica. Las especies encontradas en Ovejas (Sucre) y Santa Marta (Magdalena) corresponden con lo reportado para estos departamentos (Bejarano, 2006; Lambraño *et al*, 2012, Bejarano *et al*, 2015 y Romero *et al*, 2016), se encontraron diez y tres especies respectivamente.

En Caldas se encontraron 15 especies, 12 de estas coinciden con reportes previos para el departamento (Bejarano, 2006; Barreto *et al*, 2006 y Contreras, 2013), encontrándose diferencias en tres especies. *Br. leopoldoi* había sido reportada en Antioquia, Choco y Valle del Cauca, constituyendo este su primer reporte para el departamento, al igual que las especies *Ev. (Eva) saulensis* y *Ps. paraensis* (Bejarano, 2006; Barreto *et al*, 2007).

Las especies encontradas en el departamento de Antioquia corresponden en su totalidad con los reportes previos para estas localidades (Bejarano, 2006; Vargas *et al*, 2001).

El inventario de flebotómicos para el departamento de Amazonas aumentó en siete especies, en comparación con los registros para esta zona (Wolf *et al*, 2003 y Bejarano, 2006) *Br. mesai*, *Lu (Hel) sanguinaria*, *Pr. choti*, *Ev. (Eva) georgii*, *Pa. (Psa) pradobarrientosi*, *Pa. (Psa) punctigeniculata* y *Ny. yuilli pajoti*.

Br. mesai había sido reportada anteriormente en la región amazónica, pero en el departamento del Guainía (Bejarano *et al*, 2007) por lo que se considera primer reporte para el departamento de Amazonas.

En este estudio también se obtuvieron nuevos registros para el país, tal es el caso de *Pa. (Psa) pradobarrientosi* y *Ev. (Eva) georgii*, ambas reportadas en la selva amazónica ecuatoriana (Zapata, 2012) y brasileña (Freitas y Barrett, 2002) respectivamente.

La distribución geográfica de *Lu. (Trl) gomezi* incluye Panamá, Costa Rica, Honduras, Nicaragua, El Salvador, Colombia, Ecuador, Venezuela y sur de Brasil (Young, 1979; Galati, 2014). Los hábitos de esta especie se relacionan con su antropofilia y ubicuidad por diversos hábitats (Porter y De Foliart, 1981), además de una amplia distribución geográfica en el país (Montoya y Ferro, 1999), lo que coincide con nuestros resultados al ser la especie colectada en un mayor número de municipios (6).

Ps. panamensis también se ha reportado en varios países, como México, Belize, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Costa Rica, Panamá, Colombia, Venezuela, Surinam, Guyana Francesa y Ecuador (Galati, 2010), esta fue la segunda especie más frecuente en este estudio, encontrándose en 5 municipios (Remedios, Samaná, Norcasia, Victoria y Ovejas).

Del total de especies identificadas, 15 son consideradas de importancia médica en la transmisión de la leishmaniasis, nueve de ellas con estudios realizados en el país (Tabla 2-2). El mayor número de estas especies fue encontrado en los municipios de Caldas (8 especies) y Antioquia (6 especies) lo que corresponde con el número constante de casos de leishmaniasis en estos municipios según el SIVIGILA. Se considera que la densidad poblacional de estas especies y la aparición de otras nuevas, está relacionada principalmente con los factores climáticos y con las labores culturales y económicas practicadas por el hombre, ya que estas especies se caracterizan por tener hábitos antropofílicos (Alexander *et al*, 2001; Vélez *et al*, 2001; Azevedo *et al*, 2002; Travi *et al*, 2002; Contreras, 2013).

Las especies *Mi. (Mic) cayennensis cayennensis*, *Mi. (Mic) micropyga* y *Mi. (Sau) trinidadensis*, aunque no se consideran de importancia médica ya que se caracterizaban por alimentarse de animales de sangre fría, en recientes estudios se ha comprobado su antropofilia en incluso se han observado promastigotes no identificados (Cohero *et al*, 2007; Paternina *et al*, 2016).

Se identificaron ejemplares de la especie *Ny. yuilli yuilli* en los tres municipios de Caldas (Norcasia, Samaná y Victoria) y un municipio en Amazonas (Leticia), en ambos departamentos la especie ya había sido reportada (Contreras, 2013 y Wolff *et al*, 2003). En esta ocasión no se logró obtener machos de la especie en Leticia, sin embargo se observaron algunas diferencias sutiles en las espermatecas de las hembras, aunque en ambas se observa una fuerte rugosidad esclerotizada en los ductos individuales, se

aprecian diferencias en el cuerpo de la espermateca, los especímenes de Caldas muestran anillos basales casi de igual tamaño que los ductos individuales y una cabeza muy pequeña; a diferencia de los especímenes de Amazonas en los cuales se observa anillos en la porción basal mucho más gruesos en comparación con los ductos individuales y una cabeza de mayor tamaño (Figura 2-45).

Este hallazgo coincide con el reciente trabajo realizado por Godoy y Galati (2016), donde a partir de análisis morfológicos y morfométricos con machos de esta especie de diferentes localidades, hacen una revalidación de la sinónima *Ny. fraihai*, concluyen que de las localidades de donde se revisó material (Brasil, Perú, Colombia, Bolivia), los especímenes pertenecientes al bioma de bosque atlántico y el bioma amazónico en Brasil, Perú, Bolivia, de hecho, pertenecen a *Ny. fraihai*, reduciendo la distribución geográfica de *Ny. yuilli yuilli* a zonas andinas y trasandino. Aunque ellos concluyen que las hembras de ambas especies son indistinguibles, en el presente estudio se observaron pequeñas diferencias, que se considera deben ser analizadas cuidadosamente para determinar si son suficientes para separar ambas especies.

Con la revalidación de *Ny. fraihai* se plantea la necesidad de revisar la amplia distribución atribuida a *Ny. yuilli yuilli*, registrándose en países como Bolivia, Brasil, Ecuador, Colombia, Perú y Venezuela (Young & Duncan, 1994 y Galati, 2013).

Para Colombia la revisión debe ser a nivel departamental, ya que en estudios previos se había registrado esta especie en Amazonas, Antioquia, Caquetá, Guaviare, Guanía, Meta, Putumayo y Santander (Bejarano, 2006; Wolff *et al*, 2003; Barreto *et al*, 2006). Este estudio sugiere la presencia de *Ny. yuilli yuilli* en Caldas y de *Ny. fraihai* en Amazonas, soportado por análisis moleculares y pequeñas diferencias morfológicas encontradas en las hembras, sin embargo, no se logró confirmar la especie *Ny. fraihai* porque no se encontró machos, por lo que se incluyen todos los especímenes dentro de *Ny yuilli yuilli*.

Se considera que sería adecuado realizar estudios sobre hábitos antropofílicos, capacidad y competencia de ambas especies, para determinar si el papel en la transmisión de la leishmaniasis es asumido por *Ny. yuilli yuilli* o *ny. fraihai*.

Del género *Nyssomyia* se identificó una especie estrechamente relacionada con *Ny. yuilli yuilli*, se trata de *Ny. yuilli pajoti*, estas especies se diferencian en el macho por la longitud de la región basal del parámetro y en la hembra por los ductos individuales que presentan

pámulas esféricas ampliamente distribuidas en la estructura. Esta especie fue encontrada en la comunidad de Tipisca, en el municipio de Puerto Nariño (Amazonas).

Capítulo 3: Inventario de códigos genéticos COI

3.1 Metodología

Para realizar el inventario molecular de especies y estimar la diversidad haplotípica con base en secuencias del fragmento 5' del gen COI, se tomaron en lo posible ejemplares representativos de todas las especies colectadas durante el trabajo de campo. Los insectos fueron almacenados en seco y posteriormente transportados al laboratorio donde se fragmentaron bajo estereoscopio. La cabeza y los últimos segmentos abdominales se usaron para identificar la especie por taxonomía clásica y el tórax fue almacenado en seco a -20°C hasta su procesamiento por técnicas moleculares.

Una vez se realizó la identificación de especies por taxonomía clásica usando las claves de Galati (2013) y Young & Duncan (1994) como se menciona en el capítulo 2, se tomaron hembras y machos de todas las especies colectadas para estimar la diversidad haplotípica.

3.1.1 Extracción de ADN total

A partir del tórax y los segmentos proximales del abdomen de cada insecto se realizó una extracción de ácidos nucleicos usando el protocolo de alta concentración de sales descrito por Collins *et al.* (1987) con las modificaciones propuestas por Contreras y colaboradores (2014) para su uso en flebotomíneos. Se realizó una maceración mecánica del insecto con un micropistilo plástico estéril en 60µL del búfer de lisis (0.08M NaCl, 0.16M Sacarosa, 0.06M EDTA, 0.5% SDS, 0.1M Tris-HCL a pH de 7.5), posteriormente una digestión enzimática del macerado con Proteinasa K (1ug/uL) a 65°C durante 2 horas, seguida de la adición de 14µL de Acetato de Potasio M, para una concentración final de 1M e incubación en hielo durante 30 minutos. Posteriormente se centrifugó a 13.000g por 10min a 4°C. Al sobrenadante obtenido se le agregaron 200µL de etanol absoluto, éste fue mantenido a 4°C durante una noche, luego se centrifugó a 13.000g por 20min a 4°C y se descartó el sobrenadante. El precipitado obtenido se lavó con etanol al 70% y el ADN

se resuspendió en 60 µL de agua ultrapura. El ADN se conservó a -20°C hasta su uso en la amplificación del fragmento “código de barras” del gen mitocondrial COI.

3.1.2 Amplificación del fragmento 5' del gen Citocromo Oxidasa I (COI) mediante la técnica de PCR

Para amplificar el fragmento del gen COI (548 pb) definido como “código de barras”, se usaron los oligonucleótidos LCO1490 - GGTCACAAATCATAAAGATATTGG y HCO2198 - TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA (Hebert et al. 2003). La PCR se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de 5 min (94°C), seguida por 35 ciclos de 94°C durante 1 min (desnaturalización), 45°C durante 1min (annealing), 72°C durante 1 min (extensión); y una extensión final a 72°C durante 10 min. Cada mezcla de PCR con un volumen de reacción final de 50µL: 5µL de PCR buffer 10X, 2.5mM MgCl₂, 10mM de la mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs), 1.5U Taq ADN polimerasa, 0.3µM de cada oligonucleótido y 5µL de plantilla del ADN y el volumen restante de ddH₂O hasta 50µL.

3.1.3 Visualización y secuenciación de los productos de PCR

Los productos del fragmento 5' del gen COI amplificados mediante PCR fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1.6%, éste con previa adición de la tinción fluorescente para ácidos nucleicos GelStar® (Lonza). Para ello 5 µL del producto de PCR se mezclaron con 2 µL de Azul de Bromofenol y se sometió a electroforesis horizontal en búfer TBE 1X a 90 voltios durante 50 minutos. La fotodocumentación de los geles fue realizada con un transiluminador Dark Reader DR88X (Clare Chemical Research) y una cámara fotográfica Cannon A640. Los productos de PCR se consideraron positivos cuando se presentaron bandas del tamaño esperado para el gen evaluado (700 pb), utilizando como referentes los controles positivos de PCR, además de un control negativo de la PCR que constaba de un mix de todos los reactivos usados para la prueba sin agregar ADN y un marcador de peso molecular 100pb DNA Ladder (Promega, USA).

Los productos amplificados fueron sometidos a secuenciación de ADN en ambos sentidos de la cadena del ácido nucleico con un equipo de electroforesis capilar 3730XL empleando el servicio de la Compañía Macrogen Inc. en Corea.

3.1.4 Edición, alineamiento y análisis molecular de las secuencias

Los cromatogramas obtenidos se editaron con el programa BioEdit v7.0.9 (Hall, 1999) para generar la secuencia consenso de cada espécimen. Todas las secuencias fueron alineadas usando el algoritmo ClustalW y luego examinadas visualmente, para asegurar que no existían codones de parada ni mutaciones en el marco de lectura, esto mediante el uso del programa Mega 5. Las secuencias fueron alineadas inicialmente con la secuencia del “genoma de referencia” de *Aedes aegypti* (NC_010241.1) para confirmar la identidad del gen.

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con secuencias de la base de datos de los grupos de investigación PECET-UdeA (Programa de estudio y control de enfermedades tropicales) y GSM-Unal (Grupo de sistemática molecular), y con las secuencias disponibles en las bases de datos GenBank y BOLD Systems, usando la herramienta BlastN para determinar mediante los criterios de máxima identidad, cobertura y puntuación total en el alineamiento múltiple con cuales especies las secuencias analizadas tenían un mayor porcentaje de similitud.

El alineamiento final fue caracterizado en términos de variabilidad nucleotídica y frecuencia de transiciones y transversiones. El número de haplotipos se estimó en el programa DnaSP v5.10.1. Se calcularon las distancias intraespecíficas, se obtuvieron matrices de distancias y se construyeron dendrogramas (Neighbor Joining) bajo el modelo Kimura dos parámetros (K2P) en el programa MEGA 6.0

Se llevó a cabo un análisis adicional usando el software ABGD (Automatic Barcode Gap Discovery) que está disponible para sistemas Linux, se tuvo también la posibilidad de realizar el procesamiento a través del sitio web del fabricante (<http://www.wabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/>) (día de ingreso 10 de julio, 2016), este software permite encontrar el Barcoding-Gap (diferencia entre distancias intraespecíficas y distancias intraespecíficas), además su algoritmo permite delimitar posibles especies, realizando particiones al conjunto de secuencias de acuerdo con su similaridad y las

propone como especies hipotéticas (Puillandre *et al*, 2012) Esto, bajo tres modelos disponibles, K2P (Kimura dos parámetros), JC69 (Jukes Cantor, 1969) y un modelo de sustitución simple. Para este estudio los análisis finales se obtuvieron usando la versión online, y se toman las agrupaciones dadas bajo el modelo K2P.

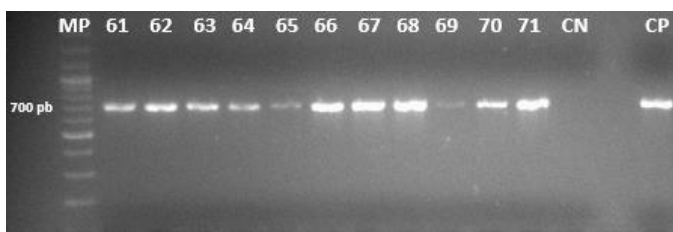
Se incluyeron secuencias disponibles en las bases de datos GenBank y BOLD (visitados en el mes de julio, 2016), con el fin de realizar análisis más profundos a nivel de género.

3.2 Resultados

3.2.1 Secuencias COI obtenidas en este estudio

Se obtuvieron 163 secuencias del fragmento 5' del gen COI, con un tamaño aproximado de 700 pb (Figura 3-1), éstas corresponden a 38 especies morfológicamente identificadas, distribuidas en 12 géneros. Adicionalmente se incluyeron 12 secuencias identificadas a nivel de género (*Lutzomyia (Tricholateralis)*, *Trichophoromyia*, *Psychodopygus* serie *guyanensis* y serie *davisi*), en éstas no se alcanzó el nivel de especie por taxonomía clásica porque las hembras de algunos grupos son indistinguibles. En el caso de *Trichophoromyia*, estos especímenes fueron colectados en una comunidad del municipio de Puerto Nariño (Amazonas) y al parecer es una especie no descrita (tema que fue revisado en el capítulo 2), y en otros grupos los caracteres disponibles no permitieron la confirmación exacta de la especie. En los análisis se tomaron estas secuencias como grupos diferentes, haciendo referencia al género más la terminación sp, aumentando a 43 las especies hipotéticas.

Figura 3-1: Productos de la amplificación por PCR del fragmento 5' del gen COI, en flebotomíneos colectados en la comunidad Tipisca de Puerto Nariño (Amazonas)



Línea M: marcador de peso molecular de 100 pb, 61-71 ADN de flebotomíneos colectados en Puerto Nariño (Amazonas), CN: control negativo, mix de PCR con agua, CP: Control positivo.

En la tabla 3-1 se hace referencia a los detalles de colecta, identificación y códigos de la secuencia por cada espécimen. Todas las secuencias obtenidas en este estudio estarán disponibles tanto en la plataforma del BOLD SYSTEMS (<http://www.boldsystems.org>) como en la base de datos del GenBank.

Tabla 3-1: Códigos de las secuencias COI relacionando especie, localidad y sexo

Especie	Sexo	Departamento	Localidad	Código de secuencia
<i>Br. mesai</i>	M	Amazonas	Puerto Nariño	AMA48.2
<i>Br. mesai</i>	M	Amazonas	Puerto Nariño	AMCT9.3
<i>Br. leopoldoi</i>	M	Caldas	Norcasia	CAL6.2
<i>Mi. trinidadensis</i>	H	Antioquia	Apartado	APAA1.3
<i>Mi. trinidadensis</i>	M	Antioquia	Apartado	APAA1.7
<i>Mi. trinidadensis</i>	H	Antioquia	Apartado	APAA13.1
<i>Mi. trinidadensis</i>	H	Sucre	Ovejas	SOA32
<i>Mi. atroclavata</i>	H	Sucre	Ovejas	SOA34
<i>Mi. atroclavata</i>	M	Sucre	Ovejas	SOA44
<i>Mi. atroclavata</i>	H	Sucre	Ovejas	SOA84
<i>Mi. atroclavata</i>	H	Sucre	Ovejas	SOA97
<i>Mi. cayennensis cayennensis</i>	H	Sucre	Ovejas	SOA36
<i>Mi. cayennensis cayennensis</i>	M	Sucre	Ovejas	SOA67
<i>Mi. cayennensis cayennensis</i>	M	Sucre	Ovejas	SOA69
<i>Mi. cayennensis cayennensis</i>	H	Sucre	Ovejas	SOA70
<i>Mi. micropyga</i>	H	Antioquia	Apartado	APAA16.6
<i>Mi. micropyga</i>	M	Antioquia	Apartado	APAA12.7
<i>Mi. micropyga</i>	M	Sucre	Ovejas	SOA63
<i>Mi. micropyga</i>	H	Sucre	Ovejas	SOA72
<i>Mi. chassigneti</i>	M	Amazonas	Puerto Nariño	AMA48.3
<i>Mi. chassigneti</i>	H	Amazonas	Puerto Nariño	AMA48.4
<i>Mi. chassigneti</i>	H	Amazonas	Leticia	AMCK11-17.7
<i>Sc. sordellii</i>	M	Amazonas	Leticia	AMB18.1
<i>Sc. sordellii</i>	H	Amazonas	Leticia	AMB18.2
<i>Sc. sordellii</i>	M	Amazonas	Leticia	AMCK11-15.1
<i>Sc. preclara</i>	M	Amazonas	Puerto Nariño	AMA2.2

<i>Sc. preclara</i>	H	Amazonas	Puerto Nariño	AMA26.1
<i>Sc. preclara</i>	M	Amazonas	Puerto Nariño	AMA31.1
<i>Sc. preclara</i>	H	Amazonas	Puerto Nariño	AMB3.2
<i>Sc. preclara</i>	H	Amazonas	Puerto Nariño	AMCT9.7
<i>Lu. hartmanni</i>	H	Caldas	Samaná	CAL7.4
<i>Lu. hartmanni</i>	H	Caldas	Victoria	CALB19.3
<i>Lu. hartmanni</i>	M	Caldas	Victoria	CALB27.1
<i>Lu. lichyi</i>	H	Antioquia	Remedios	REM11
<i>Lu. lichyi</i>	H	Antioquia	Remedios	REM12
<i>Lu. bifoliata</i>	H	Caldas	Victoria	CALB21.2
<i>Lu. bifoliata</i>	H	Antioquia	Remedios	REM48
<i>Lu. bifoliata</i>	H	Antioquia	Remedios	REM61
<i>Lu. (Trl) sp</i>	H	Amazonas	Puerto Nariño	AMB8.1
<i>Lu. (Trl) sp</i>	H	Amazonas	Leticia	AMCK18-18.2
<i>Lu. sherlocki</i>	M	Amazonas	Leticia	AMCK18-7.1
<i>Lu. sherlocki</i>	M	Amazonas	Leticia	AMCK18-18.1
<i>Lu. sherlocki</i>	H	Amazonas	Leticia	AMCK11-19.4
<i>Lu. sherlocki</i>	H	Amazonas	Leticia	AMCK11-19.5
<i>Lu. gomezi</i>	H	Sucre	Ovejas	SOA35
<i>Lu. gomezi</i>	H	Antioquia	Remedios	REM7
<i>Lu. gomezi</i>	H	Antioquia	Remedios	REM71
<i>Lu. gomezi</i>	H	Antioquia	Remedios	REM68
<i>Lu. gomezi</i>	H	Magdalena	Santa Marta	SAN1.3
<i>Lu. gomezi</i>	H	Caldas	Samaná	CAL5.3
<i>Pi. evansi</i>	H	Sucre	Ovejas	SOA2
<i>Pi. evansi</i>	H	Sucre	Ovejas	SOA3
<i>Pi. evansi</i>	M	Sucre	Ovejas	SOA5
<i>Pi. evansi</i>	H	Sucre	Ovejas	SOA6
<i>Pi. evansi</i>	M	Sucre	Ovejas	SOA7
<i>Pi. evansi</i>	M	Sucre	Ovejas	SOA10
<i>Pi. evansi</i>	H	Sucre	Ovejas	SOA18
<i>Pi. evansi</i>	M	Sucre	Ovejas	SOA21
<i>Pi. evansi</i>	H	Sucre	Ovejas	SOA24
<i>Pi. evansi</i>	M	Sucre	Ovejas	SOA25
<i>Pi. evansi</i>	M	Sucre	Ovejas	SOA26
<i>Pi. evansi</i>	M	Sucre	Ovejas	SOA27
<i>Pi. evansi</i>	H	Sucre	Ovejas	SOA28
<i>Pi. evansi</i>	H	Sucre	Ovejas	SOA40
<i>Pi. evansi</i>	H	Sucre	Ovejas	SOA41
<i>Pi. evansi</i>	H	Sucre	Ovejas	SOA42
<i>Pi. evansi</i>	M	Sucre	Ovejas	SOA101
<i>Pi. evansi</i>	M	Sucre	Ovejas	SOA110
<i>Pi. rangeliana</i>	H	Sucre	Ovejas	SOA31
<i>Pr. choti</i>	M	Amazonas	Puerto Nariño	AMA54.1
<i>Pr. choti</i>	H	Amazonas	Puerto Nariño	AMA54.2
<i>Pr. choti</i>	H	Amazonas	Puerto Nariño	AMA58.1
<i>Pr. choti</i>	H	Amazonas	Puerto Nariño	AMA67.1
<i>Pr. choti</i>	M	Amazonas	Puerto Nariño	AMA68.1
<i>Pr. choti</i>	M	Amazonas	Puerto Nariño	AMCD13.1
<i>Pr. choti</i>	M	Amazonas	Puerto Nariño	AMCD13.2
<i>Pr. choti</i>	H	Amazonas	Puerto Nariño	AMCP8.1
<i>Pr. camposi</i>	H	Antioquia	Apartadó	APAA2.1
<i>Pr. camposi</i>	M	Caldas	Samaná	CAL28.3
<i>Ty. tiramula</i>	M	Caldas	Samaná	CAL18.3
<i>Ty. tiramula</i>	H	Caldas	Samaná	CAL33.1

<i>Ev. walkeri</i>	H	Amazonas	Puerto Nariño	AMA32.1
<i>Ev. walkeri</i>	M	Amazonas	Leticia	AMA73.1
<i>Ev. walkeri</i>	H	Amazonas	Puerto Nariño	AMCT8.1
<i>Ev. walkeri</i>	M	Amazonas	Puerto Nariño	AMCT8.3
<i>Ev. walkeri</i>	M	Amazonas	Puerto Nariño	AMCT9.6
<i>Ev. walkeri</i>	M	Amazonas	Puerto Nariño	AMCP3.3
<i>Ev. walkeri</i>	H	Amazonas	Leticia	AMCK11-2.1
<i>Ev. georgii</i>	H	Amazonas	Leticia	AMA79.3
<i>Ev. saulensis</i>	H	Amazonas	Puerto Nariño	AMB7.1
<i>Pa. punctigeniculata</i>	M	Amazonas	Leticia	AMCK11-17.1
<i>Pa. punctigeniculata</i>	M	Amazonas	Leticia	AMCK18-5.1
<i>Pa. punctigeniculata</i>	M	Amazonas	Leticia	AMCK18-5.2
<i>Pa. aragaoi</i>	H	Amazonas	Puerto Nariño	AMA53.1
<i>Pa. aragaoi</i>	M	Amazonas	Leticia	AMCK18-17.1
<i>Pa. shannoni</i>	H	Antioquia	Remedios	REM34
<i>Pa. shannoni</i>	H	Antioquia	Remedios	REM67
<i>Pa. dendrophylla</i>	M	Amazonas	Puerto Nariño	AMA48.1
<i>Ps. amazonensis</i>	M	Amazonas	Puerto Nariño	AMB3.1
<i>Ps. serie davisii</i> sp	H	Amazonas	Puerto Nariño	AMCT9.13
<i>Ps. serie guyanensis</i> sp	H	Amazonas	Puerto Nariño	AMA40.1
<i>Ps. hirsutus hirsutus</i>	H	Amazonas	Puerto Nariño	AMA47.2
<i>Ps. hirsutus hirsutus</i>	H	Amazonas	Puerto Nariño	AMA51.1
<i>Ps. panamensis</i>	H	Caldas	Samaná	CAL5.2
<i>Ps. panamensis</i>	M	Caldas	Victoria	CALB24.1
<i>Psychodopygus</i> sp	H	Amazonas	Leticia	AMB9.1
<i>Ps. ayrozai</i>	H	Caldas	Samaná	CAL28.2
<i>Ps. ayrozai</i>	H	Caldas	Samaná	CAL31.2
<i>Ps. ayrozai</i>	M	Caldas	Samaná	CAL33.3
<i>Ny. antunesi</i>	M	Amazonas	Puerto Nariño	AMA4.2
<i>Ny. antunesi</i>	M	Amazonas	Puerto Nariño	AMA8.1
<i>Ny. antunesi</i>	H	Amazonas	Puerto Nariño	AMA8.3
<i>Ny. antunesi</i>	H	Amazonas	Puerto Nariño	AMA10.2
<i>Ny. antunesi</i>	H	Amazonas	Puerto Nariño	AMA10.3
<i>Ny. antunesi</i>	H	Amazonas	Puerto Nariño	AMA22.1
<i>Ny. antunesi</i>	M	Amazonas	Puerto Nariño	AMA45.1
<i>Ny. antunesi</i>	H	Amazonas	Puerto Nariño	AMB1.2
<i>Ny. antunesi</i>	M	Amazonas	Puerto Nariño	AMB11.1
<i>Ny. trapidoi</i>	H	Caldas	Samaná	CAL18.4
<i>Ny. trapido</i>	H	Caldas	Samaná	CALB10.2
<i>Ny. trapido</i>	H	Antioquia	Remedios	REM69
<i>Ny. trapido</i>	H	Antioquia	Remedios	REM72
<i>Ny. yuilli yuilli</i>	H	Antioquia	Remedios	REM66
<i>Ny. yuilli yuilli</i>	M	Caldas	Samaná	CAL7.2
<i>Ny. yuilli yuilli</i>	H	Caldas	Norcasia	CAL14.3
<i>Ny. yuilli yuilli</i>	H	Amazonas	Puerto Nariño	AMA57.1
<i>Ny. yuilli yuilli</i>	H	Amazonas	Leticia	AMA81.2
<i>Ny. yuilli yuilli</i>	H	Amazonas	Leticia	AMCK11-1.3
<i>Ny. yuilli yuilli</i>	H	Amazonas	Leticia	AMCK11-15.2
<i>Ny. yuilli yuilli</i>	H	Amazonas	Leticia	AMCK11-17.2
<i>Ny. yuilli pajoti</i>	H	Amazonas	Puerto Nariño	AMA5.1
<i>Ny. yuilli pajoti</i>	H	Amazonas	Puerto Nariño	AMCT9.1
<i>Ny. yuilli pajoti</i>	H	Amazonas	Puerto Nariño	AMCD5.2
<i>Ny. umbratilis</i>	M	Amazonas	Leticia	AMA75.2
<i>Ny. umbratilis</i>	M	Amazonas	Leticia	AMA79.1
<i>Ny. umbratilis</i>	M	Amazonas	Leticia	AMCK11-17.4

<i>Ny. umbratilis</i>	M	Amazonas	Leticia	AMCK11-17.5
<i>Ny. umbratilis</i>	H	Amazonas	Leticia	AMCK11-17.6
<i>Ny. umbratilis</i>	M	Amazonas	Leticia	AMCK11-19.1
<i>Ny. umbratilis</i>	M	Amazonas	Leticia	AMCK11-19.3
<i>Trichophoromyia</i> sp.	M	Amazonas	Puerto Nariño	AMA2.1
<i>Trichophoromyia</i> sp.	M	Amazonas	Puerto Nariño	AMA3.1
<i>Trichophoromyia</i> sp.	H	Amazonas	Puerto Nariño	AMA4.3
<i>Trichophoromyia</i> sp.	H	Amazonas	Leticia	AMA73.2
<i>Trichophoromyia</i> sp.	M	Amazonas	Puerto Nariño	AMCT8.2
<i>Trichophoromyia</i> sp.	H	Amazonas	Puerto Nariño	AMCT9.8
<i>Trichophoromyia</i> sp.	H	Amazonas	Leticia	AMCK11-2.2
<i>Th. howardi</i>	M	Amazonas	Leticia	AMA75.1
<i>Th. howardi</i>	M	Amazonas	Leticia	AMCK11-15.3

Se incluyeron 12 secuencias pertenecientes a 6 especies (5 géneros), colectadas en cuatro países centroamericanos, con el objetivo de comparar secuencias de la misma especie geográficamente distantes, los detalles de colecta y códigos de estas secuencias aparecen en la tabla 3-2.

Tabla 3-2: Códigos de las secuencias COI de flebotómíneos colectados en Centroamérica relacionando especie, localidad y sexo

Especie	Sexo	País	Localidad	Código de secuencia
<i>Mi. cayennensis cayennensis</i>	H	Panamá	Capira-Ollas arriba	PAN2.3
<i>Lu. longipalpis</i>	M	Honduras	Amapola- El caracol	HON2.4
<i>Lu. longipalpis</i>	M	Honduras	Amapola- El caracol	HON2.10
<i>Pi. evansi</i>	H	Honduras	Amapola- El caracol	HON2.3
<i>Pi. evansi</i>	H	Honduras	Amapola- El caracol	HON2.21
<i>Pi. evansi</i>	H	Nicaragua	León Rota	NIC2.8
<i>Ps. panamensis</i>	H	Costa Rica	San vicente	COR1.1
<i>Ps. panamensis</i>	H	Panamá	Capira-Ollas arriba	PAN3.4
<i>Ps. panamensis</i>	H	Panamá	Capira-Ollas arriba	PAN4.2
<i>Ny. trapidoi</i>	H	Costa Rica	Sibuju	COR4.1
<i>Ny. trapidoi</i>	H	Costa Rica	Sibuju	COR4.2
<i>Ny. ylephiletor</i>	H	Costa Rica	Sibuju	COR7.1

3.2.2 Alineamiento, composición y divergencia nucleotídica

La longitud de las secuencias editadas y alineadas del fragmento 5' del gen COI fue de 601pb (Anexo 3, Figura 3-1), este fragmento corresponde a las posiciones 62 a 662 del gen mitocondrial COI en *Aedes aegypti* (NC_010241.1), usado como genoma de referencia. El segmento secuenciado corresponde al propuesto por Hebert *et al.* (2003) como la región código de barras para la identificación de especies. En el alineamiento no

se evidencian eventos de delección ni de inserción ya que no se observa ningún “gap” (Anexo 3).

El análisis de composición nucleotídica mostró un alto contenido de Adenina y Timina (66.1%), mientras que el contenido de Guanina y Citosina fue 33.9%, esta relación se mantuvo constante en todos los géneros, con pequeños cambios. En cuanto al uso de codones en estas secuencias se observó una clara preferencia por la terminación en A o T, encontrándose cualquiera de estos aminoácidos (A+T) en el 89.2% de las terceras posiciones de las secuencias, seguidamente A+T en segunda posición 55.4% y A+T en primera posición en el 54% de las secuencias.

En el alineamiento de las 163 secuencias, a lo largo de las 601 posiciones nucleotídicas fueron encontrados 346 sitios conservados (58%) y 255 sitios variables (42% de variación).

Del total de las 163 secuencias analizadas se obtuvieron 142 haplotipos, 3 del género *Brumptomyia*, 16 de *Micropygomyia*, 4 de *Sciopemyia*, 18 de *Lutzomyia*, 20 de *Pintomyia*, 4 de *Pressatia*, 2 de *Tryramula*, 9 de *Evandromyia*, 8 de *Psathyromyia*, 13 de *Psychodopygus*, 28 de *Nyssomyia* y 7 de *Trichophoromyia*. El número de haplotipos varió entre 1 y 19 para cada especie, la especie con mayor número de haplotipos fue *Pi. evansi* (19 haplotipos, 21 secuencias); las especies *Mi. trinidadensis*, *Mi. atroclavata*, *Mi. cayennensis*, *Mi. chassigneti*, *Ev. walkeri*, *Pa. punctigeniculata*, *Ps. ayrozai*, *Ny. umbratilis* y *Trichophoromyia sp.*, exhibieron al menos un haplotipo representado por más de una secuencia. En *Ny. yuilli yuilli* se encontró el mismo haplotipo en individuos colectados en diferentes localidades (Norcasia-Caldas y Remedios-Antioquia). Tanto *Sc. preclara* como *Lu. hartmanni* mostraron haplotipos únicos en sus secuencias (n=5 y n=3, respectivamente).

En relación a las diferencias en términos de número y tipo de sustituciones entre los diferentes haplotipos de una misma especie a lo largo del alineamiento, los resultados muestran un rango de 1 a 68 posiciones variables y los cambios nucleotídicos son en su mayoría sustituciones sinónimas tipo transiciones (purina por purina y pirimidina por pirimidina) en las terceras posiciones (Anexo 3 y Tabla 3-3).

Tabla 3-3: Número de haplotipos de la secuencia COI, por especie de flebotomíneo

Especie	N	H	S	Haplotipos COI
<i>Br. mesai</i>	2	2	7	AMA48.2, AMCT9.3
<i>Br. leopoldoi</i>	1	1	0	CAL6.2
<i>Mi. trinidadensis</i>	4	3	15	SOA32, APAA13.1, [APAA1.3, APAA1.7]
<i>Mi. atroclavata</i>	4	3	8	SOA84, SOA97, [SOA34, SOA44]
<i>Mi. cayennensis cayennensis</i>	5	4	27	PAN2.3, SOA69, SOA36, [SOA67, SOA70]
<i>Mi. micropyga</i>	4	4	68	APAA16.6, APAA12.7, SOA63, SOA72
<i>Mi. chassigneti</i>	3	2	8	AMA48.3, [AMA48.4, AMCK11-17.7]
<i>Sc. sordellii</i>	3	3	4	AMB18.1, AMB18.2, AMCK11-15.1
<i>Sc. preclara</i>	5	1	0	[AMA2.2, AMA26.1, AMA31.1, AMB3.2, AMCT9.7]
<i>Lu. hartmanni</i>	3	1	0	[CAL7.4, CALB19.3, CALB27.1]
<i>Lu. lichyi</i>	2	2	1	REM11, REM12
<i>Lu. bifoliata</i>	3	3	5	CALB21.2, REM48, REM61
<i>Lu. longipalpis</i>	2	2	1	HON2.4, HON2.10
<i>Lu. (Trl) sp</i>	2	2	2	AMB8.1, AMCK18-18.2
<i>Lu. sherlocki</i>	4	2	4	AMCK11-19.4, [AMCK11-19.5, AMCK18-7.1, AMCK18-18.1]
<i>Lu. gomezi</i>	6	6	21	SOA35, REM7, REM68, REM71, SAN1.3, CAL5.3
<i>Pi. evansi</i>	21	19	67	HON2.3, HON2.21, NIC2.8, SOA2, SOA21, SOA25, SOA5, SOA10, SOA24, SOA101, SOA28, SOA41, SOA3, SOA26, SOA27, SOA6, SOA7, SOA40, [SOA18, SOA42, SOA110]
<i>Pi. rangelliana</i>	1	1	0	SOA31
<i>Pr. choti</i>	8	2	3	AMA54.2, AMCD13.2, [AMA54.1, AMA58.1, AMA67.1, AMA68.1, AMCD13.1, AMCP8.1]
<i>Pr. camposi</i>	2	2	6	CAL28.3, APAA2.1
<i>Ty. tiramula</i>	2	2	13	CAL18.3, CAL33.1
<i>Ev. dubitans</i>	1	1	0	PAN1.2
<i>Ev. walkeri</i>	7	6	35	AMA73.1, AMCT8.3, AMCK11-2.1, AMCT9.6, AMCP3.3, [AMA32.1, AMCT8.1]
<i>Ev. georgii</i>	1	1	0	AMA79.3
<i>Ev. saulensis</i>	1	1	0	AMB7.1
<i>Pa. carpenteri</i>	1	1	0	CAL3.2
<i>Pa. aragaoi</i>	2	2	3	AMA53.1, AMCK18-17.1
<i>Pa. shannoni</i>	2	2	8	REM34, REM67
<i>Pa. dendrophylla</i>	1	1	0	AMA48.1
<i>Pa. punctigeniculata</i>	3	2	2	AMCK18-5.1, [AMCK18-5.2, AMCK11-17.1]
<i>Ps. hirsutus hirsutus</i>	2	2	6	AMA47.2, AMA51.1
<i>Ps. panamensis</i>	5	5	28	COR1.1, PAN3.4, PAN4.2, CAL5.2, CALB24.1
<i>Psychodopygus sp</i>	1	1	0	AMB9.1
<i>Ps. ayrozai</i>	3	2	1	CAL31.2, [CAL28.2, CAL33.3]
<i>Ps. amazonensis</i>	1	1	0	AMB3.1
<i>Ps. serie davisii</i>	1	1	0	AMCT9.13
<i>Ps. serie guyanensis</i>	1	1	0	AMA40.1
<i>Ny. antunesi</i>	9	7	7	AMA10.3, AMA8.1, AMB11.1, AMA22.1, AMB1.2, AMA45.1, [AMA4.2, AMA8.3, AMA10.2]
<i>Ny. trapidoi</i>	6	6	25	REM69, REM72, CAL18.4, CALB10.2, COR4.1, COR4.2
<i>Ny. yuilli yuilli</i>	8	5	23	AMA57.1, AMA81.2, CAL7.2 [REM66, CAL14.3], [AMCK11-1.3, AMCK11-15.2, AMCK11-17.2]

<i>Ny. yuilli pajoti</i>	3	3	4	AMA5.1, AMCT9.1, AMCD5.2
<i>Ny. ylephiletor</i>	1	1	0	COR7.1
<i>Ny. umbratilis</i>	7	6	8	AMA79.1, AMA75.2, AMCK11-19.1, AMCK11-19.3, AMCK11-17.4, [AMCK11-17.5, AMCK11-17.6]
<i>Th. howardi</i>	2	1	0	[AMA75.1, AMCK11-15.3]
<i>Trichophoromyia</i> sp	7	6	18	AMA73.2, AMA2.1, AMCK11-2.2, AMA4.3, AMCT8.2, [AMA3.1, AMCT9.8]
Total	163	142		

N Número de individuos. **H** Número de haplotipos. **S** Número de sitios variables. Los códigos dentro de [] corresponden a un mismo haplotipo.

Todas las secuencias obtenidas fueron comparadas con los registros disponibles en las bases de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) y BOLD (<http://www.barcodinglife.com/>). Los porcentajes de identidad de las secuencias mayores al 93% fueron considerados como “posible especie”, bajo el concepto MOTU y los resultados previamente obtenidos de diferenciación nucleotídica entre y dentro de especies de flebotomíneos.

Derivado de este análisis se aportaron registros de la secuencia *Barcode* para 12 especies, las cuales no tenían esta secuencia disponible en las bases de datos consultadas (GenBank y BOLD) (Tabla 3-4).

Tabla 3-4: Porcentaje de similitud entre las secuencias del estudio y las publicadas en base de datos

Especie	Código	Especie en GenBank	Query cover	Identidad	Código de acceso GenBank	Sometido por
<i>Br. mesai</i>	AMCT9.3	<i>Br. beaupertuyi</i>	99%	89%	KC921222.1	Contreras /2014
<i>Br. mesai</i>	AMA48.2	<i>Br. beaupertuyi</i>	99%	89%	KC921222.1	Contreras /2014
<i>Br. leopoldoi</i>	CAL6.2	<i>Br. mesai</i>	100%	96%	GU909506.1	Romero /2010
<i>Mi. trinidadensis</i>	APAA1.3	<i>Lu. trinidadensis</i>	100%	99%	KC921306.1	Contreras /2014
<i>Mi. trinidadensis</i>	APAA1.7	<i>Lu. trinidadensis</i>	100%	99%	KC921306.1	Contreras /2014
<i>Mi. trinidadensis</i>	APAA13.1	<i>Lu. trinidadensis</i>	100%	98%	KC921306.1	Contreras /2014
<i>Mi. trinidadensis</i>	SOA32	<i>Lu. trinidadensis</i>	100%	99%	GU909499.1	Romero /2010
<i>Mi. atroclavata</i>	SOA34	<i>Lu. atroclavata</i>	100%	100%	GU909477.1	Romero /2010
<i>Mi. atroclavata</i>	SOA44	<i>Lu. atroclavata</i>	100%	100%	GU909477.1	Romero /2010
<i>Mi. atroclavata</i>	SOA84	<i>Lu. atroclavata</i>	100%	99%	GU909477.1	Romero /2010
<i>Mi. atroclavata</i>	SOA97	<i>Lu. atroclavata</i>	100%	99%	GU909477.1	Romero /2010
<i>Mi. cayennensis cayennensis</i>	SOA36	<i>Lu. cayennensis cayennensis</i>	100%	99%	GU909472.1	Romero /2010
<i>Mi. cayennensis cayennensis</i>	SOA67	<i>Lu. cayennensis cayennensis</i>	100%	100%	GU909472.1	Romero /2010
<i>Mi. cayennensis cayennensis</i>	SOA69	<i>Lu. cayennensis cayennensis</i>	100%	99%	GU909472.1	Romero /2010
<i>Mi. cayennensis cayennensis</i>	SOA70	<i>Lu. cayennensis cayennensis</i>	100%	100%	GU909472.1	Romero /2010
<i>Mi. cayennensis cayennensis</i>	PAN2.3	<i>Lu. cayennensis cayennensis</i>	88%	99%	JN845561.1	Contreras /2011
<i>Mi. micropyga</i>	APAA16.	<i>Lu. atroclavata</i>	99%	91%	GU909480.1	Romero /2010

	6					
<i>Mi. micropyga</i>	APAA12.7	<i>Lu. atroclavata</i>	99%	90%	GU909480.1	Romero /2010
<i>Mi. micropyga</i>	SOA63	<i>Lu. micropyga</i>	100%	99%	GU909465.1	Romero /2010
<i>Mi. micropyga</i>	SOA72	<i>Lu. micropyga</i>	100%	100%	GU909465.1	Romero /2010
<i>Mi. chassigneti</i>	AMA48.3	<i>Lu. atroclavata</i>	99%	89%	GU909479.1	Romero /2010
<i>Mi. chassigneti</i>	AMA48.4	<i>Lu. atroclavata</i>	99%	89%	GU909480.1	Romero /2010
<i>Mi. chassigneti</i>	AMCK11-17.7	<i>Lu. atroclavata</i>	99%	89%	GU909480.1	Romero /2010
<i>Sc. sordellii</i>	AMB18.1	<i>Lu. sordellii</i>	100%	92%	KC921298.1	Contreras /2014
<i>Sc. sordellii</i>	AMB18.2	<i>Lu. sordellii</i>	100%	92%	KC921298.1	Contreras /2014
<i>Sc. sordellii</i>	AMCK11-15.1	<i>Lu. sordellii</i>	100%	92%	KC921298.1	Contreras /2014
<i>Sc. preclara</i>	AMA2.2	<i>Sciopemyia sp.</i>	99%	97%	KP113045.1	Pinto /2015
<i>Sc. preclara</i>	AMA26.1	<i>Sciopemyia sp.</i>	99%	97%	KP113045.1	Pinto /2015
<i>Sc. preclara</i>	AMB3.2	<i>Sciopemyia sp.</i>	99%	97%	KP113045.1	Pinto /2015
<i>Sc. preclara</i>	AMCT9.7	<i>Sciopemyia sp.</i>	99%	97%	KP113045.1	Pinto /2015
<i>Lu. hartmanni</i>	CAL7.4	<i>Lu. hartmanni</i>	100%	100%	KC921257.1	Contreras /2014
<i>Lu. hartmanni</i>	CALB19.3	<i>Lu. hartmanni</i>	100%	100%	KC921257.1	Contreras /2014
<i>Lu. hartmanni</i>	CALB27.1	<i>Lu. hartmanni</i>	100%	100%	KC921257.1	Contreras /2014
<i>Lu. lichyi</i>	REM11	<i>Lu. lichyi</i>	100%	98%	KC921259.1	Contreras /2014
<i>Lu. lichyi</i>	REM12	<i>Lu. lichyi</i>	100%	98%	KC921259.1	Contreras /2014
<i>Lu. bifoliata</i>	CALB21.2	<i>Lu. bifoliata</i>	100%	99%	KC921232.1	Contreras /2014
<i>Lu. bifoliata</i>	REM48	<i>Lu. bifoliata</i>	100%	99%	KC921232.1	Contreras /2014
<i>Lu. bifoliata</i>	REM61	<i>Lu. bifoliata</i>	100%	100%	KC921232.1	Contreras /2014
<i>Lu. longipalpis</i>	HON2.4	<i>Lu. longipalpis</i>	99%	94%	KP112581.1	Pinto /2015
<i>Lu. longipalpis</i>	HON2.10	<i>Lu. longipalpis</i>	98%	94%	KP112586.1	Pinto /2015
<i>Lutzomyia (Trl)sp</i>	AMB8.1	<i>Lu. longipalpis</i>	99%	88%	KP112586.1	Pinto /2015
<i>Lutzomyia (Trl)sp</i>	AMCK18-18.2	<i>Lu. longipalpis</i>	99%	88%	KP112586.1	Pinto /2015
<i>Lu. sherlocki</i>	AMCK18-7.1	<i>Lu. gomezi</i>	99%	89%	KC921251.1	Contreras /2014
<i>Lu. sherlocki</i>	AMCK11-19.4	<i>Lu. gomezi</i>	99%	89%	KC921251.1	Contreras /2014
<i>Lu. sherlocki</i>	AMCK11-19.5	<i>Lu. gomezi</i>	99%	89%	KC921251.1	Contreras /2014
<i>Lu. gomezi</i>	SOA35	<i>Lu. gomezi</i>	100%	99%	KC921250.1	Contreras /2014
<i>Lu. gomezi</i>	REM7	<i>Lu. gomezi</i>	100%	100%	GU909452.1	Romero /2010
<i>Lu. gomezi</i>	REM68	<i>Lu. gomezi</i>	100%	99%	KC921250.1	Contreras /2014
<i>Lu. gomezi</i>	REM71	<i>Lu. gomezi</i>	100%	99%	KC921248.1	Contreras /2014
<i>Lu. gomezi</i>	SAN1.3	<i>Lu. gomezi</i>	100%	99%	KC921248.1	Contreras /2014
<i>Lu. gomezi</i>	CAL5.3	<i>Lu. gomezi</i>	100%	100%	KC921247.1	Contreras /2014
<i>Pi. evansi</i>	HON2.3	<i>Lu. evansi</i>	99%	93%	GU909459.1	Romero /2010
<i>Pi. evansi</i>	HON2.21	<i>Lu. evansi</i>	99%	93%	GU909459.1	Romero /2010
<i>Pi. evansi</i>	NIC2.8	<i>Lu. evansi</i>	99%	93%	GU909459.1	Romero /2010
<i>Pi. evansi</i>	SOA2	<i>Lu. evansi</i>	100%	98%	GU909459.1	Romero /2010
<i>Pi. evansi</i>	SOA3	<i>Lu. evansi</i>	99%	99%	GU909459.1	Romero /2010
<i>Pi. evansi</i>	SOA5	<i>Lu. evansi</i>	100%	99%	GU909458.1	Romero /2010
<i>Pi. evansi</i>	SOA6	<i>Lu. evansi</i>	100%	99%	GU909458.1	Romero /2010
<i>Pi. evansi</i>	SOA7	<i>Lu. evansi</i>	100%	99%	GU909458.1	Romero /2010
<i>Pi. evansi</i>	SOA10	<i>Lu. evansi</i>	100%	99%	GU909458.1	Romero /2010
<i>Pi. evansi</i>	SOA18	<i>Lu. evansi</i>	100%	99%	GU909458.1	Romero /2010
<i>Pi. evansi</i>	SOA21	<i>Lu. evansi</i>	100%	99%	GU909458.1	Romero /2010
<i>Pi. evansi</i>	SOA24	<i>Lu. evansi</i>	100%	99%	GU909458.1	Romero /2010
<i>Pi. evansi</i>	SOA25	<i>Lu. evansi</i>	100%	98%	GU909458.1	Romero /2010
<i>Pi. evansi</i>	SOA26	<i>Lu. evansi</i>	100%	99%	GU909458.1	Romero /2010
<i>Pi. evansi</i>	SOA27	<i>Lu. evansi</i>	100%	99%	GU909458.1	Romero /2010
<i>Pi. evansi</i>	SOA28	<i>Lu. evansi</i>	100%	99%	GU909458.1	Romero /2010

<i>Pi. evansi</i>	SOA40	<i>Lu. evansi</i>	100%	99%	GU909458.1	Romero /2010
<i>Pi. evansi</i>	SOA41	<i>Lu. evansi</i>	100%	98%	GU909458.1	Romero /2010
<i>Pi. evansi</i>	SOA42	<i>Lu. evansi</i>	100%	99%	GU909458.1	Romero /2010
<i>Pi. evansi</i>	SOA101	<i>Lu. evansi</i>	100%	99%	GU909458.1	Romero /2010
<i>Pi. evansi</i>	SOA110	<i>Lu. evansi</i>	100%	99%	GU909458.1	Romero /2010
<i>Pi. rangeliana</i>	SOA31	<i>Lu. rangeliana</i>	100%	100%	GU909493.1	Romero /2010
<i>Pr. choti</i>	AMA54.1	<i>Pr. choti</i>	100%	99%	KP112892.1	Pinto /2015
<i>Pr. choti</i>	AMA54.2	<i>Pr. choti</i>	100%	99%	KP112892.1	Pinto /2015
<i>Pr. choti</i>	AMA58.1	<i>Pr. choti</i>	100%	99%	KP112892.1	Pinto /2015
<i>Pr. choti</i>	AMA67.1	<i>Pr. choti</i>	100%	99%	KP112892.1	Pinto /2015
<i>Pr. choti</i>	AMA68.1	<i>Pr. choti</i>	100%	99%	KP112892.1	Pinto /2015
<i>Pr. choti</i>	AMCD13.1	<i>Pr. choti</i>	100%	99%	KP112892.1	Pinto /2015
<i>Pr. choti</i>	AMCD13.2	<i>Pr. choti</i>	100%	99%	KP112892.1	Pinto /2015
<i>Pr. choti</i>	AMCP8.1	<i>Pr. choti</i>	100%	99%	KP112892.1	Pinto /2015
<i>Pr. camposi</i>	APAA2.1	<i>Pr. camposi</i>	93%	99%	KT906090.1	Cevallos /2015
<i>Pr. camposi</i>	CAL28.3	<i>Pr. camposi</i>	93%	99%	KT906090.1	Cevallos /2015
<i>Ty. triramula</i>	CAL18.3	<i>Lu. triramula</i>	100%	99%	KC921314.1	Contreras /2014
<i>Ty. triramula</i>	CAL33.1	<i>Lu. triramula</i>	100%	98%	KC921314.1	Contreras /2014
<i>Ev. dubitans</i>	PAN1.2	<i>Ev. dubitans</i>	100%	99%	GU909447.1	Romero /2010
<i>Ev. walkeri</i>	AMA32.1	<i>Lu. walkeri</i>	100%	98%	FJ437286.1	Cohnstaedt /2011
<i>Ev. walkeri</i>	AMA73.1	<i>Lu. walkeri</i>	100%	98%	FJ437286.1	Cohnstaedt /2011
<i>Ev. walkeri</i>	AMCT8.1	<i>Lu. walkeri</i>	100%	98%	FJ437286.1	Cohnstaedt /2011
<i>Ev. walkeri</i>	AMCT8.3	<i>Lu. walkeri</i>	100%	98%	FJ437286.1	Cohnstaedt /2011
<i>Ev. walkeri</i>	AMCT9.6	<i>Lu. walkeri</i>	100%	98%	FJ437286.1	Cohnstaedt /2011
<i>Ev. walkeri</i>	AMCK11-2.1	<i>Lu. walkeri</i>	100%	97%	FJ437286.1	Cohnstaedt /2011
<i>Ev. walkeri</i>	AMCP3.3	<i>Lu. walkeri</i>	99%	95%	FJ437286.1	Cohnstaedt /2011
<i>Ev. georgii</i>	AMA79.3	<i>Lu. micropyga</i>	99%	85%	GU909465.1	Romero /2010
<i>Ev. saulensis</i>	AMB7.1	<i>Lu. micropyga</i>	99%	87%	GU909466.1	Romero /2010
<i>Pa. punctigeniculata</i>	AMCK18-5.1	<i>Pa. pascalei</i>	98%	91%	KP112948.1	Pinto /2015
<i>Pa. punctigeniculata</i>	AMCK18-5.2	<i>Pa. pascalei</i>	98%	91%	KP112948.1	Pinto /2015
<i>Pa. punctigeniculata</i>	AMCK11-17.1	<i>Pa. pascalei</i>	98%	91%	KP112948.1	Pinto /2015
<i>Pa. carpenteri</i>	CAL3.2	<i>Lu. carpenteri</i>	100%	100%	KC921235.1	Contreras /2014
<i>Pa. aragaoi</i>	AMCK18-17.1	<i>Lu. aragaoi</i>	99%	91%	KC921231.1	Contreras /2014
<i>Pa. aragaoi</i>	AMA53.1	<i>Lu. aragaoi</i>	99%	91%	KC921231.1	Contreras /2014
<i>Pa. shannoni</i>	REM34	<i>Lu. shannoni</i>	100%	99%	GU909469.1	Romero /2010
<i>Pa. shannoni</i>	REM67	<i>Lu. shannoni</i>	100%	99%	GU909469.1	Romero /2010
<i>Pa. dendrophyla</i>	AMA48.1	<i>Lu. shannoni</i>	99%	92%	KP112930.1	Pinto /2015
<i>Ps. serie davisii</i>	AMCT9.13	<i>Ps. davisii</i>	100%	99%	KP112969.1	Pinto /2015
<i>Ps. amazonensis</i>	AMB3.1	<i>Ps. davisii</i>	100%	96%	KP112970.1	Pinto /2015
<i>Ps. serie guyanensis</i> sp	AMA40.1	<i>Lu. guyanensis</i>	91%	97%	GU001736.1	Azpuruu /2010
<i>Ps. hirsutus hirsutus</i>	AMA47.2	<i>Ps. hirsutus hirsutus</i>	99%	97%	KP112991.1	Pinto /2015
<i>Ps. hirsutus hirsutus</i>	AMA51.1	<i>Ps. hirsutus hirsutus</i>	100%	97%	KP112991.1	Pinto /2015
<i>Ps. panamensis</i>	COR1.1	<i>Lu. panamensis</i>	100%	99%	GU909460.1	Romero /2010
<i>Ps. panamensis</i>	PAN3.4	<i>Lu. panamensis</i>	100%	98%	GU909460.1	Romero /2010
<i>Ps. panamensis</i>	PAN4.2	<i>Lu. panamensis</i>	100%	99%	GU909460.1	Romero /2010
<i>Ps. panamensis</i>	CAL5.2	<i>Ps. panamensis</i>	100%	99%	KC921262.1	Contreras /2014

<i>Ps. panamensis</i>	CLAB24.1	<i>Ps. panamensis</i>	100%	99%	KC921262.1	Contreras /2014
<i>Psychodopygus</i> sp	AMB9.1	<i>Ps. ayrozai</i>	98%	94%	KP112967.1	Pinto /2015
<i>Ps. ayrozai</i>	CAL28.2	<i>Ps. ayrozai</i>	98%	93%	KP112967.1	Pinto /2015
<i>Ps. ayrozai</i>	CAL31.2	<i>Ps. ayrozai</i>	98%	94%	KP112967.1	Pinto /2015
<i>Ps. ayrozai</i>	CAL33.3	<i>Ps. ayrozai</i>	98%	93%	KP112967.1	Pinto /2015
<i>Ny. antunesi</i>	AMA4.2	<i>Lu. umbratilis</i>	100%	98%	KF467559.1	Scarpassa /2013
<i>Ny. antunesi</i>	AMA8.1	<i>Lu. umbratilis</i>	100%	98%	KF467559.1	Scarpassa /2013
<i>Ny. antunesi</i>	AMA8.3	<i>Lu. umbratilis</i>	100%	98%	KF467559.1	Scarpassa /2013
<i>Ny. antunesi</i>	AMA10.2	<i>Lu. umbratilis</i>	100%	98%	KF467559.1	Scarpassa /2013
<i>Ny. antunesi</i>	AMA10.3	<i>Lu. umbratilis</i>	100%	98%	KF467559.1	Scarpassa /2013
<i>Ny. antunesi</i>	AMB11.1	<i>Lu. umbratilis</i>	100%	98%	KF467559.1	Scarpassa /2013
<i>Ny. antunesi</i>	AMB22.1	<i>Lu. umbratilis</i>	100%	98%	KF467559.1	Scarpassa /2013
<i>Ny. antunesi</i>	AMA45.1	<i>Lu. umbratilis</i>	100%	98%	KF467559.1	Scarpassa /2013
<i>Ny. antunesi</i>	AMB1.2	<i>Lu. umbratilis</i>	100%	98%	KF467559.1	Scarpassa /2013
<i>Ny. trapidoi</i>	REM69	<i>Lu. trapidoi</i>	100%	99%	KC921302.1	Contreras /2014
<i>Ny. trapidoi</i>	REM72	<i>Lu. trapidoi</i>	100%	99%	KC921302.1	Contreras /2014
<i>Ny. trapidoi</i>	CAL18.4	<i>Lu. trapidoi</i>	100%	99%	KC921302.1	Contreras /2014
<i>Ny. trapidoi</i>	CALB10.2	<i>Lu. trapidoi</i>	100%	98%	KC921302.1	Contreras /2014
<i>Ny. trapidoi</i>	COR4.1	<i>Lu. trapidoi</i>	100%	98%	KC921302.1	Contreras /2014
<i>Ny. trapidoi</i>	COR4.2	<i>Lu. trapidoi</i>	100%	98%	KC921302.1	Contreras /2014
<i>Ny. yuilli yuilli</i>	REM66	<i>Lu. yuilli yuilli</i>	100%	100%	KC921319.1	Contreras /2014
<i>Ny. yuilli yuilli</i>	CAL7.2	<i>Lu. yuilli yuilli</i>	100%	99%	KC921319.1	Contreras /2014
<i>Ny. yuilli yuilli</i>	CAL14.3	<i>Lu. yuilli yuilli</i>	100%	100%	KC921319.1	Contreras /2014
<i>Ny. yuilli yuilli</i>	AMA57.1	<i>Lu. yuilli yuilli</i>	100%	97%	KC921319.1	Contreras /2014
<i>Ny. yuilli yuilli</i>	AMA81.2	<i>Lu. yuilli yuilli</i>	100%	97%	KC921319.1	Contreras /2014
<i>Ny. yuilli yuilli</i>	AMCK11-1.3	<i>Lu. yuilli yuilli</i>	100%	97%	KC921319.1	Contreras /2014
<i>Ny. yuilli yuilli</i>	AMCK11-15.2	<i>Lu. yuilli yuilli</i>	100%	97%	KC921319.1	Contreras /2014
<i>Ny. yuilli yuilli</i>	AMCK11-17.2	<i>Lu. yuilli yuilli</i>	100%	97%	KC921319.1	Contreras /2014
<i>Ny. yuilli pajoti</i>	AMA5.1	<i>Lu. umbratilis</i>	100%	97%	KF467559.1	Scarpassa /2013
<i>Ny. yuilli pajoti</i>	AMCD5.2	<i>Lu. umbratilis</i>	100%	97%	KF467559.1	Scarpassa /2013
<i>Ny. yuilli pajoti</i>	AMCT9.1	<i>Lu. umbratilis</i>	100%	97%	KF467559.1	Scarpassa /2013
<i>Ny. ylephiletor</i>	COR7.1	<i>Lu. trapidoi</i>	99%	91%	KC921304.1	Contreras /2014
<i>Ny. umbratilis</i>	AMA75.2	<i>Lu. umbratilis</i>	100%	99%	KF467543.1	Scarpassa /2013
<i>Ny. umbratilis</i>	AMA79.1	<i>Lu. umbratilis</i>	100%	99%	KF467543.1	Scarpassa /2013
<i>Ny. umbratilis</i>	AMCK11-17.4	<i>Lu. umbratilis</i>	100%	99%	KF467543.1	Scarpassa /2013
<i>Ny. umbratilis</i>	AMCK11-17.5	<i>Lu. umbratilis</i>	100%	99%	KF467543.1	Scarpassa /2013
<i>Ny. umbratilis</i>	AMCK11-17.6	<i>Lu. umbratilis</i>	100%	99%	KF467543.1	Scarpassa /2013
<i>Ny. umbratilis</i>	AMCK11	<i>Lu. umbratilis</i>	100%	99%	KF467543.1	Scarpassa

	-19.1					/2013
<i>Ny. umbratilis</i>	AMCK11 -19.3	<i>Lu. umbratilis</i>	100%	99%	KF467543.1	Scarpassa /2013
<i>Trichophoromyia</i> <i>sp</i>	AMA2.1	<i>Th.</i> <i>viannamartinsi</i>	100%	95%	KP113057.1	Pinto /2015
<i>Trichophoromyia</i> <i>sp</i>	AMA3.1	<i>Th.</i> <i>viannamartinsi</i>	100%	96%	KP113057.1	Pinto /2015
<i>Trichophoromyia</i> <i>sp</i>	AMA4.3	<i>Th.</i> <i>viannamartinsi</i>	100%	95%	KP113057.1	Pinto /2015
<i>Trichophoromyia</i> <i>sp</i>	AMA73.2	<i>Th.</i> <i>viannamartinsi</i>	100%	96%	KP113057.1	Pinto /2015
<i>Trichophoromyia</i> <i>sp</i>	AMCT8.2	<i>Th.</i> <i>viannamartinsi</i>	100%	95%	KP113057.1	Pinto /2015
<i>Trichophoromyia</i> <i>sp</i>	AMCT9.8	<i>Th.</i> <i>viannamartinsi</i>	100%	96%	KP113057.1	Pinto /2015
<i>Trichophoromyia</i> <i>sp</i>	AMCK11 -2.2	<i>Th.</i> <i>viannamartinsi</i>	100%	95%	KP113057.1	Pinto /2015
<i>Th. howardi</i>	AMA75.1	<i>Th.</i> <i>viannamartinsi</i>	100%	96%	KP113057.1	Pinto /2015
<i>Th. howardi</i>	AMCK11 -15.3	<i>Th.</i> <i>viannamartinsi</i>	100%	96%	KP113057.1	Pinto /2015

Nota: Se presentan en negrita las especies que no contaban con registro en las bases de datos.

3.2.3 Divergencia a nivel intraespecífico

Los porcentajes de divergencia intraespecífica estuvieron entre 0 y 2% (Tabla 3-5), con dos excepciones, *Mi. micropyga* que presentó una variación media de 8.2% y una máxima de 12.3%. En la Tabla 3-6 se comparan las secuencias obtenidas de esta especie, con las secuencias disponibles en el GenBank, sin embargo, las secuencias disponibles son únicamente de una de las zonas del estudio (Sucre), encontrándose una clara diferencia con los haplotipos APAA12.6 y APAA12.7 del departamento de Antioquia (Apartadó).

Para la especie *Pi. evansi*, aunque la media se mantuvo dentro de los límites sugeridos a nivel intraespecífico (2.9%), la distancia máxima alcanzó valores de 8.9%. Estos valores se alcanzaron cuando se compararon los haplotipos obtenidos a partir de especímenes colectados en Ovejas (Sucre), con los obtenidos a partir de especímenes provenientes de países centroamericanos (Honduras y Nicaragua) (Tabla3-5). Al incluir otras secuencias en el análisis (Tabla 3-7) el resultado se mantiene ya que en las bases de datos (GenBank y BOLD Systems), sólo están reportados haplotipos colombianos de esta especie.

Tabla 3-5: Divergencia intraespecífica bajo el modelo K2P, entre secuencias del gen COI en flebotómíneos

Especie	No. de individuos	Distancia K2P*
<i>Br. mesai</i>	2	0.010 (0.000-0.012)
<i>Br. leopoldoi</i>	1	NA
<i>Mi. trinidadensis</i>	4	0.013 (0.000-0.026)
<i>Mi. atroclavata</i>	4	0.007 (0.000-0.013)
<i>Mi. cayennensis cayennensis</i>	5	0.019 (0.000-0.047)
<i>Mi. micropyga</i>	4	0.082 (0.002-0.123)
<i>Mi. micropyga</i> Apartado	2	0.002 (0.000-0.002)
<i>Mi. micropyga</i> Ovejas	2	0.002 (0.000-0.002)
<i>Mi. chassigneti</i>	3	0.009 (0.000-0.013)
<i>Sc. sordellii</i>	3	0.005 (0.002-0.007)
<i>Sc. preclara</i>	5	0.000
<i>Lu. hartmanni</i>	3	0.000
<i>Lu. lichyi</i>	2	0.000
<i>Lu. bifoliata</i>	3	0.006 (0.003-0.008)
<i>Lu. longipalpis</i>	2	0.005 (0.000-0.005)
<i>Lu. (Trl) sp.</i>	2	0.003 (0.000-0.003)
<i>Lu. sherlocki</i>	4	0.003 (0.000-0.007)
<i>Lu. gomezi</i>	6	0.017 (0.002-0.026)
<i>Pi. evansi</i>	21	0.029 (0.000-0.089)
<i>Pi. evansi</i> Honduras	2	0.005 (0.000-0.005)
<i>Pi. evansi</i> Ovejas	18	0.012 (0.000-0.024)
<i>Pi. evansi</i> Honduras-Nicaragua	3	0.006 (0.005-0.007)
<i>Pi. rangeliana</i>	1	NA
<i>Pr. choti</i>	8	0.001 (0.000-0.003)
<i>Pr. camposi</i>	2	0.014 (0.000-0.013)
<i>Ty. triramula</i>	2	0.023 (0.000-0.022)
<i>Ev. dubitans</i>	1	NA
<i>Ev. walkeri</i>	7	0.019 (0.000-0.059)
<i>Ev. georgii</i>	1	NA
<i>Ev. saulensis</i>	1	NA
<i>Pa. carpenteri</i>	1	NA
<i>Pa. aragaoi</i>	2	0.005 (0.000-0.050)
<i>Pa. shannoni</i>	2	0.014 (0.000-0.013)
<i>Pa. dendrophyla</i>	1	NA
<i>Pa. punctigeniculata</i>	3	0.002 (0.000-0.003)
<i>Ps. serie davisii</i>	1	NA
<i>Ps. amazonensis</i>	1	NA
<i>Ps. panamensis</i>	5	0.023 (0.002-0.034)
<i>Ps. hirsutus hirsutus</i>	2	0.010 (0.000-0.010)
<i>Ps. ayrozai</i>	3	0.001 (0.000-0.002)
<i>Ps. serie guyanensis</i>	1	NA
<i>Psychodopygus</i> sp	1	NA
<i>Ny. antunesi</i>	9	0.003 (0.000-0.007)
<i>Ny. trapidoi</i>	6	0.018 (0.000-0.027)
<i>Ny. yuilli yuilli</i>	8	0.019 (0.000-0.034)
<i>Ny. yuilli pajoti</i>	3	0.005 (0.002-0.007)
<i>Ny. ylephiletor</i>	1	NA
<i>Ny. umbratilis</i>	7	0.005 (0.000-0.008)
<i>Th. howardi</i>	2	0.000
<i>Trichophoromyia</i> sp	7	0.011 (0.000-0.024)

*El valor por fuera de () corresponde a la media y los valores dentro de () corresponden al rango de menor y mayor distancia

Tabla 3-6: Distancias genéticas K2P entre secuencias parciales del gen COI de *Mi. micropyga*

Códigos de las secuencias	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]	[8]	[9]
[1] GU909466.1 _Lutzomyia_micropyga		0,002	0,002	0,003	0,002	0,003	0,002	0,016	0,016
[2] GU909465.1 _Lutzomyia_micropyga	0,002		0,000	0,002	0,000	0,002	0,000	0,016	0,016
[3] KR907856.1 _Micropygomyia_micropyga	0,002	0,000		0,002	0,000	0,002	0,000	0,016	0,016
[4] KR907857.1 _Micropygomyia_micropyga	0,006	0,004	0,004		0,002	0,003	0,002	0,016	0,016
[5] GU909464.1 _Lutzomyia_micropyga	0,002	0,000	0,000	0,004		0,002	0,000	0,016	0,016
[6] Mi_micropyga_SOA63	0,004	0,002	0,002	0,006	0,002		0,002	0,016	0,016
[7] Mi_micropyga_SOA72	0,002	0,000	0,000	0,004	0,000	0,002		0,016	0,016
[8] Mi_micropyga_APAA12.6	0,120	0,122	0,122	0,126	0,122	0,120	0,122		0,002
[9] Mi_micropyga_APAA12.7	0,118	0,120	0,120	0,124	0,120	0,118	0,120	0,002	

Los valores en rojo corresponden a las distancias entre las secuencias de esta especie obtenidas en el departamento Antioquia comparados con las obtenidas en el departamento de Sucre.

Tabla 3-7: Distancias genéticas K2P entre secuencias parciales del gen COI de *Pi. evansi*

Códigos de las secuencias	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]	[8]	[9]	[10]	[11]	[12]
[2] GB: GU909456.1		0,005	0,005	0,006	0,004	0,005	0,006	0,006	0,005	0,012	0,012	0,012
[3] GB: GU909457.1	0,013		0,003	0,003	0,003	0,004	0,006	0,005	0,003	0,011	0,012	0,011
[4] GB: GU909458.1	0,017	0,007		0,004	0,004	0,004	0,005	0,004	0,003	0,011	0,012	0,011
[5] Pi_evansi_SOA26	0,020	0,007	0,010		0,004	0,005	0,006	0,005	0,004	0,011	0,012	0,011
[6] Pi_evansi_SOA27	0,012	0,005	0,008	0,012		0,003	0,005	0,004	0,003	0,011	0,011	0,010
[7] Pi_evansi_SOA28	0,019	0,012	0,012	0,015	0,007		0,006	0,005	0,004	0,011	0,011	0,010
[8] Pi_evansi_SOA2	0,024	0,020	0,020	0,024	0,019	0,022		0,005	0,005	0,012	0,013	0,012
[9] Pi_evansi_SOA3	0,020	0,013	0,010	0,017	0,012	0,015	0,017		0,003	0,011	0,011	0,011
[10] Pi_evansi_SOA40	0,013	0,007	0,007	0,010	0,005	0,008	0,017	0,007		0,011	0,011	0,011
[11] Pi_evansi_HON2.21	0,081	0,078	0,078	0,082	0,072	0,072	0,083	0,070	0,074		0,003	0,003
[12] Pi_evansi_HON2.3	0,083	0,080	0,080	0,083	0,074	0,074	0,089	0,076	0,076	0,005		0,003
[13] Pi_evansi_NIC2.8	0,080	0,072	0,072	0,076	0,066	0,066	0,085	0,072	0,072	0,005	0,007	

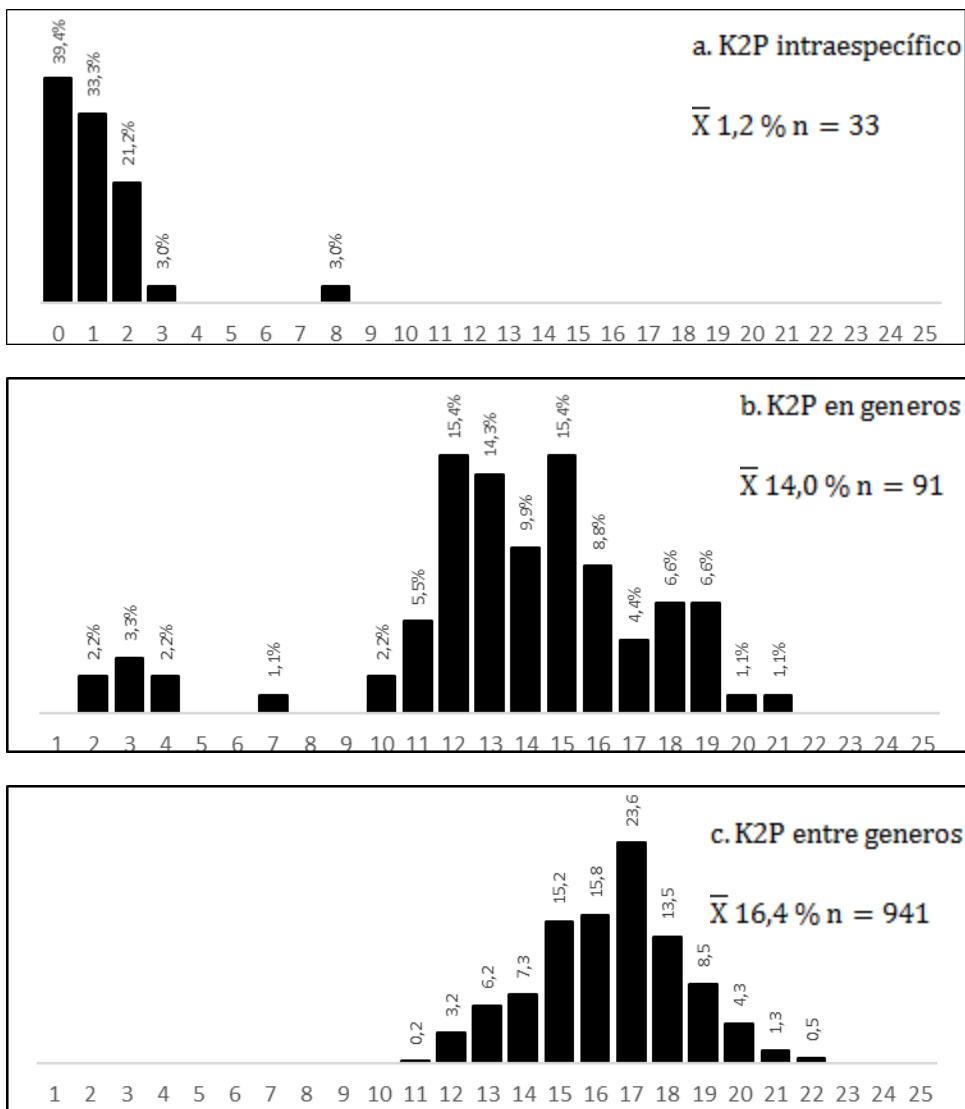
Los valores en rojo corresponden a las distancias entre las secuencias de Centroamérica y las de Colombia.

3.2.4 Divergencia a nivel interespecífico

Las 43 especies de flebotomíneos exhibieron secuencias COI claramente diferentes; es decir, en ningún caso dos especies compartieron una misma secuencia. Sin embargo, solo fue posible calcular la distancia intraespecífica para 33 especies, para las cuales se dispuso de más de un representante por especie. Con las excepciones ya mencionadas sobre las especies *Mi. micropyga* y *Pi. evansi* (Tablas 3-5, 3-6 y 3-7), se encuentran diferencias claras entre las distancias intra e interespecíficas (dentro de un mismo género), siendo esta última 11 veces mayor que la distancia intraespecífica (con medias de 1,2% y 14,0% respectivamente). Cuando se hallaron las distancias interespecíficas dentro de un mismo género, se encontraron seis especies dentro de 2 géneros que exhibieron distancias interespecíficas por debajo del 4%, (Figura3-2), esto se observa gráficamente en el cuadrante III de la figura 3-3.

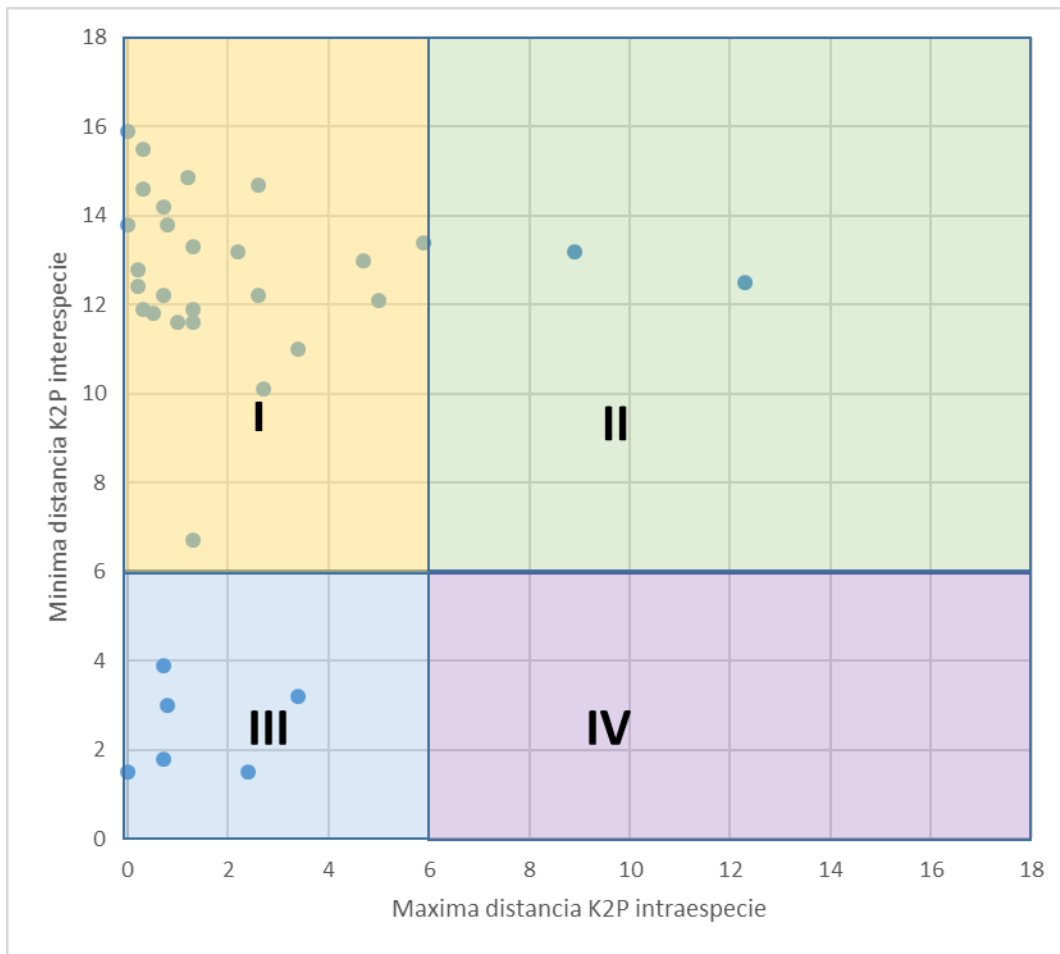
Aunque algunos géneros no parecen estar resueltos con estos análisis (distancias interespecíficas muy bajas), los dendrogramas Neighbor joining (NJ) obtenidos generalmente coinciden con la taxonomía actual por morfología (Figuras 3-3, a 3-15).

Figura 3-2: Comparación de secuencias del gen COI entre 43 especies de flebotomíneos de zonas de importancias médica



Las comparaciones pareadas entre las 163 secuencias parciales del gen COI fueron separadas en tres categorías: a. diferencias entre individuos de la misma especie, b. diferencias entre individuos del mismo género (sin incluir las distancias intraespecificas), y c. diferencias entre individuos de la misma subfamilia (sin incluir las distancias intraespecificas ni las distancias entre el mismo género)

Figura 3-3: Comparación entre las distancias K2P intraespecie e interespecie en flebotomíneos de Colombia



En este análisis solo se incluyeron las especies donde fue posible hacer la comparación, esto es aquellas con más de un representante ($n = 33$). La variación intraespecífica máxima se comparó con la diferencia interespecífica mínima. Con fines ilustrativos el gráfico fue dividido en cuadrantes, 6,0% se eligió como punto de corte entre los valores habituales para la variación intra e interespecífica en flebotomíneos (Contreras *et al*, 2014; Azpurua *et al*, 2010). Los cuadrantes representan diferentes categorías de especies: (I) la distancia intraespecífica, $\leq 6\%$; distancia interespecífica, $\geq 6\%$: concordante con la taxonomía actual; (II) distancia intraespecífica, $\geq 6\%$; distancia interespecífica, $\geq 6\%$: las especies pueden ser realmente complejos de especies (candidatas a división taxonómica); (III) la distancia intraespecífica, $\leq 6\%$; distancia interespecífica, $\leq 6\%$: hay una divergencia reciente, o fenómenos de hibridación, o posible sinonimia; (IV) distancia intraespecífica, $\geq 6\%$; distancia interespecífica, $\leq 6\%$: probables errores de identificación de la muestra.

3.2.5 Especies hipotéticas basadas en el Barcoding-gap

El número de MOTUs (Molecular Operational Taxonomic Unit), que equivale a las especies hipotéticas para este caso, no varió en la partición inicial realizada bajo los tres modelos (simple, JC y K2P) sugiriendo la existencia de 39 grupos, mientras que en la partición recursiva los modelos simple y JC arrojaron resultados similares sugiriendo la existencia de aproximadamente 42 a un poco más de 50 agrupaciones, dependiendo el porcentaje de divergencia que se tome (Tabla 3-8).

Bajo el modelo de sustitución K2P se identificaron 8 potenciales “gaps” del código de barras, solo se consideraron las agrupaciones dadas con divergencia intraespecífica entre 1% y 2.5%, porque los valores por debajo o por encima podrían subestimar o sobre estimar el número de especies (Pinto, *et al*, 2015). Dentro de este rango, se tomaron las agrupaciones dadas bajo los porcentajes de divergencias 1.29% y 2.15%. Las especies se dividieron en 44 grupos, separando especies que morfológicamente corresponden a una misma, pero muy distantes geográficamente, tal es el caso de *Mi. cayennensis* *cayennensis* y *Pi. evansi* colectadas en el departamento de Sucre (Colombia) y en países centroamericanos (Panamá, Honduras y Nicaragua), lo mismo ocurrió con *Mi. trinidadensis* y *Mi. micropyga* colectadas en Ovejas (Sucre) y Apartadó (Antioquia). Bajo este valor de divergencia no se lograron separar algunas especies del género *Nyssomyia* (*Ny. antunesi*, *Ny. yuilli yuilli*, *Ny. yuilli pajoti*, ni *Ny umbratilis*), tampoco las dos especies de *Trichophoromyia* (*Th. howardi* y *Trichophoromyia* sp). Cuando el porcentaje de divergencia aumentó a 2.15% los individuos de la especie *Pi. evansi*, quedaron en un mismo grupo sin importar que fueran de zonas geográficamente muy diferentes. Estos análisis también se hicieron a nivel de género (Anexo 4).

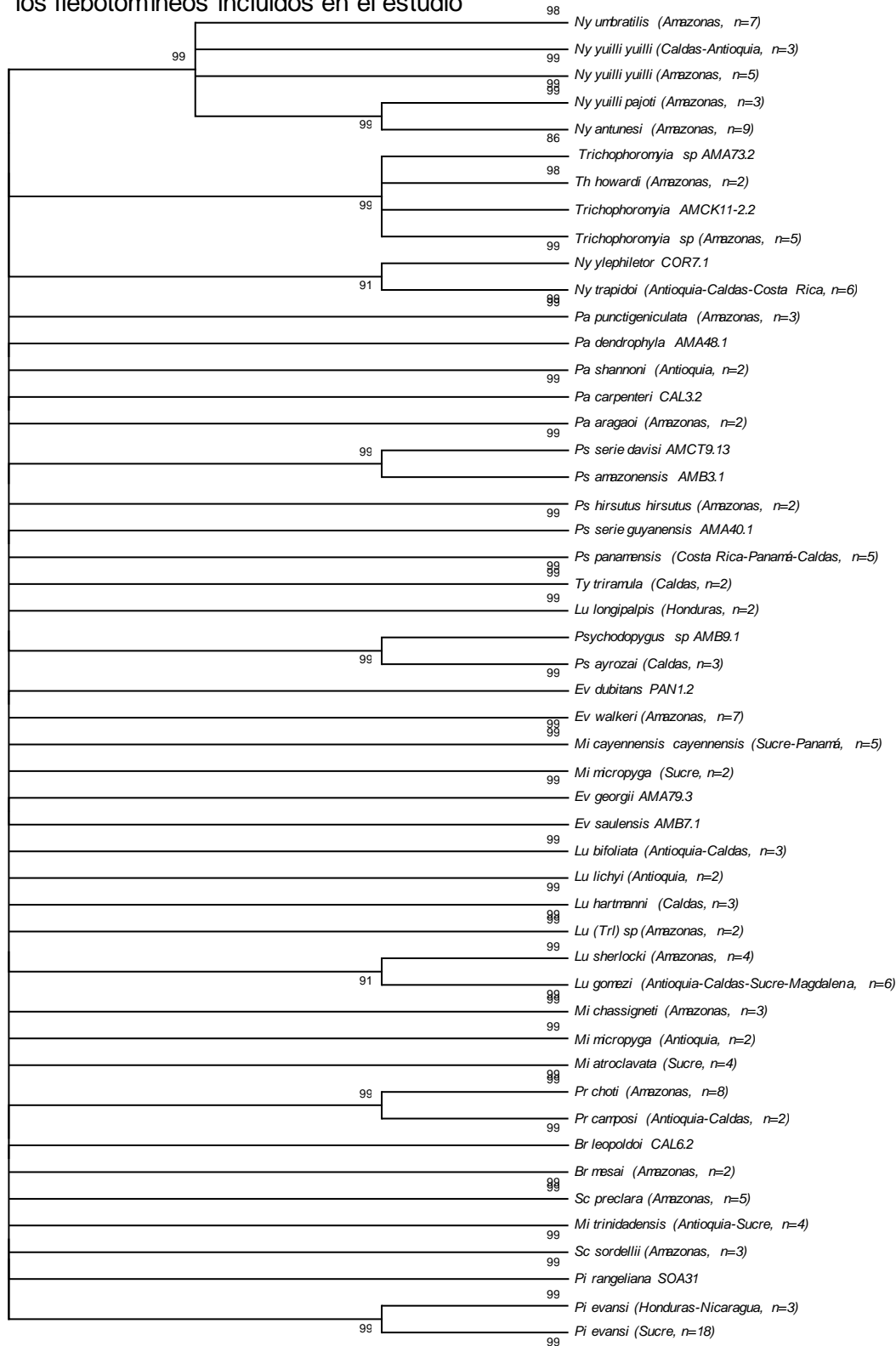
Table 3-8: Resultados del análisis ABGD (Results of the Automatic Barcode Gap Discovery)

Modelo de sustitución	X	Partición	Divergencia Intraespecífica							
			0.001000	0.0017	0.0028	0.0046	0.0077	0.0129	0.0215	0.0359
Simple	1.0	Inicial	39	39	39	39	39	39	39	39
		Recursiva	51	51	51	47	46	42	42	42
JC	1.0	Inicial	39	39	39	39	39	39	39	39
		Recursiva	57	57	53	49	48	44	43	42
K2P	1.0	Inicial	39	39	39	39	39	39	39	39
		Recursiva	76	76	68	49	48	44	43	42

X, ancho relativo del “gap”; Simple, distancia p; JC69, modelo de sustitución Jukes -Cantor; K2P, modelo de sustitución Kimura 2-parametros

3.2.6 Dendrogramas Neighbor-Joining

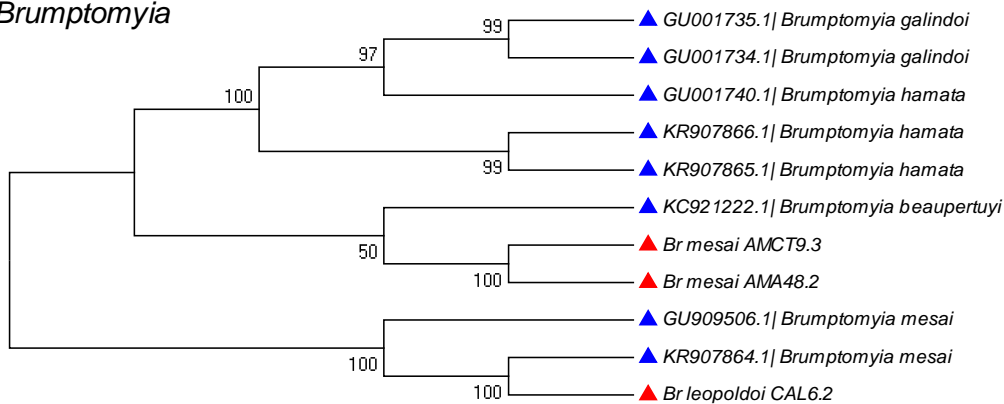
Figura 3-4: Dendrograma consenso Neighbor-Joining de secuencias COI (Barcode) para los flebotomíneos incluidos en el estudio



Dendrograma consenso Neighbor-Joining, con valores bootstrap de 1000 réplicas, generado bajo el modelo K2P, de secuencias COI de flebotomíneos de zonas importantes para la transmisión de la leishmaniasis. El número en el nodo representa el valor bootstrap.

Figura 3-5: Dendrograma consenso Neighbor-Joining de secuencias COI del género

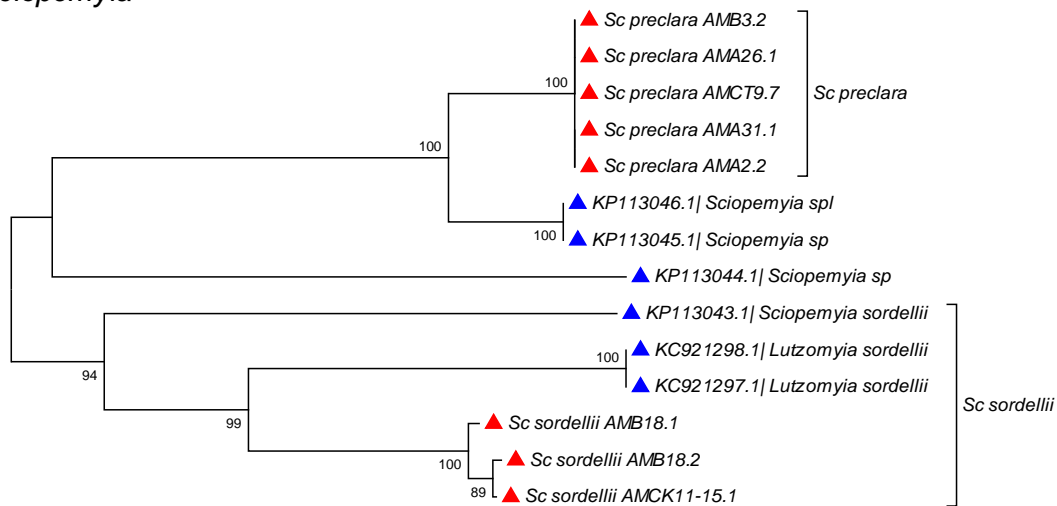
Brumptomyia



Dendrograma consenso Neighbor-Joining, con valores bootstrap de 1000 réplicas, generado bajo el modelo K2P, de secuencias COI de flebotomíneos del género *Brumptomyia* colectados en este estudio ▲ y obtenidas del GenBank ▲. El número en el nodo representa el valor bootstrap.

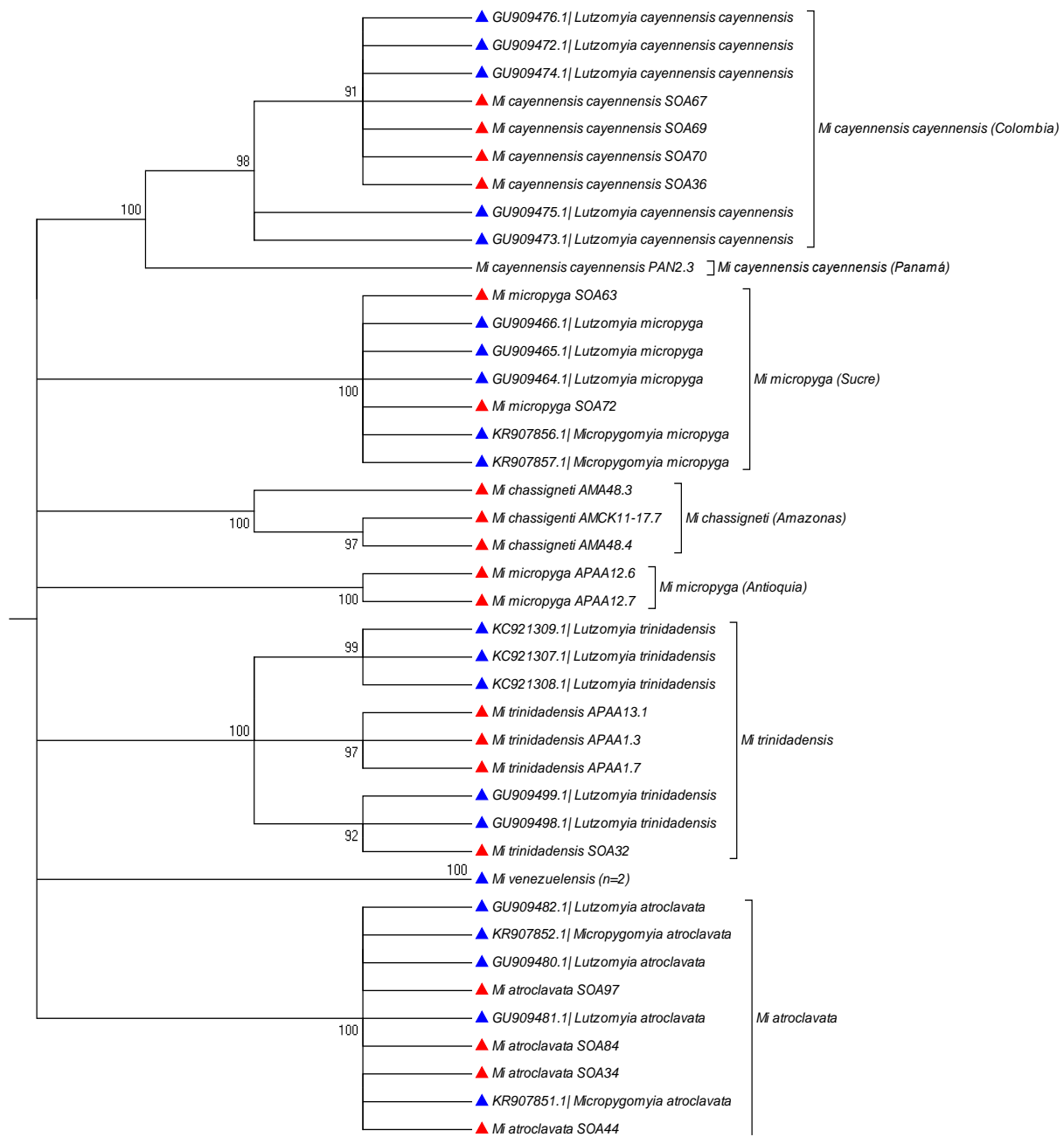
Figura 3-6: Dendrograma consenso Neighbor-Joining de secuencias COI del género

Sciopemyia



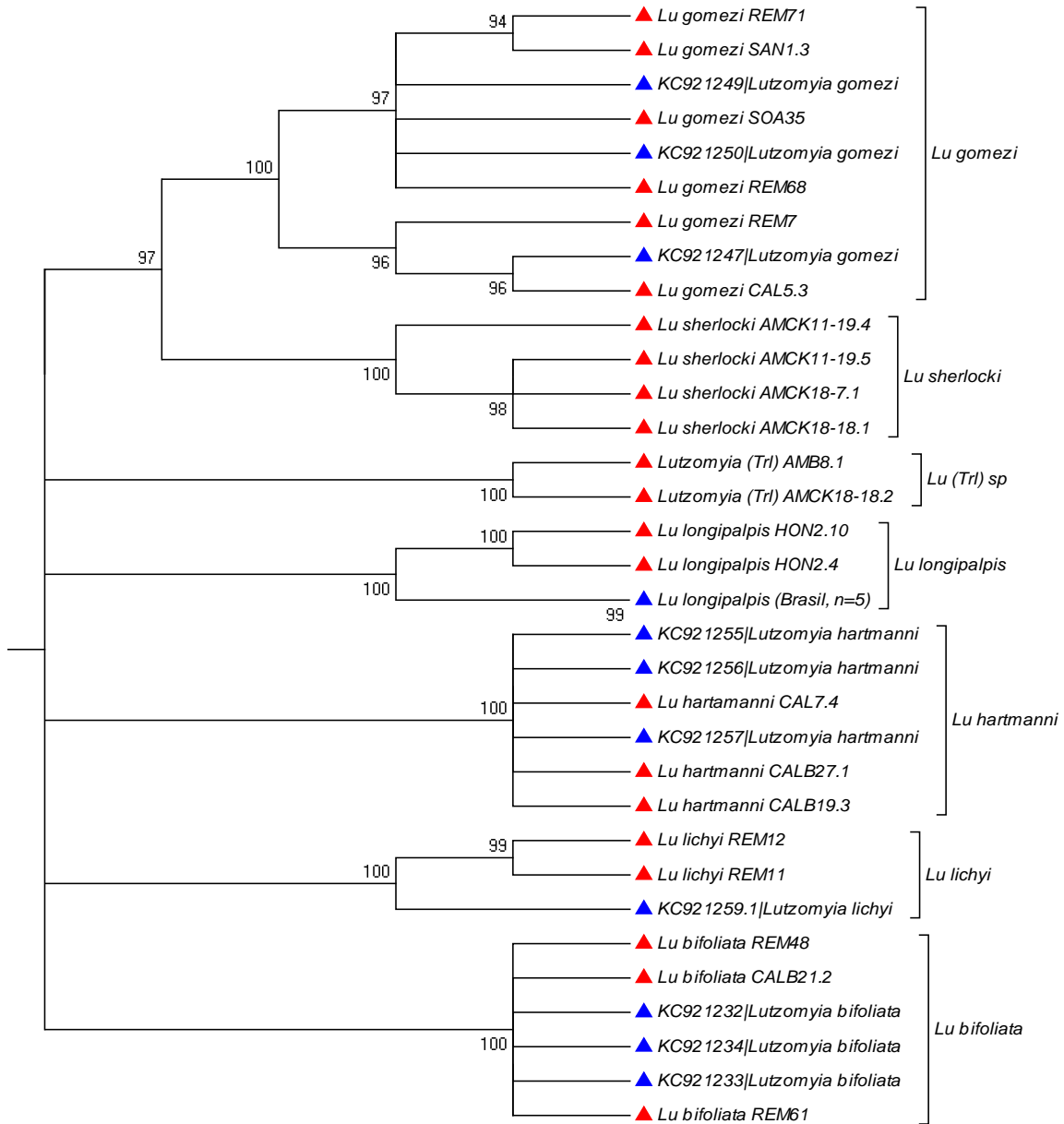
Dendrograma consenso Neighbor-Joining, con valores bootstrap de 1000 réplicas, generado bajo el modelo K2P, de secuencias COI de flebotomíneos del género *Sciopemyia* colectados en este estudio ▲ y obtenidas del GenBank ▲. El número en el nodo representa el valor bootstrap.

Figura 3-7: Dendrograma consenso Neighbor-Joining de secuencias COI del género *Micropygomyia*



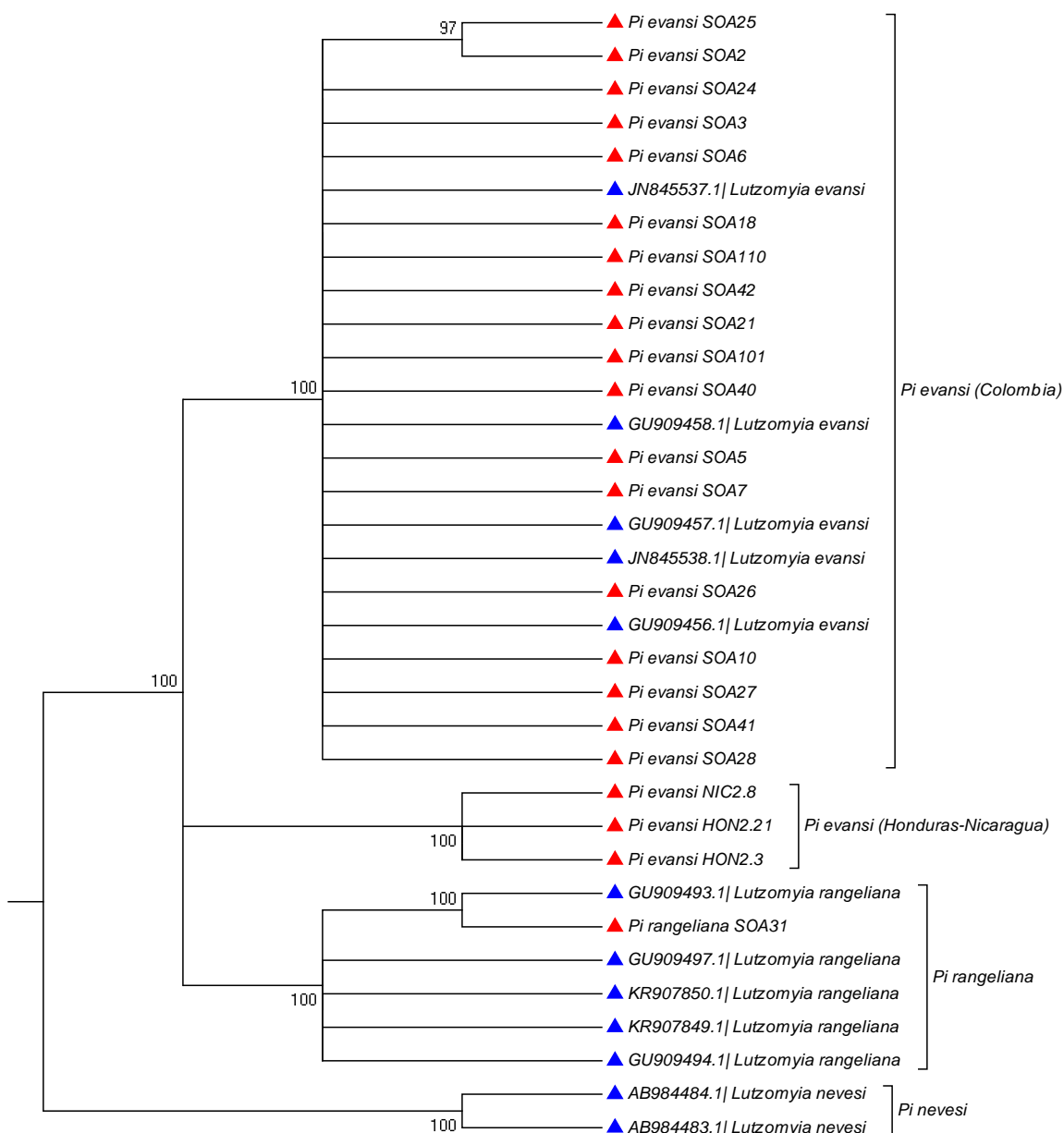
Dendrograma consenso Neighbor-Joining, con valores bootstrap de 1000 réplicas, generado bajo el modelo K2P, de secuencias COI de flebotomíneos del género *Micropygomyia* colectados en este estudio ▲ y obtenidas del GenBank ▲. El número en el nodo representa el valor bootstrap.

Figura 3-8: Dendrograma consenso Neighbor-Joining de secuencias COI del género *Lutzomyia*



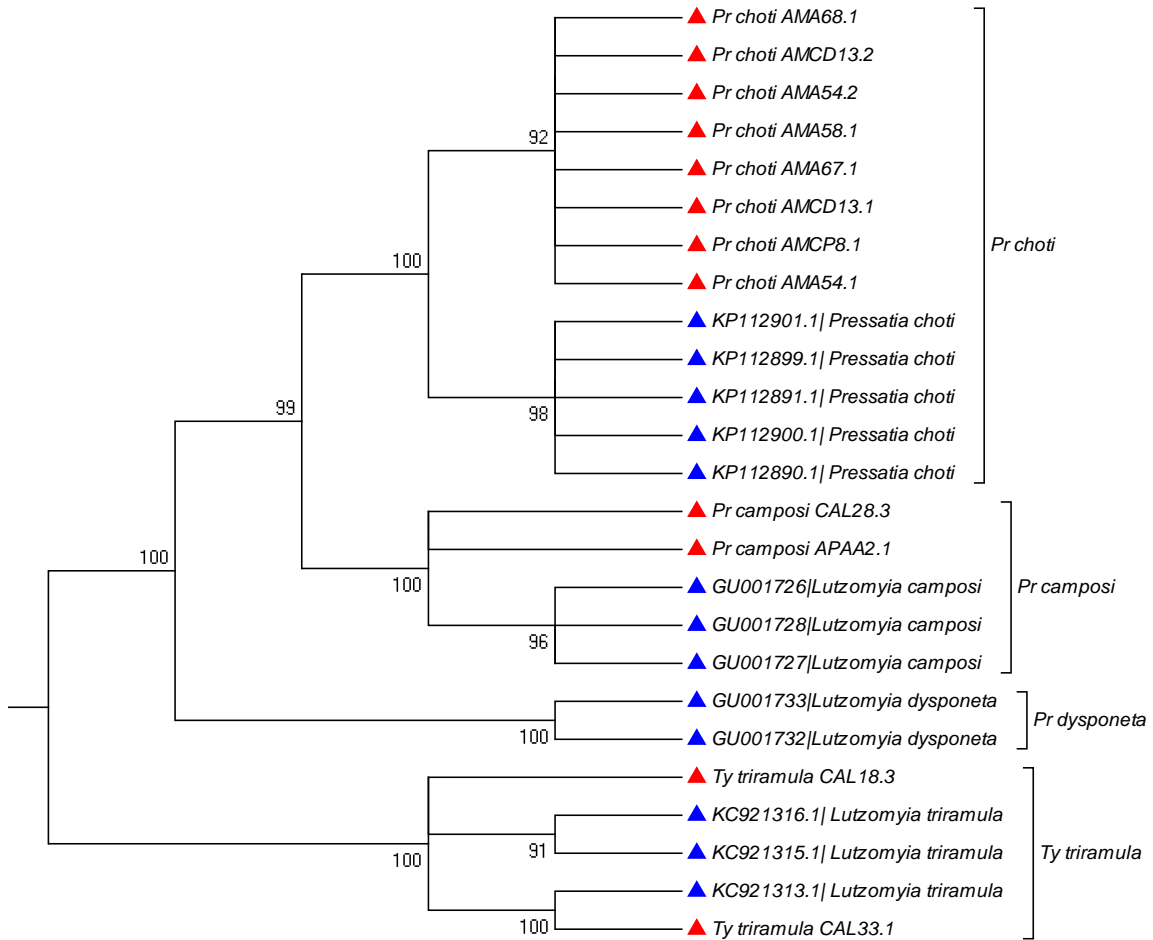
Dendrograma consenso Neighbor-Joining, con valores bootstrap de 1000 réplicas, generado bajo el modelo K2P, de secuencias COI de flebotomíneos del género *Lutzomyia* colectados en este estudio ▲ y obtenidas del GenBank ▲. El número en el nodo representa el valor bootstrap.

Figura 3-9: Dendrograma consenso Neighbor-Joining de secuencias COI del género *Pintomyia*



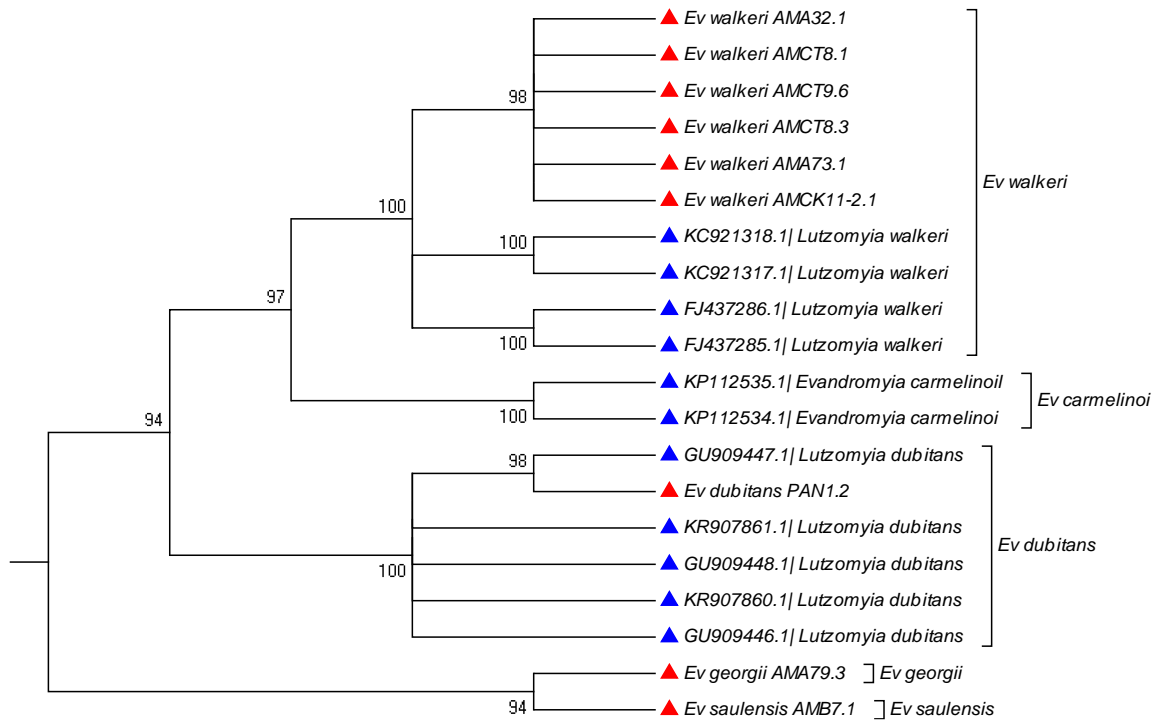
Dendrograma consenso Neighbor-Joining, con valores bootstrap de 1000 réplicas, generado bajo el modelo K2P, de secuencias COI de flebotomíneos del género *Pintomyia* colectados en este estudio ▲ y obtenidas del GenBank ▲. El número en el nodo representa el valor bootstrap.

Figura 3-10: Dendrograma consenso Neighbor-Joining de secuencias COI de flebotomíneos de los géneros *Pressatia* y *Triramula*



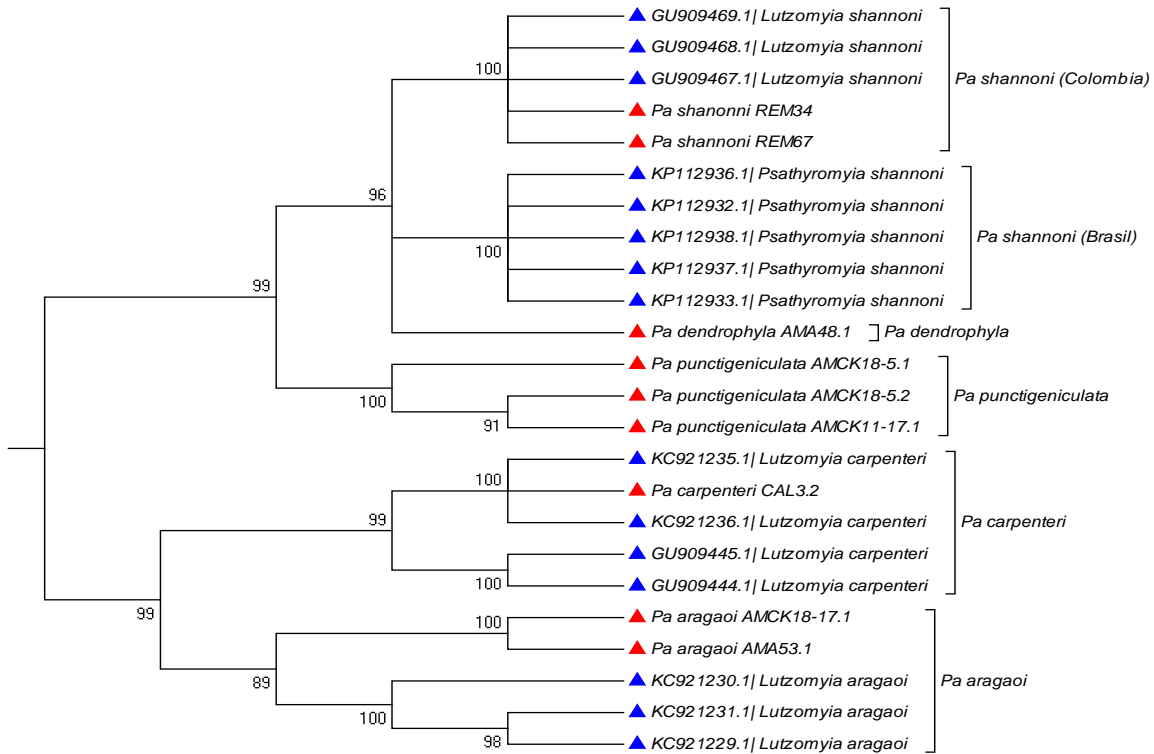
Dendrograma consenso Neighbor-Joining, con valores bootstrap de 1000 réplicas, generado bajo el modelo K2P, de secuencias COI de flebotomíneos de los géneros *Pressatia* y *Triramula* colectados en este estudio ▲ y obtenidas del GenBank ▲. El número en el nodo representa el valor bootstrap.

Figura 3-11: Dendrograma consenso Neighbor-Joining de secuencias COI del género *Evandromyia*



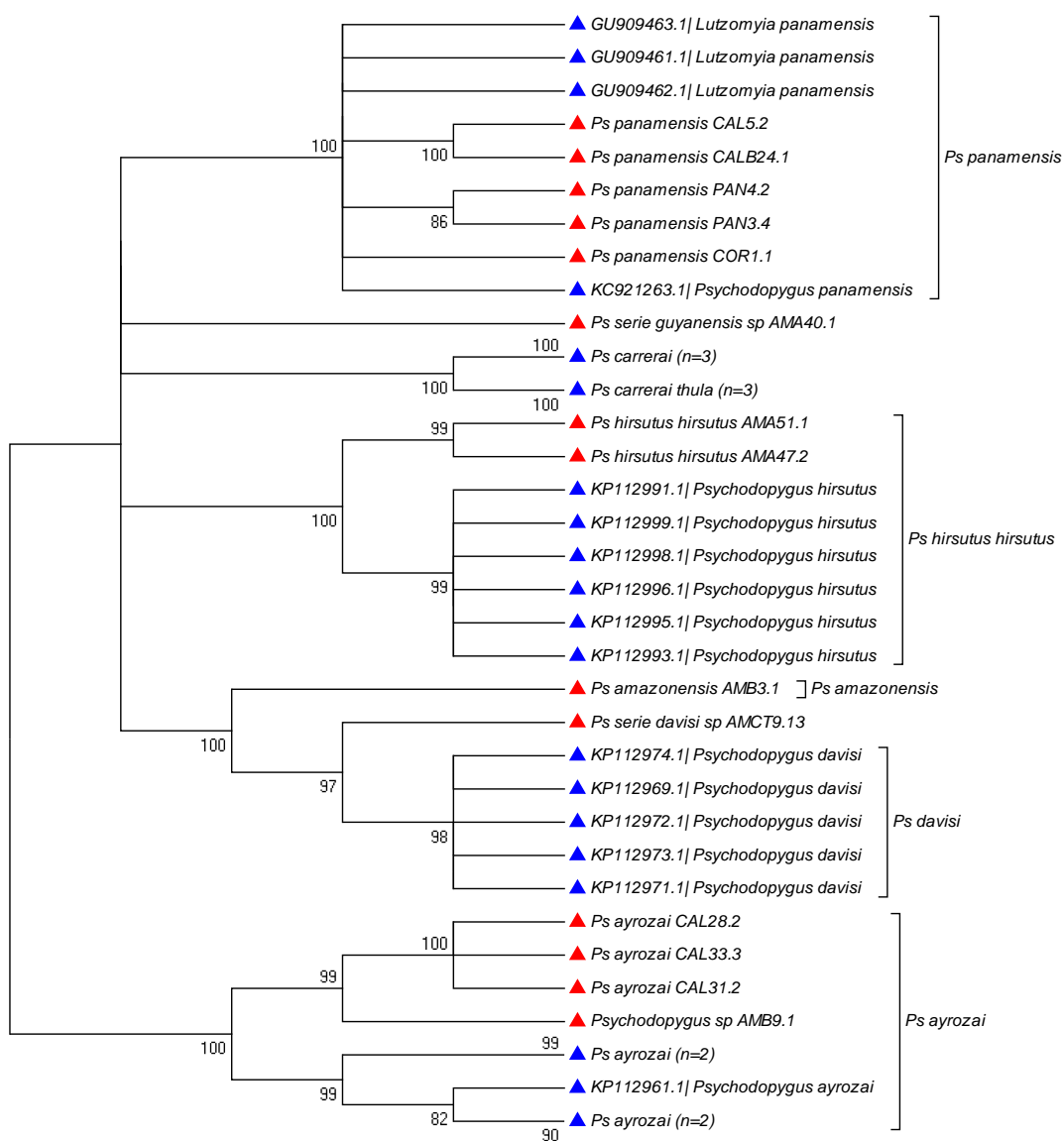
Dendrograma consenso Neighbor-Joining, con valores bootstrap de 1000 réplicas, generado bajo el modelo K2P, de secuencias COI de flebotomíneos del género *Evandromyia* colectados en este estudio ▲ y obtenidas del GenBank ▲. El número en el nodo representa el valor bootstrap.

Figura 3-12: Dendrograma consenso Neighbor-Joining de secuencias COI del género *Psathyromyia*



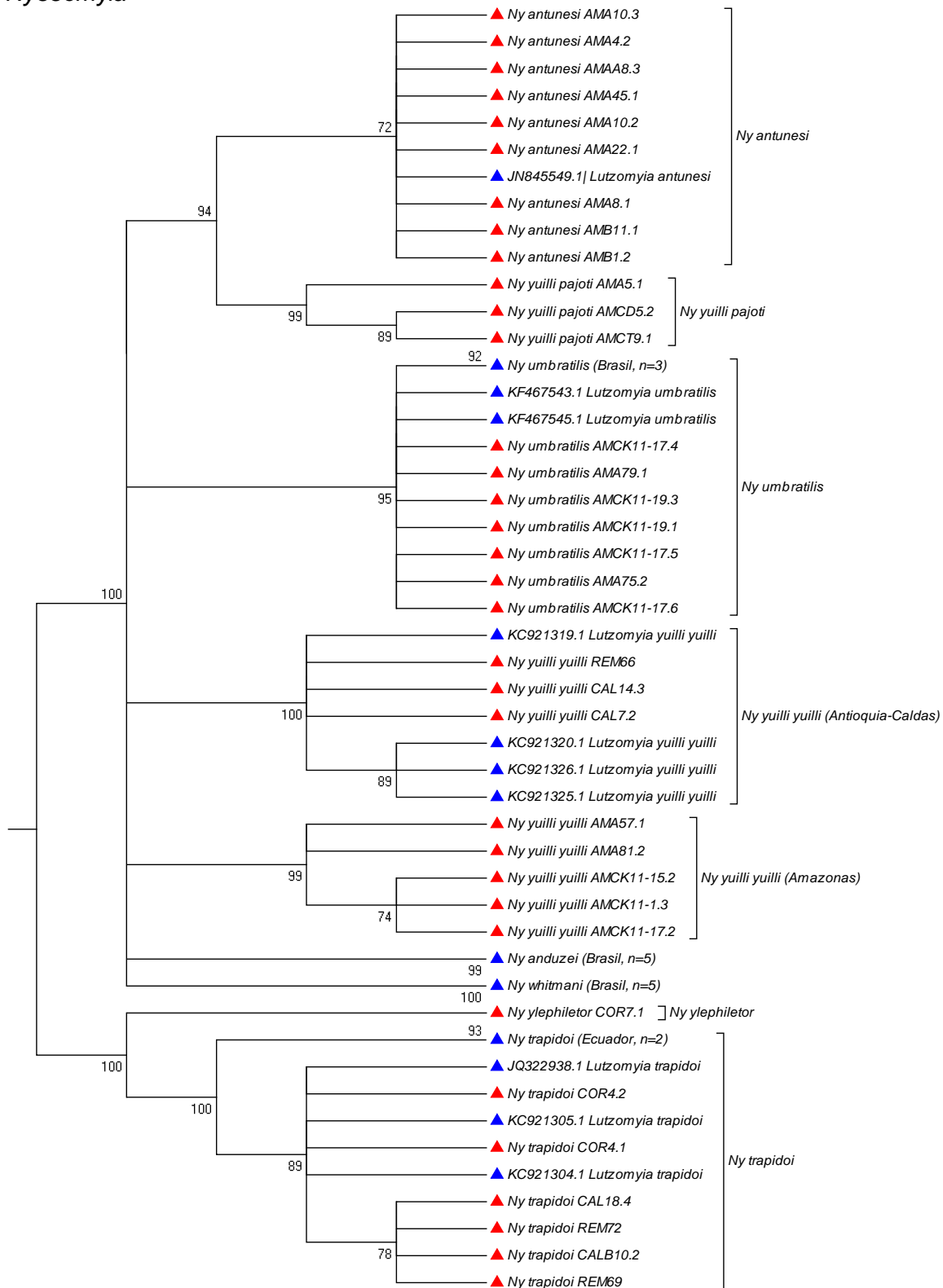
Dendrograma consenso Neighbor-Joining, con valores bootstrap de 1000 réplicas, generado bajo el modelo K2P, de secuencias COI de flebotomíneos del género *Psathyromyia* colectados en este estudio ▲ y obtenidas del GenBank ▲. El número en el nodo representa el valor bootstrap.

Figura 3-13: Dendrograma consenso Neighbor-Joining de secuencias COI del género *Psychodopygus*



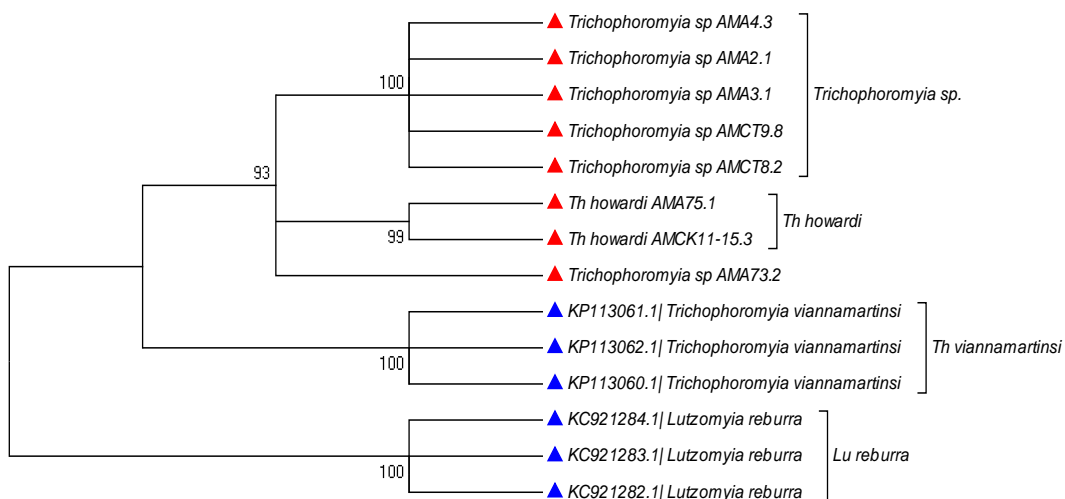
Dendrograma consenso Neighbor-Joining, con valores bootstrap de 1000 réplicas, generado bajo el modelo K2P, de secuencias COI de flebotomíneos del género *Psychodopygus* colectados en este estudio ▲ y obtenidas del GenBank ▲. El número en el nodo representa el valor bootstrap.

Figura 3-14: Dendrograma consenso Neighbor-Joining de secuencias COI del género *Nyssomyia*



Dendrograma consenso Neighbor-Joining, con valores bootstrap de 1000 réplicas, generado bajo el modelo K2P, de secuencias COI de flebotomíneos del género *Nyssomyia* colectados en este estudio ▲ y obtenidas del GenBank ▲. El número en el nodo representa el valor bootstrap.

Figura 3-15: Dendrograma consenso Neighbor-Joining de secuencias COI del género *Trichophoromyia*



Dendrograma consenso Neighbor-Joining, con valores bootstrap de 1000 réplicas, generado bajo el modelo K2P, de secuencias COI de flebotomíneos del género *Trichophoromyia* colectados en este estudio ▲ y obtenidas del GenBank ▲. El número en el nodo representa el valor bootstrap.

3.3 Discusión

Se evaluó la capacidad de la secuencia código de barras del ADN para la identificación de especímenes de flebotomíneos en zonas de importancia para la transmisión de la leishmaniasis, ubicándolos en grupos de “especies” en comparación con la taxonomía tradicional. Se adjudicó un número considerable de esta secuencia para cada una de las 43 especies estudiadas; lo cual contribuye a ampliar la librería genética de esta secuencia para este grupo de insectos y evaluar la consistencia de ésta como marcador como herramienta para la identificación de especies.

En todas las secuencias los contenidos de A+T se mantuvieron altos (66.1%) con respecto al contenido G+C (33.9%), lo cual concuerda con lo reportado para artrópodos

(Lunt *et al.* 1996; Crease 1999; Hoy 2006). Esta relación fue constante en todas las secuencias de las diferentes especies de la subfamilia (Phlebotominae).

No se encontraron codones de parada en ninguna de las secuencias cuando se realizaron traducciones de las secuencias en el programa Mega, lo que sugiere la funcionalidad de este gen mitocondrial en este caso (Zhang y Hewitt, 1996). Esto sumado a que no se evidenciaron eventos de inserciones ni deleciones, los cuales pueden ser indicativos de ausencia de NUMTs (nuclear mitochondrial pseudogenes) en las secuencias analizadas (Bensasson *et al.*, 2001).

La preferencia por la terminación en A o T parece ser característica para el genoma mitocondrial de la clase Insecta, sustentado en el hecho de que los genes que codifican para proteínas mitocondriales exhiben una preferencia por el uso de los codones ricos en A+T (Crozier y Crozier, 1993; Herbeck & Novembre, 2003), esta preferencia resulta evidente en nuestro estudio (A+T en tercera posición del codón 89.2%).

En cuanto a las diferencias en las cantidades y tipos de sustituciones entre los diferentes haplotipos de la misma especie, los resultados revelan de 1 a 68 posiciones variables, siendo estos cambios nucleótidos en su mayoría sustituciones sinónimas tipo transiciones (purina por purina y pirimidina por pirimidina) (Anexo 3). Siendo éstas sustituciones en las terceras posiciones, no se afectan la composición de aminoácidos en la proteína. Esta tasa de sustitución nucleotídica cambia gradualmente cuando se comparan individuos de especies diferentes, y aumenta con las distancias genéticas, esta característica es la que convierte el “código de barras” en una herramienta molecular para diferenciar especies (Contreras *et al.*, 2014).

Aliabadian y colaboradores (2009) señalaban en su momento, que el éxito del “código de barras” de la secuencia COI dependía de las diferencias entre las distancias genéticas intra e interespecífica. Estas distancias nunca deben sobreponerse ni solaparse, y es lo que se conoce como el “gap” del DNA-Barcoding. En este punto los resultados obtenidos bajo el modelo K2P para los rangos de divergencia intraespecífica arrojaron datos interesantes; primero, en 26 de las 43 especies evaluadas, la máxima divergencia se mantuvo por debajo de 3%, que en un principio fue el valor sugerido para insectos (Hebert *et al.*, 2003). Sin embargo, este rango fue ampliado hasta 6% para insectos de la subfamilia Phlebotominae en posteriores trabajos (Azpurua *et al.*, 2010, Cohnstaedt *et al.*, 2011 y Contreras *et al.*, 2014).

Este último fue tomado como referencia e incluyó el 94% de las especies (31) del total de especies donde fue posible estimar esta distancia (33); quedando por fuera *Pi. evansi*.

En esta especie la divergencia intraespecífica incrementó cuando se compararon poblaciones geográficamente distantes como las de la costa caribe colombiana (Sucre) con aquellas de países centroamericanos (Honduras y Nicaragua) (Tabla 3-5, 3-7 y Figura 3-9). Si se evalúan estas dos poblaciones separadamente, se tiene que la máxima divergencia fue de 2.4% y 0.7% (Sucre-Colombia y Centroamérica, respectivamente). Lo mismo ocurrió con la especie *Mi. micropyga* cuando se compararon las dos poblaciones distantes (Apartado-Antioquia y Ovejas-Sucre), la distancia máxima aumentó hasta el 12.3%. Cuando se incluyeron secuencias del GenBank para esta especie (Tabla 3-6, Figura 3-7), se evidenció que los haplotipos diferentes eran los de Apartadó. Sin embargo, es preciso mencionar que las secuencias de la base de datos consultadas correspondían a la misma zona de estudio (Ovejas-Sucre). Lo que podría explicar estos resultados es una identificación equivocada de los individuos de alguna de las dos poblaciones. En este caso todos los especímenes fueron cuidadosamente revisados y las identificaciones correspondientes a las hembras colectadas en Apartado (Antioquia), fueron confirmadas por la Dra. Eunice Galati (especialista en el grupo). Otra razón, podría ser que el bajo número de individuos colectados en esta localidad no permitió evidenciar diferencias morfológicas sutiles entre los individuos, y podría tratarse de un complejo de especies morfológicamente similares o indistinguibles (Figura 3-3), por lo tanto, se sugiere realizar estudios adicionales tanto morfológicos como moleculares.

La situación de ambas especies (*Pi. evansi* y *Mi. micropyga*) es representada en la Figura 3-3, donde las dos se ubican en el cuadrante II asignado a estas especies candidatas a una división taxonómica ó posibles complejos de especies (Hebert, 2004). La alta divergencia puede ser explicada por la presencia de polimorfismos ancestrales, los cuales pueden ser conservados a lo largo del tiempo, debido probablemente a la distribución poblacional agregada, característica de los flebotomíneos (Memmott, 1991). Para esto, se deben considerar varios elementos como su limitada capacidad de vuelo y por ende su menor capacidad de dispersión (Alexander, 1987, Morrison *et al.* 1993), lo que llevaría a que se estructuren en pequeñas poblaciones fijando en el tiempo diferencias importantes entre ellas. Pese a estas dos excepciones, en todos los casos existió una clara tendencia de que la mayor divergencia intraespecífica sea menor que la interespecífica, sobre todo cuando la interespecífica es calculada entre especies de diferentes géneros (Figura 3-2).

Con excepción de estas dos especies el rango intraespecífico fue 0-5.9% y el interespecífico fue 10-22.4%.

Los resultados permiten concluir que los porcentajes de divergencia están directamente relacionados con la distancia geográfica, esto explica una mayor divergencia entre especímenes de especies colectadas en diferentes países (*Pi. evansi*, *Mi. cayennensis cayennensis*, *Ps. panamensis* y *Ny. trapido*) o incluso en el mismo país, pero en localidades muy distantes (*Ny. yuilli yuilli*, *Pr. camposi*, *Lu. gomezi* y *Mi. micropyga*), y distancias muy cercanas a cero cuando fue con colectas en una única zona de muestreo (*Br. leopoldoi*, *Mi. atroclavata*, *Mi. chassigneti*, *Sc. preclara*, *Sc. sordellii*, *Lu. hartmanni*, *Lu. lichyi*, *Lu. bifoliata*, *Lu. longipalpis*, *Lu. sherlocki*, *Pa. punctigeniculata*, *Ps. ayrozai*, *Ny. antunesi*, *Ny. yuilli pajoti*, *Ny. umbratilis* y *Th. howardi*).

Pinto y colaboradores (2015) en un estudio realizado con flebotomíneos de Brasil, encontraron que la baja variabilidad intraespecífica podría atribuirse a efectos del muestreo en diez de las especies evaluadas. Para contrarrestar este efecto, deben incluirse secuencias de la misma especie, pero de localidades diferentes, ya que la escala geográfica del muestreo tiene un impacto crítico en el uso del código de barras del ADN (Bergsten *et al*, 2012), sin embargo, este estudio sugiere que esto no se aplica a todas las especies, ya que encontramos especies colectadas en diferentes países cuya máxima divergencia no estuvo fuera del rango establecido para el nivel de especie (0-6%). La estrecha relación entre la divergencia intraespecífica y la escala geográfica de muestreo, está sustentada en teorías como el aislamiento por distancia, así como estudios de filogeografía ampliamente reconocidos. Por esto, si una especie es muestreada de acuerdo a su distribución geográfica, las distancias genéticas intraespecíficas aumentarán en comparación a una distancia genética estimada en individuos de una región más limitada (Meyer y Paulay, 2005; Zhang, *et al*, 2010; Arrivillaga *et al*, 2002). Las diferencias entre los porcentajes de discriminación de especies de flebotomíneos de Brasil y otras regiones, pueden estar relacionados con los efectos de muestreo.

En un estudio de flebotomíneos de zona cafetera (Contreras *et al*, 2014) se incluyeron 36 especies colectadas y analizadas en diferentes localidades, de éstas, 31 especies estaban representadas por más de un espécimen y diez fueron muestreadas en más de una localidad, los resultados mostraron que dos de estas especies alcanzaron la mayor divergencia en el análisis (*Lu. gomezi* y *Ps. panamensis*). Este resultado sugiere que el aumento en las localidades de muestreo para cada especie, podría influir en sus

distancias genéticas. Kumar y colaboradores (2012) encontraron un alto porcentaje de discriminación de especies, lo que podría explicarse fácilmente por el bajo número de especies muestreadas (7 especies de flebotomíneos de India). En el estudio realizado por Pinto y colaboradores (2015), los resultados del análisis ABGD delimitan con precisión las especies colectadas en una sola localidad. Este estudio cuenta con el mayor número de individuos de una misma especie colectados en diferentes localidades, producto de un gran esfuerzo de muestreo, lo que proporciona una visión más real de las distancias genéticas en especies de flebotomíneos en Colombia.

Los dendrogramas obtenidos con el método NJ apoyan la hipótesis de que esta secuencia del código de barras no solo agrupa las secuencias en relación a una misma especie sino de acuerdo a la localidad de origen, separando algunas especies de acuerdo a su ubicación geográfica. Estos resultados son apoyados por los análisis obtenidos por ABGD donde con una divergencia entre el 1 y 2.5%, se pasa de 39 grupos iniciales a 43 y 44 grupos (partición recursiva), donde además de la especie, los grupos se soportan en sitios de colecta distantes. Este análisis permite también observar que a medida que se refina el porcentaje de divergencia el número de grupos aumenta ya que se separan todas las zonas de muestreo, sin embargo, Pinto y colaboradores (2015), sugieren tomar en cuenta sólo las agrupaciones generadas con una divergencia mayor al 1%, para no sobreestimar el número de especies. Es importante mencionar que los dendrogramas obtenidos, en ningún caso soportan hipótesis filogenéticas, sólo proporcionan una ayuda visual, para observar las similitudes entre secuencias (Figura 3-4), también se incluyeron dendrogramas por cada género donde se incorporaron secuencias reportadas en el GenBank.

Aunque se ha discutido bastante el hecho de asignar especies a entidades desconocidas, basados en el valor de una distancia genética hallada con base en un solo fragmento de ADN (Rubinoff *et al*, 2006), en este estudio se encontró que, si bien para algunas especies este fragmento no puede asignar su estatus taxonómico, éste si aparece bien resuelto a nivel de género (Figura 3-2).

Con el análisis de código de barras de ADN utilizando el software ABGD se obtuvo un particionamiento automático que logró discriminar correctamente el 76 % de las especies (31) con una divergencia de 1.29% y del 78% (32) con una divergencia del 2.15%. Con ambas divergencias se separan las especies *Mi. trinidadensis*, *Mi. cayennensis* *cayennensis* y *Mi. micropyga*, de acuerdo a las localidades (es decir dos grupos por

especie). *Pi. evansi* solo se divide de acuerdo a las localidades con una distancia de 2.15%. Ambas particiones agrupan a *Ps. amazonensis* con *Ps. serie davisii* sp. Todos los análisis realizados en este estudio soportan esta agrupación y muestran una diferencia la secuencia *Ps. serie davisii* sp y secuencias de *Ps. davisii* disponibles en el GenBank (Figura 3-13). Morfológicamente no se asignó la especie a este individuo (*Ps. serie davisii* sp) ya que la diferencia entre las especies *Ps. davisii* y *Ps. amazonensis* en las hembras es una coloración característica en el tórax, y esta estructura fue usada para la extracción de ADN.

Bergsten y colaboradores (2012) sugieren que la divergencia genética debe ser menor entre especies cercanas morfológicamente que entre especies cercanas geográficamente, sin embargo, Pinto y colaboradores (2015) encontraron que algunas especies están más relacionadas genéticamente con especies cercanas geográficamente que cercanas morfológicamente; en sus análisis *Lu. longipalpis*, *Lu. cruzi* y *Lu. alencari* se agrupan entre sí por localidad y no por especie nominal, por lo que en este caso se sugirió que la especie *Lu. alencari* podría formar parte del complejo de *Lu. longipalpis*.

La baja divergencia encontrada entre las secuencias de estas especies simpátricas puede ser el resultado de introgresión, un fenómeno común entre las especies cercanas que tiende a ocurrir mucho más fácilmente en el ADN mitocondrial que en el ADN nuclear (Bachtrog *et al*, 2006). Pinto y colaboradores concluyeron que la introgresión podría explicar también la baja divergencia encontrada entre *Ny. intermedia* y *Ny. whitmani*. La introgresión de ADN nuclear entre estas especies había sido demostrada en un gen denominado "period", que en *Drosophila* controla el ritmo circadiano. Los autores plantean la hipótesis si fenómenos similares se están produciendo en otros loci que controlan aspectos importantes de la conducta y la capacidad vectorial (Mazzoni *et al*, 2006; Mazzoni *et al*, 2008).

La introgresión en ADN mitocondrial también fue detectada en estudios que analizaron el gen del citocromo b de hembras que morfológicamente se identificaron como *Ny. intermedia*, pero mostraron haplotipos de ADNmt de *Ny. whitmani* (Marcondes *et al*, 1997; Pinto *et al*, 2015). Estos estudios muestran un bajo nivel de divergencia, alta similitud entre secuencias y presencia de haplotipos compartidos entre especímenes de especies del género *Nyssomyia* cuando las especies tienen una distribución restringida, producto de especiación simpátrica. Aunque es difícil diferenciar la introgresión de la persistencia de polimorfismos ancestrales, la hipótesis de introgresión fue aceptada en estos estudios

que sugieren que *Ny. intermedia* y *Ny. whitmani* podrían estar intercambiando alelos (Mazzoni *et al*, 2006; Mazzoni *et al*, 2008; Pinto *et al*, 2015). En este estudio algunas especies de este género (*Ny. umbratilis*, *Ny. antunesi*, *Ny. yuilli pajoti* y *Ny. yuilli yuilli*) aunque exhiben los caracteres diagnósticos de cada especie que permite separarlas morfológicamente, las divergencias fueron muy bajas, por lo cual el análisis ABGD no logró discriminarlas (Tabla 3-8) y las distancias entre especies de un mismo género aparecen tan bajas (Figura 3-2 b). En la figura 3-3 se observa que estas especies se ubican en el cuadrante III, donde se sugieren explicaciones como divergencia reciente, fenómenos de hibridación, o posible sinonimia (Hebert *et al*, 2004). En el dendrograma NJ (Figura 3-4) realizado sólo con secuencias obtenidas en este estudio, se observa un soporte alto (bootstrap 99) para especies del género *Nyssomyia* cuando se incluyeron secuencias de este género disponibles en el GenBank (Figura 3-14). Se diferencian claramente los individuos de *Ny. yuilli yuilli* de la región andina colombiana (Antioquia y Caldas) y de la región amazónica (departamento de Amazonas); estos resultados sumados a pequeñas diferencias morfológicas encontradas entre individuos de las dos localidades, son soportados por el reciente estudio de Godoy y Galati (2016) donde se hace una revalidación de la especie *Ny. fraihai*, anteriormente considerada sinonimia de *Ny. yuilli yuilli* (Vexenat *et al*, 1986), no obstante, el estudio de Godoy y Galati fue basado en caracteres morfológicos del macho, argumentando que las hembras de estas especies son indistinguibles, por esta razón los especímenes trabajados en este estudio se dejaron dentro de la especie *Ny. yuilli yuilli* ya que para una de las localidades (Leticia, Amazonas) no se encontraron machos de esta especie, para confirmar la presencia de las dos especies.

Algo similar ocurrió con las especies del género *Trichophoromyia*, donde el análisis ABGD no logró discriminar entre dos especies colectadas en una misma localidad. En este caso sería conveniente realizar análisis moleculares que permitan saber si ha ocurrido introgresión en estos genes. Una de las especies (*Th. howardi*) fue correctamente identificada por morfología, la otra se registra en este estudio como *Trichophoromyia* sp ya que con las claves existentes (Galati, 2014 y Young y Duncan, 1992) no fue posible llegar hasta el nivel taxonómico de especie, y se concluye que podría tratarse de una especie no descrita (tema abordado con mayor amplitud en el capítulo 2).

Los análisis de código de barras realizados para flebotomíneos de Brasil (Pinto *et al*, 2015) soportaron la resurrección de dos sinonimias (Sábio *et al*, 2014) dentro de la serie

Shannoni que son morfológicamente similares, por lo que se asume que el código de barras de ADN también proporciona un método fiable para discriminar entre ellas. Esto confirma la utilidad de esta metodología para la identificación de especies de flebotomíneos, previamente sugerido por Pinto y colaboradores (2015) quienes incluyeron en su estudio 576 especímenes pertenecientes a 47 especies colectados en 5 estados de Brasil.

En este estudio no fue posible obtener datos suficientes para calcular la divergencia intraespecífica en todas las especies. Aun teniendo más de un representante por especie esta variabilidad se puede subestimar si no se incluyen individuos de varias localidades especie. Lo ideal para implementar el código de barras como una herramienta rápida para la identificación de especies en un foco de transmisión es avanzar en la obtención de secuencias para especies con amplios rangos de distribución geográfica. Estudios basados en secuencias de ADN mitocondrial han logrado resolver dos de las situaciones que aparecen en este estudio: se han encontrado especies hermanas en lo que se consideraba era una sola especie y especies crípticas con variación geográficamente estructurada (Hebert, 2004).

La pertinencia de este tipo de estudios se evidencia cuando existen bases de datos que permiten hacer comparaciones para encontrar porcentajes de similitud entre secuencias problema y secuencias asignadas a una especie; en otros casos podrían sugerir la necesidad de verificación de algunas especies por taxonomía clásica con el uso de claves dicotómicas. En este estudio se encontró que la secuencia correspondiente a la especie *Br. mesai* reportada por Romero y colaboradores (2010), tiene un mayor porcentaje de similitud con la especie *Br. leopoldoi*, colectada en el departamento de Caldas y verificada por taxonomía clásica por un experto (Eunice Galati comunicación personal, ver Tabla 3-4 y Capítulo 2), en el muestreo realizado para este estudio también se logró colectar individuos de la especie *Br. mesai* (identificación también verificada por Eunice Galati, 2015). Las secuencias de esta especie no mostraron altos porcentajes con ninguna especie, por lo que se sugiere que el espécimen de esta secuencia reportada como *Br. mesai* (código de acceso GU909506.1) debería ser verificado por taxonomía clásica.

Este tipo de comparaciones tendrán cada vez más lugar, y serán de mayor utilidad, a medida que se reporten mayor número de secuencias y de especies, en lo posible de diferentes localidades. Con este estudio se reportan secuencias correspondientes a 12 especies de la subfamilia Phlebotominae (*Br. leopoldoi*, *Mi. chassigneti*, *Sc. preclara*, *Lu.*

sherlocki, *Ev. georgii*, *Ev. saulensis*, *Pa. punctigeniculata*, *Pa. dendrophyla*, *Ps. amazonensis*, *Ny. yuilli pajoti*, *Ny. ylephiletor* y *Th. howardi*, Tabla 3-4).

Por último, el análisis de código de barras de ADN permitió asociar las hembras morfológicamente indistinguibles con los machos de los géneros *Brumptomyia*, *Pressatia*, *Tryramula* y *Trichophoromyia*. La especie fue asignada a hembras inicialmente con base en la morfología masculina, cuando solo se encontró una especie del grupo por localidad, sin embargo, todas las identificaciones fueron soportadas por los análisis genéticos, cuando se incluyeron haplotipos de ambos sexos para una especie. Se aporta mayor evidencia para la asignación de especies en grupos con hembras isomórficas (Figuras 3-5, 3-10, 3-15). Esta confirmación de especie con el código de barras de ADN plantea la posibilidad de describir las hembras de especies de estos grupos.

En conclusión, salvo en caso de especies en las que se ha considerado la posibilidad de hibridación introgresiva, el código de barras del ADN permitió la discriminación de especies de flebotomíneos y el descubrimiento de posibles complejos de especies en este grupo. Este método también pone en evidencia especímenes con identificaciones erróneas. Además, permite la asociación entre machos y hembras de grupos de especies con hembras isomórficas.

Es importante mencionar que una mayor disponibilidad de secuencias para una misma especie proporcionará una visión más completa y explícita en cuanto a la posibilidad de utilizar la secuencia COI como un marcador molecular en esta región.

Por último, este estudio resalta que la elevada variabilidad encontrada en la secuencia COI de estos insectos (Phlebotominae), sugiere que la asignación de especies para esta subfamilia, se aborde desde un enfoque integral, como la taxonomía integrativa con el fin de obtener resultados precisos y fiables, combinando estudios moleculares y de taxonomía clásica para proporcionar a las secuencias niveles de confianza máximos y potenciar su utilidad.

4. Conclusiones y perspectivas

4.1 Conclusiones

Los resultados contribuyen a un mejor conocimiento sobre la subfamilia Phlebotominae en Colombia. Se presenta un listado de 49 especies de la subfamilia que ocurren en zonas de importancia para la transmisión de la leishmaniasis en el país.

Se encontró un morfotipo denominado *Trichophoromyia* sp, que corresponde a una especie no descrita. La descripción taxonómica será objeto de un trabajo futuro.

El mayor número de especies fue encontrado en Amazonas (30 especies), lo que constituye el 61% de las especies identificadas en este estudio, seguido por Caldas (15 especies), Antioquia (11) y Sucre (10) y finalmente Magdalena que aportó el 6% de las especies (3).

La especie más ampliamente distribuida fue *Lu. (Trl) gomezi* colectada en seis municipios, seguida por *Ps. panamensis* en cinco.

Entre las especies colectadas en este estudio 15 de ellas (30%) son reconocidas por sus hábitos antropofílicos y/o antecedentes epidemiológicos en América.

Se aportan nuevos registros a nivel departamental, para Caldas *Br. leopoldoi* Ev. (*Eva saulensis* y *Ps. paraensis*. Para Amazonas el inventario aumentó en siete especies, (*Br. mesai*, *Lu (Hel) sanguinaria*, *Pr. choti*, *Ev. (Eva) georgii*. *Pa. (Psa) pradobarrientosi*, *Pa. (Psa) punctigeniculata* y *Ny. yuilli pajoti*. De éstas dos constituyen nuevos reportes para el país, *Pa. (Psa) pradobarrientosi* y *Ev. (Eva) georgii*.

Se adjudicó un número considerable de secuencias nucleotídicas de la región código de barras del gen mitocondrial COI a 43 especies; entre las que se incluyen 12 especies que no contaban con reportes de esta secuencia en las bases de datos. Esto contribuye a ampliar la librería genética de esta secuencia para este grupo de insectos y evaluar la consistencia de esta como marcador como herramienta para la identificación de especies.

El análisis de código de barras de ADN permitió asociar hembras morfológicamente indistinguibles con machos de los géneros *Brumptomyia*, *Pressatia*, *Tryramula* y *Trichophoromyia*.

Este estudio resalta que la amplia variabilidad encontrada en algunas especies de flebotomíneos en la secuencia COI, sugiere que la asignación de especies en estos casos debería hacerse desde enfoques más amplios, como la taxonomía integrativa con el fin de obtener resultados precisos y fiables, combinando estudios moleculares y de taxonomía clásica para proporcionar a las secuencias niveles de confianza máximos y potenciar su utilidad.

4.2 Perspectivas

Continuar el inventario de especies de la subfamilia Phlebotominae, extendiendo las áreas de muestreo.

Obtener secuencias del fragmento COI para especies con amplios rangos de distribución geográfica, para contrarrestar los efectos del muestreo en la obtención de los porcentajes de discriminación de especies de flebotomíneos.

Adelantar estudios para verificar si la introgresión en el gen COI es la razón para la baja divergencia en las especies del género *Nyssomyia* presentes en Amazonas.

Avanzar en estudios de morfología y morfometría para determinar si las diferencias observadas entre las hembras de *Ny. yuilli yuilli* de diferentes regiones (andina y amazónica) son suficientes para diferenciarlas de la especie *Ny. fraihai*.

Anexo 1:

Frecuencia de individuos por especies de la subfamilia Phlebotominae para cada municipio

ESPECIES	MUNICIPIOS POR DEPARTAMENTO																
	Antioquia		Total Antioquia (%)	Caldas			Total Caldas (%)	Magdalena		Total Magdalena (%)	Sucre		Total Sucre (%)	Amazonas		Total Amazonas(%)	Total general (%)
	Apartadó	Remedios		Samaná	Norcasia	Victoria		Santa Marta	Ovejas		Puerto Nariño	Leticia					
<i>Br. leopoldoi</i>	-	-	-	-	2	-	2 (0,04)	-	-	-	-	-	-	-	-	2 (0,02)	
<i>Br. mesai</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	2 (0,04)	2 (0,02)	
<i>Mi. (Sau) atroclavata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	29	29 (0,64)	-	-	-	-	29 (0,64)	
<i>Mi. (Sau) trinidadensis</i>	35	-	35 (0,77)	-	-	-	-	-	-	72	72 (1,58)	-	-	-	-	107 (2,35)	
<i>Mi. (Mic) cayennensis cayennensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	1	1 (0,02)	41	41 (0,90)	-	-	-	-	42 (0,92)	
<i>Mi. (Mic) micropyga</i>	9	-	9 (0,20)	-	-	-	-	-	-	14	14 (0,31)	-	-	-	-	23 (0,50)	
<i>Mi. (Mic) chassigneti</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	4 (0,09)	4 (0,09)		
<i>Sc. sordellii</i>	-	-	-	-	-	-	-	1	1 (0,02)	-	-	12	11	23 (0,50)	24 (0,53)		
<i>Sc. preclara</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	142	0	142 (3,12)	142 (3,12)		
<i>Ev. (Eva) georgii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1 (0,02)	1 (0,02)		
<i>Ev. (Eva) saulensis</i>	-	-	-	2	1	-	3 (0,06)	-	-	-	-	6	-	6 (0,13)	9 (0,20)		
<i>Ev. (Ald) walkeri</i>	-	-	-	-	-	1	1 (0,02)	-	-	-	-	127	17	144 (3,16)	145 (3,18)		
<i>Ev. (Ald) dubitans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	33	33 (0,72)	-	-	-	33 (0,72)		
<i>Lu. (Lut) bifoliata</i>	31	-	31 (0,68)	23	4	25	52 (1,14)	-	-	-	-	-	-	-	-	83 (1,82)	
<i>Lu. (Lut) lichi</i>	-	2	2 (0,04)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2 (0,04)	
<i>Lu. (Hel) hartmanni</i>	-	-	-	70	13	70	153 (3,36)	-	-	-	-	-	-	-	-	153 (3,36)	
<i>Lu. (Hel) sanguinaria</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1 (0,02)	1 (0,02)		
<i>Lu. (Hel) tortura</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	-	7 (0,15)	7 (0,15)		
<i>Lu. (Trl) gomezzi</i>	-	10	10 (0,22)	17	2	33	52 (1,14)	4	4 (0,09)	62	62 (1,36)	-	-	-	-	128 (2,81)	
<i>Lu. (Trl) sherlocki</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	8 (0,18)	8 (0,18)		
<i>Lu. (Trl.) evangelistai</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	5	9 (0,20)	9 (0,20)		
<i>Pi. (Pif) nevesi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	3 (0,06)	3 (0,06)		
<i>Pi. (Pif) evansi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1531	1531 (33,59)	-	-	-	-	1531 (33,59)	

<i>Pi. (Pif) rangeliana</i>	1	-	1 (0,02)	-	-	-	-	-	-	21	21 (0,46)	-	-	-	22 (0,48)
<i>Pr. choti</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	41	-	41 (0,90)	41 (0,90)
<i>Pr. camposi</i>	-	-	-	1	-	1	2 (0,04)	-	-	-	-	-	-	-	2 (0,04)
<i>Pressatia sp.</i>	2	-	2 (0,04)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2 (0,04)
<i>Ty. triramula</i>	-	-	-	91	92	143	326 (7,15)	-	-	-	-	-	-	-	326 (7,15)
<i>Pa. (For.) aragaoi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	3 (0,06)	3 (0,06)
<i>Pa. (Xip.) dreisbachi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	3 (0,06)	3 (0,06)
<i>Pa. (For) pradobarrientosi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	3 (0,06)	3 (0,06)
<i>Pa. (For) carpenteri</i>	-	2	2 (0,04)	3	5	1	9 (0,20)	-	-	-	-	-	-	-	11 (0,24)
<i>Pa. (Psa) punctigeniculata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2 (0,04)	2 (0,04)
<i>Pa. (Psa) dendrophyla</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1 (0,02)	1 (0,02)
<i>Pa. (Psa) shannoni</i>	-	15	15 (0,33)	-	-	4	4 (0,09)	-	-	1	1 (0,02)	-	-	-	20 (0,44)
<i>Vi. furcata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1 (0,02)	1 (0,02)
<i>Ps. ayrozai</i>	-	-	-	19	4	1	24 (0,53)	-	-	-	-	-	-	-	24 (0,53)
<i>Ps. paraensis</i>	-	-	-	31	2	2	35 (0,77)	-	-	-	-	-	-	-	35 (0,77)
<i>Ps. carrerai carrerai</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1 (0,02)	1 (0,02)
<i>Ps. davisii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	4 (0,09)	4 (0,09)
<i>Ps. amazonensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	2 (0,04)	2 (0,04)
<i>Ps. geniculatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1 (0,02)	1 (0,02)
<i>Ps. hirsutus hirsutus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	1	4 (0,09)	4 (0,09)
<i>Ps. panamensis</i>	-	1	1 (0,02)	11	1	26	38 (0,83)	-	-	61	61 (1,34)	-	-	-	100 (2,19)
<i>Ny. trapedoi</i>	-	4	4 (0,09)	59	25	94	178 (3,90)	-	-	-	-	-	-	-	182 (3,99)
<i>Ny. yuilli yuilli</i>	-	-	-	88	8	6	102 (2,38)	-	-	-	-	1	4	5 (0,11)	107 (2,35)
<i>Ny. antunesi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	80	-	80 (1,76)	80 (1,76)
<i>Ny. umbratilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18	18 (0,39)	18 (0,39)
<i>Ny. yuilli pajoti</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	-	7 (0,15)	7 (0,15)
<i>Th. howardi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13	13 (0,28)	13 (0,28)
<i>Trichophoromyia sp.*</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	595	22	617 (13,54)	617 (13,54)
<i>Trichophoromyia sp. ♀</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	415	23	438 (9,61)	438 (9,61)
Total general	47	65	112 (2,48)	415	159	407	983 (21,57)	6	6 (0,13)	1865	1865 (40,92)	1461	133	1592 (34,93)	4558

* *Trichophoromyia* sp hace referencia a los machos de la nueva especie.

Anexo 2:

Número de individuos por géneros de Phlebotominae encontrados en cada uno de los municipios incluidos en el área de estudio

GÉNEROS	MUNICIPIOS POR DEPARTAMENTO																
	Antioquia		Total Antioquia	Caldas			Total Caldas	Magdalena		Total Magdalena	Sucre		Total Sucre	Amazonas		Total Amazonas	Total general
	Apartadó	Remedios		Samaná	Norcasia	Victoria		Santa Marta	Ovejas		Puerto Nariño	Leticia					
<i>Brumptomyia</i>	-	-	-	-	2	-	2	-	-	-	-	-	2	-	2	4	
<i>Micropygomyia</i>	44	-	44	-	-	-	-	1	1	156	156	2	2	4	205		
<i>Sciopenyia</i>	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	153	12	165	166		
<i>Evandromyia</i>	-	-	-	2	1	1	4	-	-	33	33	133	18	151	188		
<i>Lutzomyia</i>	-	43	43	110	19	128	257	4	4	62	62	12	13	25	391		
<i>Pintomyia</i>	1	-	1	-	-	-	-	-	-	1552	1552	-	-	-	1556		
<i>Pressatia</i>	2	-	2	1	-	1	2	-	-	-	-	41	-	41	45		
<i>Tryramula</i>	-	-	-	91	92	143	326	-	-	-	-	-	-	-	326		
<i>Psathyromyia</i>	-	17	17	3	5	5	13	-	-	1	1	7	3	10	43		
<i>Viannanyia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1		
<i>Psychodopygus</i>	-	1	1	61	7	29	77	-	-	61	61	13	1	14	171		
<i>Nyssomyia</i>	-	4	4	147	33	100	280	-	-	-	-	85	25	110	407		
<i>Trichophoromyia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1012	58	1068	1055		
Total general	47	65	110	415	159	407	983	6	6	1865	1865	1461	133	1592	4558		

<i>Sc_preclara</i> _AMA31.1	.T.....T.A.....T.....CT.A.C.....T...CACA.A.A.AT.....C.....
<i>Sc_preclara</i> _AMA2.2	.T.....T.A.....T.....CT.A.C.....T...CACA.A.A.AT.....C.....
<i>Sc_preclara</i> _AMCT9.7	.T.....T.A.....T.....CT.A.C.....T...CACA.A.A.AT.....C.....
<i>Sc_preclara</i> _AMB3.2	.T.....T.A.....T.....CT.A.C.....T...CACA.A.A.AT.....C.....
<i>Sc_preclara</i> _AMA26.1	.T.....T.A.....T.....CT.A.C.....T...CACA.A.A.AT.....C.....
<i>Lu_hartmanni</i> _CAL7.4T...T...G...C...T...A...T...T...A...T...T...T.....C.....
<i>Lu_hartmanni</i> _CALB19.3T...T...G...C...T...A...T...T...A...T...T...T.....C.....
<i>Lu_hartmanni</i> _CALB27.1T...T...G...C...T...A...T...T...A...T...T...T.....C.....
<i>Lu_lichyi</i> _REM12	.A.....T...C...A.T.....C.....T...T...C...T...G...G...T.....C.....
<i>Lu_lichyi</i> _REM11	.A.....T...T...A.T.....C.....T...T...C...T...G...G...T.....C.....
<i>Lu_bifoliata</i> _REM48T.C.....T.G.T.T.....C.....T.C.T.....A.A.T.....T...C.....
<i>Lu_bifoliata</i> _REM61T.C.....T.G.T.T.....C.....T.C.T.....A.A.T.....T...C.....
<i>Lu_bifoliata</i> _CALB21.2T.C.....T.G.T.T.....C.....T.C.T.....A.A.T.....T...C.....
<i>Lu_longipalpis</i> _HON2.10T.....G...T.....T.A.....C...C.G.T.T.A.AT.....T.....C.....
<i>Lu_longipalpis</i> _HON2.4T.....G...T.....T.A.....C...C.G.T.T.G.AT.....T.....C.....
<i>Lutzomyia</i> _(Tr1)_AMB8.1	.T.....A.T.....T.C.....A.....T...T.C.T.T.....CT.....C.....
<i>Lutzomyia</i> _(Tr1)_AMCK18-18.2	.T.....A.T.....T.C.....A.....T...T.C.T.T.....CT.....C.....
<i>Lu_sherlocki</i> _AMCK18-7.1T...T...T...T.A...T.T.T...C...A...T.....C.....
<i>Lu_sherlocki</i> _AMCK18-18.1T...T...T...T.A...T.T.T...C...A...T.....C.....
<i>Lu_sherlocki</i> _AMCK11-19.5T...T...T...T.A...T.T.T...C...A...T.....C.....
<i>Lu_sherlocki</i> _AMCK11-19.4T...T...G...T...T.A...T.T.T...C...A...CT.....C.....
<i>Lu_gomezi</i> _SOA35	.A.....A...T...C...TC.....CT.A.....T...T.....A...CT.....T.....
<i>Lu_gomezi</i> _REM7	.A.....A...T...C...TC.....CT.A.....T...T.....A...CT.....T...C...C.....
<i>Lu_gomezi</i> _REM71	.A.....A...T...C...TC.....CT.A.....T...T.....A...CT.....T.....
<i>Lu_gomezi</i> _REM68	.A.....A...T...C...TC.....CT.A.....T...T.....A...CT.....T.....
<i>Lu_gomezi</i> _SAN1.3	.A.....A...T...C...TC.....CT.A.....T...T.....A...CT.....T.....
<i>Lu_gomezi</i> _CAL5.3	.A.....A...T...C...CC.....CT.A.....T...T.....A...CT.....T...C...C.....
<i>Pi_evansi</i> _HON2.21	.A.C...T.....T.C.....T...T...A...T.A...T...T...T.....
<i>Pi_evansi</i> _HON2.3	.A.C...T.....T.C.....T...T...A...T.A...T...T...T.....
<i>Pi_evansi</i> _NIC2.8	.A.C...T.....T.C.....T...T...A...T.A...T...T...T.....
<i>Pi_evansi</i> _SOA101	.A.C...T.....G...T...T...C.....T...T...A...A...T...A...T...T...T.....
<i>Pi_evansi</i> _SOA110	.A.C...T.....G...T...T...C.....T...T...A...T...A...T...T...T.....
<i>Pi_evansi</i> _SOA10	.A.C...T.....G...T...T...C.....T...T...G...A...T...A...T...T...C.....
<i>Pi_evansi</i> _SOA18	.A.C...T.....G...T...T...C.....T...T...A...T...A...T...T...T.....
<i>Pi_evansi</i> _SOA21	.A.C...T.....G...T...T...C.....TA...T...A...T...A...T...T...T.....
<i>Pi_evansi</i> _SOA24	.A.C...T.....G...T...T...C.....T...T...A...T...A...T...T...T.....
<i>Pi_evansi</i> _SOA25	.A.C...T.....G...T...T...C.....T...T...A...T...A...T...T...T.....
<i>Pi_evansi</i> _SOA26	.A.C...T.....G...T...T...C.....T...T...A...T...A...T...T...T.....
<i>Pi_evansi</i> _SOA27	.A.C...T.....G...T...T...C.....T...T...A...T...A...T...T...T.....
<i>Pi_evansi</i> _SOA28	.A.C...T.....G...T...T...C.....T...T...A...T...A...T...T...T.....
<i>Pi_evansi</i> _SOA2	...C...T.....G...G...T...T...C.....T...T...A...T...A...T...T...T.....
<i>Pi_evansi</i> _SOA3	.A.C...T.....G...T...T...C.....T...T...A...T...A...T...T...T.....
<i>Pi_evansi</i> _SOA40	.A.C...T.....G...T...T...C.....T...T...A...T...A...T...T...T.....
<i>Pi_evansi</i> _SOA41	.A.C...T.....G...T...T...C.....T...T...A...T...A...T...T...T.....
<i>Pi_evansi</i> _SOA42	.A.C...T.....G...T...T...C.....T...T...A...T...A...T...T...T.....
<i>Pi_evansi</i> _SOA5	.A.C...T.....T...T...C.....T...T...A...T...A...T...T...T.....
<i>Pi_evansi</i> _SOA6	.A.C...T.....G...T...T...C.....T...T...A...T...A...T...T...T.....
<i>Pi_evansi</i> _SOA7	.A.C...T.....G...T...T...C.....T...T...A...T...A...T...T...T.....

<i>Pi_rangeliana_SOA31</i>	.A.....T.....T.....T.CC.....A.....T.T.....T.A.A.AT.....G.....C.....C.....
<i>Pr_choti_AMA54.2</i>	.A.C...T.....C...T.TC.....C.....T.T.....A.A..T.....C.....
<i>Pr_choti_AMA68.1</i>	.A.C...T.....C...T.TC.....C.....T.....A.A..T.....C.....
<i>Pr_choti_AMA58.1</i>	.A.C...T.....C...T.TC.....C.....T.....A.A..T.....C.....
<i>Pr_choti_AMA67.1</i>	.A.C...T.....C...T.TC.....C.....T.....A.A..T.....C.....
<i>Pr_choti_AMCD13.1</i>	.A.C...T.....C...T.TC.....C.....T.....A.A..T.....C.....
<i>Pr_choti_AMCD13.2</i>	.A.C...T.....C...T.TC.....C.....T.....A.A..T.....C.C.....
<i>Pr_choti_AMCP8.1</i>	.A.C...T.....C...T.TC.....C.....T.....A.A..T.....C.....
<i>Pr_choti_AMA54.1</i>	.A.C...T.....C...T.TC.....C.....T.....A.A..T.....C.....
<i>Pr_camposi_APAA2.1</i>	.A.C...T.....G.T.CC.G.....C.....T.....A.A..T.....C.....
<i>Pr_camposi_CAL28.3</i>	.A.C...T.....G.C.CC.....C.....T.....A.A..T.....C.....
<i>Ty_triramula_CAL18.3</i>	.A.C...T.A.T.....T.TC.T.....C.....T.C.T.....A.A..T.....T.....
<i>Ty_triramula_CAL33.1</i>	.A.C...T.A.T.....T.TC.T.....C.....T.C.T.G.A.....G.A..T.....T.....
<i>Ev_dubitans_PAN1.2</i>	.A.C...T.A.....C.T.C.....T.A.....T.C.T.....C.T.T.A.AT.....
<i>Ev_walkeri_AMA32.1</i>	.A.....T.A.....T.CC.....C.A.....T.....T.....C.T.A.A.C..T.....C.....
<i>Ev_walkeri_AMA73.1</i>	.A.....T.A.....G.....T.CC.....C.A.....T.....T.....C.T.A.....C..T.....C.....
<i>Ev_walkeri_AMCT8.1</i>	.A.....T.A.....T.CC.....C.A.....T.....T.....C.T.A.A.C..T.....C.....
<i>Ev_walkeri_AMCT8.3</i>	.A.....T.A.....T.C.....C.A.....T.....T.....C.T.A.A.C..T.....C.....
<i>Ev_walkeri_AMCT9.6</i>	.A.....T.A.....T.CC.....C.A.....T.....T.....C.T.A.A.C..T.....C.....
<i>Ev_walkeri_AMCP3.3</i>T.A.G.....T.T.....C.A.....T.....T.....C.T.A.A.C..T.....C.....
<i>Ev_walkeri_AMCK11-2.1</i>	.A.....T.A.....G.....T.CC.....C.A.....T.....T.....C.T.A.....C..T.....C.....
<i>Ev_georgii_AMA79.3</i>	.T.C...T.A.T.....T.C.....T.A.C.....C...T.A.....A.A..T.G...AG...C.....
<i>Ev_saulensis_AMB7.1</i>	.A.A...T.A.T...A.T.G.T.CC.....T.A.....T.....G.....A.A..C..T.....C.....
<i>Pa_punctigeniculata_AMCK18-5.1</i>T.....C.....C.T.....T.A.....T.....A.T.A.A.....T.....
<i>Pa_punctigeniculata_AMCK18-5.2</i>T.....C.....C.T.....T.A.....T.....G.T.A.A.....T.....
<i>Pa_punctigeniculata_AMCK11-17.</i>T.....C.....C.T.....T.A.....T.....G.T.A.A.....T.....
<i>Pa_carpanteri_CAL3.2</i>T.C.....T.T.T.....CT.A.....T.....T.C.T.A.G..T.....C.....
<i>Pa_aragaoi_AMCK18-17.1</i>	.T.....T.....C.T.....T.....T.....T.....T.T.A.AT.....T.....C.....
<i>Pa_aragaoi_AMA53.1</i>	.T.....T.....C.T.....T.....T.....T.....T.T.A.AT.....T.....C.....
<i>Pa_shannoni_REM67</i>	.C.....T.A.....C.....A.....A.T.T.....AC..T.....T.....T.....
<i>Pa_shannoni_REM34</i>	.C.....T.A.....C.....A.....A.T.T.....AC..T.....T.....T.....
<i>Pa_dendrophyla_AMA48.1</i>	.A.C...T.A.....T.A.....GT.....A.....T.....C.G.....
<i>Ps_serie_davisi_AMCT9.13</i>	.A.....T.C.....T.T.....T.A.....T.....T.T.A.AT.....AC.....
<i>Ps_amazonensis_AMB3.1</i>	.A.....T.C.....T.T.....CT.A.....T.....G.T.T.A.AT.....C.....AC.....
<i>Ps_serie_guyanensis_AMA40.1</i>	.T.....T.....G.T.T.....T.A.....TA.....T.A.T.A.A.C..T.....C.....
<i>Ps_panamensis_COR1.1</i>	.A.A...T.....G...T.G.T.T.....T.A.....T.T.T.....T.A.A.....T.....
<i>Ps_panamensis_PAN4.2</i>	.A.A...T.....G...T.T.....T.A.....T.T.T.....T.A.A.....T.....
<i>Ps_panamensis_PAN3.4</i>	.A.A...T.....G...T.T.....T.A.....T.T.T.....T.A.A.....T.....
<i>Ps_panamensis_CAL5.2</i>	.A.A...T.....T.G.T.T.....T.A.....T.T.T.....G.T.A.....T.....
<i>Ps_panamensis_CALB24.1</i>	.A.A...T.....T.G.T.T.....T.A.....T.T.T.....G.T.A.....T.....
<i>Psychodopygus_sp_AMB9.1</i>	-----T.....T.C.....A.....C.....T.A.....A.A.AT.....T.....C.....
<i>Ps_hirsutus_hirsutus_AMA51.1</i>	-----C.T.T.....T.A.....T.A.T.T.A.A.....C.C.....
<i>Ps_hirsutus_hirsutus_AMA47.2</i>T.A.....C.T.T.....T.A.....T.G.T.T.G.A.....C.C.....
<i>Ps_ayrozai_CAL28.2</i>T.C.C...T.....T.T.....T.A.....T.....T.A.....G.G.AT.....T.....C.....
<i>Ps_ayrozai_CAL33.3</i>T.C.C...T.....T.T.....T.A.....T.....T.A.....G.G.AT.....T.....C.....
<i>Ps_ayrozai_CAL31.2</i>T.C.C...T.....T.T.....T.A.....T.....T.A.....G.G.AT.....T.....C.....
<i>Ny_antunesi_AMA22.1</i>	.A.....T.A.....T.T.C.....T.A.....T.....A.T.T.A.CT.....T.....
<i>Ny_antunesi_AMA10.3</i>	.A.....T.A.....T.T.C.....T.A.....T.....A.T.T.A.CT.....T.....

<i>Ny_antunesi_AMB11.1</i>	.A.....T.A.....T.T.C.....T.A.....T..A.T.T.A.CT.....T.....
<i>Ny_antunesi_AMA10.2</i>	.A.....T.A.....T.T.C.....T.A.....T..A.T.T.A.CT.....T.....
<i>Ny_antunesi_AMAA8.3</i>	.A.....T.A.....T.T.C.....T.A.....T..A.T.T.A.CT.....T.....
<i>Ny_antunesi_AMB1.2</i>	.A.....T.A.....T.T.C.....T.A.....T..A.T.T.A.CT.....T.....
<i>Ny_antunesi_AMA45.1</i>	.A.....T.A.....T.T.C.....T.A.....T..A.T.T.A.CT.....T.....
<i>Ny_antunesi_AMA4.2</i>	.A.....T.A.....T.T.C.....T.A.....T..A.T.T.A.CT.....T.....
<i>Ny_antunesi_AMA8.1</i>	.A.....T.A.....T.T.C.....T.A.....T..A.T.T.A.CT.....T.....
<i>Ny_trapidoi_CAL18.4</i>	.T.....T.A.....C..C.....A.....T.G.....G.C..T.....C.....
<i>Ny_trapidoi_CALB10.2</i>	.T.....T.A.....C..C.....A.....T.....G.....T.....
<i>Ny_trapidoi_REM72</i>	.T.....T.A.....C..C.....A.....T.....A.C..T.....
<i>Ny_trapidoi_REM69</i>	.T.....T.A.....C..C.....A.....T.....G.C..T.....
<i>Ny_trapidoi_COR4.1</i>	.T.....T.A.....C..C.....A.....T.G.....G.....T.....
<i>Ny_trapidoi_COR4.2</i>	.T.....T.A.....C..C.....A.....T.....G.C..T.....
<i>Ny_yuilli_yuilli_REM66</i>	.A.....T.A.....T.TC.....T.A.....T..A.T.T.A.CT.....T.....
<i>Ny_yuilli_yuilli_CAL14.3</i>	.A.....T.A.....T.TC.....T.A.....T..A.T.T.A.CT.....T.....
<i>Ny_yuilli_yuilli_CAL7.2</i>	.A.....T.A.....T.TC.....T.A.....T..A.T.T.A.CT.....T.....
<i>Ny_yuilli_yuilli_AMA57.1</i>	.A.....T.A.....T.TC.....T.A.....T..A.T.T.A.CT.....T.....
<i>Ny_yuilli_yuilli_AMA81.2</i>	.A.....T.A.....T.TC.....T.A.....T..A.T.T.A.CT.....T.....
<i>Ny_yuilli_yuilli_AMCK11-15.2</i>	.A.....T.A.....T.TC.....T.A.....T..A.T.T.A.CT.....T.....
<i>Ny_yuilli_yuilli_AMCK11-1.3</i>	.A.....T.A.....T.TC.....T.A.....T..A.T.T.A.CT.....T.....
<i>Ny_yuilli_yuilli_AMCK11-17.2</i>	.A.....T.A.....T.TC.....T.A.....T..A.T.T.A.CT.....T.....
<i>Ny_yuilli_pajoti_AMCD5.2</i>	.A.....T.A.....C..T.C.....T.A.....T..A.T.T.A.CT.....T.....
<i>Ny_yuilli_pajoti_AMCT9.1</i>	.A.....T.A.....T.T.C.....T.A.....T..A.T.T.A.CT.....T.....
<i>Ny_yuilli_pajoti_AMA5.1</i>	.A.....T.A.....T.T.C.....T.A.....T..A.T.T.A.CT.....T.....
<i>Ny_ylephiletor_COR7.1</i>	.C.....T.A.....C..T.C.....T.A.....T.T.T..A..T...T.....C.....
<i>Ny_umbratilis_AMA79.1</i>	.A.....T.A.....T..C.....T.A.....T..G.G.T.T.A.CT.....T.....
<i>Ny_umbratilis_AMCK11-19.1</i>	.A.....T.A.....T..C.....T.A.....T..G.T.T.A.CT.....T.....
<i>Ny_umbratilis_AMCK11-17.5</i>	.A.....T.A.....T..C.....T.A.....T..G.T.T.A.CT.....T.....
<i>Ny_umbratilis_AMA75.2</i>	.A.....T.A.....T..C.....T.A.....T..A.T.T.A.CT.....T.....
<i>Ny_umbratilis_AMCK11-17.6</i>	.A.....T.A.....T..C.....T.A.....T..G.T.T.A.CT.....T.....
<i>Ny_umbratilis_AMCK11-19.3</i>	.A.....T.A.....T..C.....T.A.....T..G.T.T.A.CT.....T.....
<i>Ny_umbratilis_AMCK11-17.4</i>	.A.....T.A.....T..C.....T.A.....T..G.T.T.A.CT.....T.....
<i>Trichophoromyia_AMA4.3</i>	.T.....T.A.....T.T.CC.....T.A.....T.T.C.T.....T.....C.....
<i>Trichophoromyia_AMA2.1</i>	.T.....T.A.....T.T.CC.....T.A.....T.T.C.T.....T.....C.....
<i>Trichophoromyia_AMCT8.2</i>	.T.....T.A.....T.T.CC.....T.A.....T.T.C.T.....T.....C.....
<i>Trichophoromyia_AMA3.1</i>	.T.....T.A.....T.T.CC.....T.A.....T.T.C.T.....T.....C.....
<i>Trichophoromyia_AMCT9.8</i>	.T.....T.A.....T.T.CC.....T.A.....T.T.C.T.....T.....C.....
<i>Trichophoromyia_AMCK11-2.2</i>	.T.....T.A.....T.T.CC.....T.A.....T.T.C.T.....T.....C.....
<i>Trichophoromyia_AMA73.2</i>	.T.....T.A.....T.T.CC.....T.A.....T.T.C.T.....T.....C.C.....
<i>Th_howardi_AMA75.1</i>	.T.....T.A.....T.T.CC.....T.A.....T.T.C.T.....T.....C.....
<i>Th_howardi_AMCK11-15.3</i>	.T.....T.A.....T.T.CC.....T.A.....T.T.C.T.....T.....C.....

Lu_sherlocki_AMCK11-19.5C.....A...T.T.....A.....T.A.C.....G..
Lu_sherlocki_AMCK11-19.4C.....A...T.T.....A.....T.A.C.....G..
Lu_gomezi_SOA35	...A.A...T.....C.T.....G.G.....T.A.C.....G..
Lu_gomezi_REM7	...A.A...T.....T.T.....A.....T.A.C.....G..
Lu_gomezi_REM71	...A.A...T.....C.T.....A.....T.A.C.....G..
Lu_gomezi_REM68	...A.A...T.....C.T.....A.G.....T.A.C.....G..
Lu_gomezi_SAN1.3	...A.A...T.....C.T.....A.....T.A.C.....G..
Lu_gomezi_CAL5.3	...A.A...T.....T.T.....A.....T.A.C.....G.G..
Pi_evansi_HON2.21T.T.....C.A...T.....A.....T.T.A.A...A...G..
Pi_evansi_HON2.3T.T.....C.A...T.....A.....T.T.A.A...A...G..
Pi_evansi_NIC2.8T.T.....C.A...T.....A.....T.T.A.G...A...G..
Pi_evansi_SOA101C...C.....A.....T.....A.....T.A.G.C.A.....
Pi_evansi_SOA110C...C.....A.....T.....A.....T.A.G.C.A.....
Pi_evansi_SOA10C...C.....A.....T.....A.....T.A.G.C.A.....
Pi_evansi_SOA18C...C.....A.....T.....A.....T.A.G.C.A.....
Pi_evansi_SOA21C...C.....A.....T.....A.....T.A.G.C.A.....
Pi_evansi_SOA24C...C.....A.....T.....A.....T.A.G.C.A.....
Pi_evansi_SOA25C...C.....A.....T.....A.....G.A.A.C.A.....
Pi_evansi_SOA26C...C.....A.....T.....A.....T.A.G.C.A.....
Pi_evansi_SOA27C...T.....A.....T.....A.....T.A.G.C.A.....
Pi_evansi_SOA28C...T.....A.....T.....G.....T.A.G...A.....
Pi_evansi_SOA2C...C.....A.....T.....A.....G.A.A.C.A.....
Pi_evansi_SOA3C...C.....A.....T.....A.....T.A.G.C.A...G..
Pi_evansi_SOA40C...C.....A.....T.....A.....T.A.G.C.A.....
Pi_evansi_SOA41C...C.....A.....T.....G.....T.A.A.C.A.....
Pi_evansi_SOA42C...C.....A.....T.....A.....T.A.G.C.A.....
Pi_evansi_SOA5C...C.....A.....T.....A.....T.A.G.C.A...G..
Pi_evansi_SOA6C...C.....A.....T.....A.....T.A.G.C.A.....
Pi_evansi_SOA7C...C.....A.....T.....A.....T.A.G.C.A.....
Pi_rangeliana_SOA31T.T.....A.T.G...G..
Pr_choti_AMA54.2	T.....T.....C.....T.T.....A.....T.T.A.C...A.....
Pr_choti_AMA68.1	T.....T.....C.....T.T.....A.....T.T.A.C...A.....
Pr_choti_AMA58.1	T.....T.....C.....T.T.....A.....T.T.A.C...A.....
Pr_choti_AMA67.1	T.....T.....C.....T.T.....A.....T.T.A.C...A.....
Pr_choti_AMCD13.1	T.....T.....C.....T.T.....A.....T.T.A.C...A.....
Pr_choti_AMCD13.2	T.....T.....C.....T.T.....A.....T.T.A.C...A.....
Pr_choti_AMCP8.1	T.....T.....C.....T.T.....A.....T.T.A.C...A.....
Pr_choti_AMA54.1	T.....T.....C.....T.T.....A.....T.T.A.C...A.....
Pr_camposi_APAA2.1	T.....T.....C.C.....T.T.....A.....T.T.A.C...A.....
Pr_camposi_CAL28.3	T.....T.....C.C.....T.T.....A.....T.T.A.C...A.....
Ty_triramula_CAL18.3	...A...C.C.....A...T.T.....A.....G.T...C.CT.A.....
Ty_triramula_CAL33.1	...A...C.C.....A...T.T.....A.....T...C.CT.A.....
Ev_dubitans_PAN1.2	T...A.A.A...T...T.....A...T.T.....A.....T.T.T.A.C...T.A...G..T
Ev_walkeri_AMA32.1T.....C.....A.....T.T.....A.....T.A...T.A.....
Ev_walkeri_AMA73.1T.....C.....A.....T.T.....A.....T.A...T.A.....
Ev_walkeri_AMCT8.1T.....C.....A.....T.T.....A.....T.A...T.A.....
Ev_walkeri_AMCT8.3T.....C.....A.....T.T.....A.....T.A...T.A.....
Ev_walkeri_AMCT9.6T.....C.....A.....T.T.....A.....T.A...T.A.....

<i>Ev_walkeri_AMCP3.3</i>T.....C.....T.T.....A.....T.A.....T.A..C.....T
<i>Ev_walkeri_AMCK11-2.1</i>C.....T.....C.....A.....T.T.....A.....T.A.....T.A.....
<i>Ev_georgii_AMA79.3</i>	T.....C.C.....C.....A.....C.T.....A.G.....T.....A.C.....A.C.....
<i>Ev_saulensis_AMB7.1</i>	T.....A.....C.....T.....C.C.....A.....T.....A.....T.....A.G..AT.A..C.T.G..T
<i>Pa_punctigeniculata_AMCK18-5.1</i>A.....C.....T.T.....T.....A.C..AT.A.....G..T
<i>Pa_punctigeniculata_AMCK18-5.2</i>A.....C.....T.T.....T.....T.....A.C..AT.A.....G..T
<i>Pa_punctigeniculata_AMCK11-17.</i>A.....C.....T.T.....T.....T.....A.C..AT.A.....G..T
<i>Pa_carpenteri_CAL3.2</i>A.....T.T.....A.....T.T.....A.....G.....
<i>Pa_aragaoi_AMCK18-17.1</i>	T.....A.....T.....C.....A.....T.T.....A.....T.T.A.A..T.A.....G..
<i>Pa_aragaoi_AMA53.1</i>	T.....A.....T.....C.....A.....T.T.....A.....T.T.A.A..T.A.....G..
<i>Pa_shannoni_REM67</i>A.C.....T.....C.....T.....A.....T.....T.A.C.....A..C.T.G..
<i>Pa_shannoni_REM34</i>A.C.....T.....C.....T.....A.....T.....T.A.C.....A..C.T.G..
<i>Pa_dendrophylla_AMA48.1</i>A.C.C.T.....A.....T.....T.....T.A.....
<i>Ps_serie_davisi_AMCT9.13</i>	T.....A.....T.C.....T.....A.G.....T.T.....G.....AT.A.....A
<i>Ps_amazonensis_AMB3.1</i>	T.....A.A.....T.C.....T.....A.G.....T.T.....T.A.....A.A..C.....T
<i>Ps_serie_guyanensis_AMA40.1</i>A.A.A.....T..A.T.....T.....A.....T.....C.....AT.A.....T
<i>Ps_panamensis_COR1.1</i>A.A.....T.....T.....A.....T.T.....A.....T.T.....T.A.....G..T
<i>Ps_panamensis_PAN4.2</i>A.A.....T.....T.....A.....T.T.....A.....T.T.....T.A.....
<i>Ps_panamensis_PAN3.4</i>A.A.....T.....T.....T.....T.....A.....T.T.....T.A.....
<i>Ps_panamensis_CAL5.2</i>A.A.....T.....T.....A.....T.T.....A.G.....T.T.G.....C..T.A.....T
<i>Ps_panamensis_CALB24.1</i>A.A.....T.....T.....A.....T.T.....A.G.....T.T.G.....C..T.A.....T
<i>Psychodopygus_sp_AMB9.1</i>A.A.A.....T.....T.....A.....T.....C.G.A.....
<i>Ps_hirsutus_hirsutus_AMA51.1</i>	..C.A.A.....T.....T.....T.....A.....T.....T.A.G.....G..A
<i>Ps_hirsutus_hirsutus_AMA47.2</i>	..C.A.A.....T.....T.....T.....A.....T.....T.A.G.....G..A
<i>Ps_ayrozai_CAL28.2</i>A.A.A.....T.....T.....G.....T.....C.A.A.....G..T
<i>Ps_ayrozai_CAL33.3</i>A.A.A.....T.....T.....G.....T.....C.A.A.....G..T
<i>Ps_ayrozai_CAL31.2</i>A.A.A.....T.....T.....A.....T.....C.A.A.....G..T
<i>Ny_antunesi_AMA22.1</i>C.....T.....T.T.....A.....T.T.....T.A.C.....T.A.....G..A
<i>Ny_antunesi_AMA10.3</i>C.....C.....T.....T.....A.G.....T.T.....T.A.C.....T.A.....G..A
<i>Ny_antunesi_AMB11.1</i>C.....T.....T.T.....A.....T.T.....T.A.C.....T.A.....G..A
<i>Ny_antunesi_AMA10.2</i>C.....T.....T.T.....A.....T.T.....T.A.C.....T.A.....G..A
<i>Ny_antunesi_AMAA8.3</i>C.....T.....T.T.....A.....T.T.....T.A.C.....T.A.....G..A
<i>Ny_antunesi_AMB1.2</i>C.....T.....T.T.....A.....T.T.....T.A.C.....T.A.....G..A
<i>Ny_antunesi_AMA45.1</i>C.....T.....T.T.....A.....T.T.....T.A.C.....T.A.....G..A
<i>Ny_antunesi_AMA4.2</i>C.....T.....T.T.....A.....T.T.....T.A.C.....T.A.....G..A
<i>Ny_antunesi_AMA8.1</i>C.....T.....T.T.....A.....T.T.....T.A.C.....T.A.....G..A
<i>Ny_trapidoi_CAL18.4</i>	T..C.C.A.C.....C.....C.....T.T.....A.....T.A.C.....A.....T
<i>Ny_trapidoi_CALB10.2</i>	T..C.C.A.C.....C.....C.....T.T.....A.....T.A.C.....A.....T
<i>Ny_trapidoi_REM72</i>	T..C.C.A.C.....C.....C.....T.T.....A.....T.A.C.....A.....T
<i>Ny_trapidoi_REM69</i>	T..C.C.A.C.....C.....C.....T.T.....A.....T.A.C.....A.....T
<i>Ny_trapidoi_COR4.1</i>	T..C.C.A.C.....C.....C.....T.T.....A.G.....T.A.C.....A.....G..G..T
<i>Ny_trapidoi_COR4.2</i>	T..C.C.A.C.....C.....C.....T.T.....C.A.....T.A.C.....A.....G..G..
<i>Ny_yuilli_yuilli_REM66</i>C.....T.....T.T.....A.....T.T.....T.A.A..CT.A.....G..A
<i>Ny_yuilli_yuilli_CAL14.3</i>C.....T.....T.T.....A.....T.T.....T.A.A..CT.A.....G..A
<i>Ny_yuilli_yuilli_CAL7.2</i>C.....T.....T.T.....A.....T.T.....T.A.A..CT.A.....G..A
<i>Ny_yuilli_yuilli_AMA57.1</i>C.....T.....T.T.....A.....T.T.....T.A.A..T.A.....G..A
<i>Ny_yuilli_yuilli_AMA81.2</i>C.....T.....T.T.....A.....T.T.....T.A.A..T.A.....G..A
<i>Ny_yuilli_yuilli_AMCK11-15.2</i>C.....T.....T.T.....A.....T.T.....T.A.A..T.A.....G..A

<i>Mi_microphyga</i> _APAA12.7C.....T.....T.....T.....G..AT.A..T..AT.....A.....T.....
<i>Mi_chassigneti</i> _AMA48.3	..A.....G.....T..T.....T..AT.A..A..A..T..A..T..AT.....T..A.....A.....G.....
<i>Mi_chassigneti</i> _AMCK11-17.7	..A.....T.....T..T.....T..AT.A..A..A..T..A..T..AT.....T..A.....A.....
<i>Mi_chassigneti</i> _AMA48.4	..A.....T.....T..T.....T..AT.A..A..A..T..A..T..AT.....T..A.....A.....
<i>Sc_sordellii</i> _AMB18.1C.....GT..A..T..C..C.....A..T..A..C.....A.....T..T.....
<i>Sc_sordellii</i> _AMB18.2C.....GT..A..T..C..C.....A..T..A..C.....A.....T.....T.....
<i>Sc_sordellii</i> _AMCK11-15.1C.....GT..A..T..C..C.....A..T..A..C.....A.....T.....T.....
<i>Sc_preclara</i> _AMA31.1T.....C.....T..AT.A..C..C.....T..A..C..TT.....A.....G.....T..T.....
<i>Sc_preclara</i> _AMA2.2T.....C.....T..AT.A..C..C.....T..A..C..TT.....A.....G.....T..T.....
<i>Sc_preclara</i> _AMCT9.7T.....C.....T..AT.A..C..C.....T..A..C..TT.....A.....G.....T..T.....
<i>Sc_preclara</i> _AMB3.2T.....C.....T..AT.A..C..C.....T..A..C..TT.....A.....G.....T..T.....
<i>Sc_preclara</i> _AMA26.1T.....C.....T..AT.A..C..C.....T..A..C..TT.....A.....G.....T..T.....
<i>Lu_hartmanni</i> _CAL7.4	..A.....A.....T.....T..A..A..A..T..A..CT..AT..C..T.....A.....A.....
<i>Lu_hartmanni</i> _CALB19.3	..A.....A.....T.....T..A..A..A..T..A..CT..AT..C..T.....A.....A.....
<i>Lu_hartmanni</i> _CALB27.1	..A.....A.....T.....T..A..A..A..T..A..CT..AT..C..T.....A.....A.....
<i>Lu_lichyi</i> _REM12	..A.....T.....T.....G.....T.....AT..A.....AT.....T.....A.....
<i>Lu_lichyi</i> _REM11	..A.....T.....T.....G.....T.....AT..A.....AT.....T.....A.....
<i>Lu_bifoliata</i> _REM48	..A.....T.....T.....CT..A.....TT..C..T.....A.....A.....
<i>Lu_bifoliata</i> _REM61	..A.....T.....T.....CT..A.....TT..C..T.....A.....A.....
<i>Lu_bifoliata</i> _CALB21.2	..A.....T.....T.....CT..A.....TT..C..T.....A.....A.....
<i>Lu_longipalpis</i> _HON2.10T.....T.....C.....T..A.....A..T..A..T..AT.....T..A..T.....A.....
<i>Lu_longipalpis</i> _HON2.4T.....T.....C.....T..A.....A..T..A..T..AT.....T..A..T.....A.....
<i>Lutzomyia</i> _(Tr1)_AMB8.1	..A.....T.....T.....AT..A..C.....AT..A.....C..T..T.....C.....
<i>Lutzomyia</i> _(Tr1)_AMCK18-18.2	..A.....T.....T.....AT..A..C.....AT..A.....C..T..T.....C.....
<i>Lu_sherlocki</i> _AMCK18-7.1	..A.....T..C.....C.....T..AT..A..C..G..A.....T..A..TC..T.....T.....G..A.....
<i>Lu_sherlocki</i> _AMCK18-18.1	..A.....T..C.....C.....T..AT..A..C..G..A.....T..A..TC..T.....T.....G..A.....
<i>Lu_sherlocki</i> _AMCK11-19.5	..A.....T..C.....C.....T..AT..A..C..G..A.....T..A..TC..T.....T.....G..A.....
<i>Lu_sherlocki</i> _AMCK11-19.4	..A.....T..C.....C.....T..AT..A..C..G..A.....T..A..TC..T.....T.....G..A.....
<i>Lu_gomezi</i> _SOA35	..A.....T..C..T.....T.....T..A..C..C.....C.....TC..T.....A.....A.....
<i>Lu_gomezi</i> _REM7	..A.....T..C..T.....T.....T..A..C..C.....C.....TC..T.....A.....A.....
<i>Lu_gomezi</i> _REM71	..A.....T..C..T.....T.....T..A..C..C.....C.....TC..T.....A.....A.....
<i>Lu_gomezi</i> _REM68	..A.....T..C..T.....T.....T..A..C..C.....C.....TC..T.....A.....A.....G.....
<i>Lu_gomezi</i> _SAN1.3	..A.....T..C..T.....T.....T..A..C..C.....C.....TC..T.....A.....A.....
<i>Lu_gomezi</i> _CAL5.3	..A.....T..C..T.....T.....T..A..C..C..A.....C.....TC..T.....A.....A.....
<i>Pi_evansi</i> _HON2.21T.....T.....T.....T..AT..A..C..C.....T..A..C..T..T.....T..T.....A.....
<i>Pi_evansi</i> _HON2.3T.....T.....T.....T..AT..A..C..C.....T..A..C..T..T.....T..T.....A.....G.....
<i>Pi_evansi</i> _NIC2.8T.....T.....T.....T..AT..A..C..C.....T..A..C..T..T.....T..T.....A.....
<i>Pi_evansi</i> _SOA101T.....T.....T.....T..A..T.....T..A..T..T.....T.....G..A.....A..G.....
<i>Pi_evansi</i> _SOA110T.....T.....T.....T..A..T.....T..A..T..T.....T.....G..A.....A..G.....
<i>Pi_evansi</i> _SOA10T.....T.....T.....T..A..T.....T..A..T..T.....T.....G..A.....A..G.....
<i>Pi_evansi</i> _SOA18T.....T.....T.....T..A..T.....T..A..T..T.....T.....G..A.....A..G.....
<i>Pi_evansi</i> _SOA21T.....T.....T.....T..A..T.....T..A..T..T.....T.....A.....A..G.....
<i>Pi_evansi</i> _SOA24T.....T.....T.....T..A..T.....T..A..T..T.....T.....G..A.....A..G.....
<i>Pi_evansi</i> _SOA25T.....T.....T.....T..A..T.....T..A..T..T.....T.....G..A.....A..G.....
<i>Pi_evansi</i> _SOA26T.....T.....T.....T..A..T..C.....T..A..T..T.....T.....G..A.....A..G.....
<i>Pi_evansi</i> _SOA27T.....T.....T.....T..A..T.....T..A..T..T.....T.....G..A.....A.....
<i>Pi_evansi</i> _SOA28T.....T.....T.....T..A..T.....T..A..T..T.....T.....G..A.....A..G.....
<i>Pi_evansi</i> _SOA2T.....T.....T.....T..A..T.....T..A..T..T.....T.....G..A.....A..G.....

<i>Pi_evansi_SOA3</i>T.....T.....T.....T A T.....T A.....T T.....G A.....A G.....
<i>Pi_evansi_SOA40</i>T.....T.....T.....T A T.....T A.....T T.....G A.....A G.....
<i>Pi_evansi_SOA41</i>T.....T.....T.....T A T.....C T A.....T T.....G A.....A.....
<i>Pi_evansi_SOA42</i>T.....T.....T.....T A T.....T A.....T T.....G A.....A G.....
<i>Pi_evansi_SOA5</i>T.....T.....T.....T A T.....T A.....T T.....G A.....A G.....
<i>Pi_evansi_SOA6</i>T.....T.....T.....T A T.....T A.....T T.....G A.....A G.....
<i>Pi_evansi_SOA7</i>T.....T.....T.....T A T.....T A.....T T.....G A.....A G.....
<i>Pi_rangeliana_SOA31</i>T.....A.....T.....C.....C.....C T.....T A.....G A.....C.....
<i>Pr_choti_AMA54.2</i>	..C.....T.....C.....C.....C T A C C.....A.....T T.....T T.....
<i>Pr_choti_AMA68.1</i>	..C.....T.....C.....C.....C T A C C.....A.....T T.....T T.....
<i>Pr_choti_AMA58.1</i>	..C.....T.....C.....C.....C T A C C.....A.....T T.....T T.....
<i>Pr_choti_AMA67.1</i>	..C.....T.....C.....C.....C T A C C.....A.....T T.....T T.....
<i>Pr_choti_AMCD13.1</i>	..C.....T.....C.....C.....C T A C C.....A.....T T.....T T.....
<i>Pr_choti_AMCD13.2</i>	..C.....T.....C.....C.....C T A C C.....A.....T T.....T T.....
<i>Pr_choti_AMCP8.1</i>	..C.....T.....C.....C.....C T A C C.....A.....T T.....T T.....
<i>Pr_choti_AMA54.1</i>	..C.....T.....C.....C.....C T A C C.....A.....T T.....T T.....
<i>Pr_camposi_APAA2.1</i>	..C C.....C C.....C.....C.....C T A C C.....T A C T.....T A.....
<i>Pr_camposi_CAL28.3</i>	..C C.....C C.....C.....C.....C T A C C.....T A C T.....T A.....
<i>Ty_triramula_CAL18.3</i>C.....T.....T A T A C.....T G.....T T.....T T.....A.....C.....
<i>Ty_triramula_CAL33.1</i>C.....T.....T A T A C.....T G C T T.....T.....A.....C G.....
<i>Ev_dubitans_PAN1.2</i>C.....T.....T.....T A.....C.....C T T.....A.....A.....T.....
<i>Ev_walkeri_AMA32.1</i>	..A.....C.....C.....A.....T A A C.....T T.....T.....A.....T.....
<i>Ev_walkeri_AMA73.1</i>	..A C.....C.....C.....A.....T A A C.....T T.....T.....A.....T.....
<i>Ev_walkeri_AMCT8.1</i>	..A.....C.....C.....A.....T A A C.....T T.....T.....A.....T.....
<i>Ev_walkeri_AMCT8.3</i>	..A C.....C.....C.....A.....T A A C.....T T.....T.....A.....T.....
<i>Ev_walkeri_AMCT9.6</i>	..A.....T C A.....T A A C.....T T.....T.....A.....T.....
<i>Ev_walkeri_AMCP3.3</i>	..A.....C.....C.....A.....T A A C.....T T.....T.....A.....T.....
<i>Ev_walkeri_AMCK11-2.1</i>	..A C.....C.....C.....A.....C.....T A A C.....T T.....T.....A.....T.....
<i>Ev_georgii_AMA79.3</i>	..A.....C.....T.....C.....C.....A C C.....A T G T A T A.....G T T T.....
<i>Ev_saulensis_AMB7.1</i>T C.....C.....C.....C.....T.....C.....T A C T A T.....T A.....C.....
<i>Pa_punctigeniculata_AMCK18-5.1</i>C.....T.....T A.....A.....T T A T.....T.....A.....C.....T.....
<i>Pa_punctigeniculata_AMCK18-5.2</i>C.....T.....T A.....A.....T T A T.....T.....A.....C.....T.....
<i>Pa_punctigeniculata_AMCK11-17.</i>C.....T.....T A.....A.....T T A T.....T.....A.....C.....T.....
<i>Pa_carpanteri_CAL3.2</i>C.....C.....T.....C.....C.....C G.....T A C C.....T.....G T.....T.....A.....A.....C G.....
<i>Pa_aragaoi_AMCK18-17.1</i>T.....C.....G.....T A.....C.....T C T T.....T.....T.....C.....G.....
<i>Pa_aragaoi_AMA53.1</i>T.....C.....G.....T A C C.....T C T T.....T.....T.....C.....A G.....
<i>Pa_shannoni_REM67</i>	..C.....C.....C.....T.....T A.....A.....A C T.....T T.....T A.....A.....C.....T.....
<i>Pa_shannoni_REM34</i>	..C.....C.....C.....T.....T A.....A.....A C T.....T T.....T A.....A.....C G T.....
<i>Pa_dendrophylla_AMA48.1</i>C.....T.....C.....T A.....T.....A.....T.....T.....A.....A.....T.....
<i>Ps_serie_davisi_AMCT9.13</i>T.....T A.....C.....A T A T.....T A T.....A.....A.....C.....T.....
<i>Ps_amazonensis_AMB3.1</i>	..C.....T.....T A.....T A T.....T A T.....A.....A.....A.....T.....
<i>Ps_serie_guyanensis_AMA40.1</i>T.....T A.....T A T A T.....A.....A.....A.....T.....
<i>Ps_panamensis_COR1.1</i>T.....T.....C.....T A.....C.....A T.....T A T.....A.....A.....T.....
<i>Ps_panamensis_PAN4.2</i>C.....T.....T A.....C.....A T.....T A T.....A.....A.....A.....
<i>Ps_panamensis_PAN3.4</i>C.....T.....T A.....C.....T A T.....T A T.....A.....A.....A.....
<i>Ps_panamensis_CAL5.2</i>T.....T A.....C.....A T.....T A T.....A.....A.....A.....G.....
<i>Ps_panamensis_CALB24.1</i>T.....T A.....C.....A T.....T A T.....A.....A.....A.....G.....
<i>Psychodopygus_sp_AMB9.1</i>T.....A T A C.....T.....T A T.....A.....T.....A.....T.....

<i>Ps_hirsutus_hirsutus_AMA51.1</i>C.T.....C.....T.A.....AT.AT...AT.....A.....C.....T.
<i>Ps_hirsutus_hirsutus_AMA47.2</i>C.T.....C.....T.A.....AT.AT...AT.....A.....A.....T.
<i>Ps_ayrozai_CAL28.2</i>C.....C.....AT.A.C.....T.T.AT.....A.T.....A.....G.T.
<i>Ps_ayrozai_CAL33.3</i>C.....C.....AT.A.C.....T.T.AT.....A.T.....A.....G.T.
<i>Ps_ayrozai_CAL31.2</i>C.....C.....AT.A.C.....T.T.AT.....A.T.....A.....G.T.
<i>Ny_antunesi_AMA22.1</i>T.....T.A.....T.AT.T.A.....A.....A.....
<i>Ny_antunesi_AMA10.3</i>T.....T.A.....T.AT.T.A.....A.....A.....
<i>Ny_antunesi_AMB11.1</i>T.....T.A.....T.AT.T.A.....A.....A.....G....
<i>Ny_antunesi_AMA10.2</i>T.....T.A.....T.AT.T.A.....A.....A.....
<i>Ny_antunesi_AMAA8.3</i>T.....T.A.....T.AT.T.A.....A.....A.....
<i>Ny_antunesi_AMB1.2</i>T.....T.A.....T.AT.T.A.....A.....A.....G....
<i>Ny_antunesi_AMA45.1</i>T.....T.A.....T.AT.T.A.....A.....A.....
<i>Ny_antunesi_AMA4.2</i>T.....T.A.....T.AT.T.A.....A.....A.....
<i>Ny_antunesi_AMA8.1</i>T.....T.A.....T.AT.T.A.....A.....A.....
<i>Ny_trapidoi_CAL18.4</i>A.....T.....C.....C.T.AT.C.....A.....A.....T.
<i>Ny_trapidoi_CALB10.2</i>A.....T.....C.C.C.T.AT.C.....A.....A.....T.
<i>Ny_trapidoi_REM72</i>A.....T.....C.....C.T.AT.C.....A.....A.....G.T.
<i>Ny_trapidoi_REM69</i>A.....T.....C.C.C.T.AT.C.....A.....A.....T.
<i>Ny_trapidoi_COR4.1</i>A.....T.....C.A.C.T.AT.C.....A.....A.....G.T.
<i>Ny_trapidoi_COR4.2</i>A.....T.....C.C.C.T.AT.C.....A.....A.....T.
<i>Ny_yuilli_yuilli_REM66</i>T.....T.A.....T.AT...A.....A.....A.....
<i>Ny_yuilli_yuilli_CAL14.3</i>T.....T.A.....T.AT...A.....A.....A.....
<i>Ny_yuilli_yuilli_CAL7.2</i>T.....T.A.....T.AT...A.....A.....A.....
<i>Ny_yuilli_yuilli_AMA57.1</i>T.....T.A.C.....T.AT.T.AT.....A.....A.....GT...
<i>Ny_yuilli_yuilli_AMA81.2</i>T.....T.A.C.....T.AT.T.AT.....A.....A.....
<i>Ny_yuilli_yuilli_AMCK11-15.2</i>T.....T.A.C.....T.AT.T.AT.....A.....A.....
<i>Ny_yuilli_yuilli_AMCK11-1.3</i>T.....T.A.C.....T.AT.T.AT.....A.....A.....
<i>Ny_yuilli_yuilli_AMCK11-17.2</i>T.....T.A.C.....T.AT.T.AT.....A.....A.....
<i>Ny_yuilli_pajoti_AMCD5.2</i>T.....T.A.....T.AT.T.A.....A.....A.....
<i>Ny_yuilli_pajoti_AMCT9.1</i>T.....T.A.....T.AT.T.A.....A.....A.....
<i>Ny_yuilli_pajoti_AMA5.1</i>T.....T.A.....T.AT.T.A.....A.....A.....
<i>Ny_ylephiletor_COR7.1</i>T.....A.C.C.....T.AT.T.AT.....A.....A.....G....
<i>Ny_umbratilis_AMA79.1</i>T.....T.A.....T.AT.T.AT.....A.....A.....G....
<i>Ny_umbratilis_AMCK11-19.1</i>T.....T.A.....T.AT.T.AT.....A.....A.....T....
<i>Ny_umbratilis_AMCK11-17.5</i>T.....T.A.....T.AT.T.AT.....A.....A.....
<i>Ny_umbratilis_AMA75.2</i>T.....T.A.....T.AT.T.AT.....A.....A.....
<i>Ny_umbratilis_AMCK11-17.6</i>T.....T.A.....T.AT.T.AT.....A.....A.....
<i>Ny_umbratilis_AMCK11-19.3</i>T.....T.A.....T.AT.T.AT.....A.....A.....G....
<i>Ny_umbratilis_AMCK11-17.4</i>T.....T.A.....T.AT.T.AT.....A.....A.....
<i>Trichophoromyia_AMA4.3</i>A.....T.....T.A.C.....T.AT.CT.A.....C.A.....A.....G.T.
<i>Trichophoromyia_AMA2.1</i>A.....T.....T.A.C.....T.AT.CT.A.....C.A.....A.....G.T.
<i>Trichophoromyia_AMCT8.2</i>A.....T.....T.A.C.....T.AT.CT.A.....C.A.....A.....G.T.
<i>Trichophoromyia_AMA3.1</i>A.....T.....T.A.C.....T.AT.CT.A.....C.A.....A.....G.T.
<i>Trichophoromyia_AMCT9.8</i>A.....T.....T.A.C.....T.AT.CT.A.....C.A.....A.....G.T.
<i>Trichophoromyia_AMCK11-2.2</i>A.....T.....T.A.....T.AT.CT.A.....C.A.....A.....G.T.
<i>Trichophoromyia_AMA73.2</i>A.....T.....T.A.....T.AT.CT.A.....C.A.....A.....T....
<i>Th_howardi_AMA75.1</i>A.....T.....T.A.....T.AT.CT.A.....C.A.....A.....T....
<i>Th_howardi_AMCK11-15.3</i>A.....T.....T.A.....T.AT.CT.A.....C.A.....A.....T....

<i>Lu_longipalpis_HON2.4</i> A . T C G . T T . A . T C . A A T . A . T T . T . C T T
<i>Lutzomyia (Tr1)_AMB8.1</i>	. G . A A T T C . C T . T A . A A A . A C . G . T . T . T . A T . A
<i>Lutzomyia (Tr1)_AMCK18-18.2</i>	. G . A A T T C . C T A . A A A . A C . G . T . T . T . A T . A
<i>Lu_sherlocki_AMCK18-7.1</i> A T T C . T T . C . C . A C C . A C . G T T
<i>Lu_sherlocki_AMCK18-18.1</i> A T T C . T T . C . C . A C C . A C . G T T
<i>Lu_sherlocki_AMCK11-19.5</i> A T T C . T T . C . C . A C C . A C . G T T
<i>Lu_sherlocki_AMCK11-19.4</i> A C . T T C . T T . C . C . A C C . A C . G T T
<i>Lu_gomezi_SOA35</i> A A . T T C . T . T . T . T C . C A A T . A T T . T . A C
<i>Lu_gomezi_REM7</i> A A . T T C . T . T . T . T C . C A A T . A T T . T . A C
<i>Lu_gomezi_REM71</i>	. G G T T C . T . T . T . T C . C A A T T T . T . A C . T
<i>Lu_gomezi_REM68</i>	. G G A . T T C . T . T . T . T C . C A A T T T . T . A C
<i>Lu_gomezi_SAN1.3</i>	. G G T T C . T . T . T . T C . C A A T T T . T . A C
<i>Lu_gomezi_CAL5.3</i> A A . T T C . T . T . T . T C . C A A T . A T T . T . A C
<i>Pi_evansi_HON2.21</i> A . T A . A G . T C T T A T T T . C T T A . T T A
<i>Pi_evansi_HON2.3</i> A . T A . A G . T C T T A T T T . C T T A . T T A
<i>Pi_evansi_NIC2.8</i> A . T A . A G . T C T T C . A T T T . C T T A . T T A
<i>Pi_evansi_SOA101</i> T A . A T T . T A T T T T . T . T . T . A . T T A
<i>Pi_evansi_SOA110</i> C A . A T T . T C . A T T T T . T . T . T . A . T T A
<i>Pi_evansi_SOA10</i> T A . A T T . T C . A T T T T . T . T . T . A . T T A
<i>Pi_evansi_SOA18</i> C A . A T T . T C . A T T T T . T . T . T . A . T T A
<i>Pi_evansi_SOA21</i> T A . A T T . T A T T T T . T . T . T . A . T T A
<i>Pi_evansi_SOA24</i> T A . A T T . T A T . G . T T T . T . T . T . A . T T A
<i>Pi_evansi_SOA25</i> T A . A T T . T C . A T . G . T T T . T . T . T . A . T T A
<i>Pi_evansi_SOA26</i> C A . A T T . T C . A T T T T . T . T . T . A . T T A
<i>Pi_evansi_SOA27</i> T A . A T T . T C . A T T T T . T . T . T . A . T T A
<i>Pi_evansi_SOA28</i> T A . A T T . T C . A T T T T . T . T . T . A . T T A
<i>Pi_evansi_SOA2</i> T A . A T . T T . T C . A T . G . T T T . T . T . T . A . T T A
<i>Pi_evansi_SOA3</i> T A . A T . T T . T A T T T T . T . T . T . A . T T A
<i>Pi_evansi_SOA40</i> T A . A T T . T A T T T T . T . T . T . A . T T A
<i>Pi_evansi_SOA41</i> T A . A T T . T C . C A C T T T . T . T . T . A . T T A
<i>Pi_evansi_SOA42</i> C A . A T T . T C . A T T T T . T . T . T . A . T T A
<i>Pi_evansi_SOA5</i> T A . A T T . T C . A T T T T . T . T . T . A . T T A
<i>Pi_evansi_SOA6</i> T A . G T T . T C . A T T C . T . T . T . A . T T A
<i>Pi_evansi_SOA7</i> C A . A T T . T . T C . A T T T T . T . T . T . A . T T A
<i>Pi_rangeliana_SOA31</i> T A T T . T . T C . A A C . C . T . C T C T . A . T T A
<i>Pr_choti_AMA54.2</i> A . T A . A T T . A . T C . A A C . A C T . T . T T T C
<i>Pr_choti_AMA68.1</i> A . T A . A T T . A . T C . A A C . A C T . T . T T T C
<i>Pr_choti_AMA58.1</i> A . T A . A T T . A . T C . A A C . A C T . T . T T T C
<i>Pr_choti_AMA67.1</i> A . T A . A T T . A . T C . A A C . A C T . T . T T T C
<i>Pr_choti_AMCD13.1</i> A . T A . A T T . A . T C . A A C . A C T . T . T T T C
<i>Pr_choti_AMCD13.2</i> A . T A . A T T . A . T C . A A C . A C T . T . T T T C
<i>Pr_choti_AMCP8.1</i> A . T A . A T T . A . T C . A A C . A C T . T . T T T C
<i>Pr_choti_AMA54.1</i> A . T A . A T T . A . T C . A A C . A C T . T . T T T C
<i>Pr_camposi_APAA2.1</i>	. G . A . T A T T A . T . C A A C . A C T T T T C
<i>Pr_camposi_CAL28.3</i> A . T A G T . A . T . C A A C . A T T T T C . T
<i>Ty_triramula_CAL18.3</i> A A T C . A . T . C . C . A T T T T C T T A
<i>Ty_triramula_CAL33.1</i> A A T C . A . T . C . C . A T T T T C T T A . G
<i>Ev_dubitans_PAN1.2</i> A A . C . T . T . T C T . A . T A T A T T . T . T . A . T T T

<i>Ev_walkeri_AMA32.1</i>C.....T.T.TC.....A.T...C.AA...T...T.....T.T.CT.A.TT...A...C..
<i>Ev_walkeri_AMA73.1</i>C.....T.T.TC.....A.T...C.AA...T...T.....T.T.CT.A.TT...A...C..
<i>Ev_walkeri_AMCT8.1</i>C.....T.T.TC.....A.T...C.AA...T...T.....T.T.CT.A.TT...A...C..
<i>Ev_walkeri_AMCT8.3</i>C.....T.T.TC.....A.T...C.AA...T...T.....T.T.CT.A.TT...A...C..
<i>Ev_walkeri_AMCT9.6</i>C.....T.T.TC.....A.T...C.AA...T...T.....T.T.CT.A.TT...A...C..
<i>Ev_walkeri_AMCP3.3</i>T.....T.....T.....A.T...C.AA...T...C.....T.T...T.A.TT...A...C..
<i>Ev_walkeri_AMCK11-2.1</i>C.....T.T.TC.....A.T...C.AA...T...T.....T.T.CT.A.TT...A...C..
<i>Ev_georgii_AMA79.3</i>	.G...G...A.....TC...T.....A.AA...A.A.....T.T.A.A.TT...A...C..
<i>Ev_saulensis_AMB7.1</i>	..A.....C.....CC.C.T.A.....A.A...A.A.....T.T.CT.A.TT...A...C..
<i>Pa_punctigeniculata_AMCK18-5.1</i>C.....A.G.....C.....A.T...A.A.T.C...T.C...T.T.T.....TT...A...C..
<i>Pa_punctigeniculata_AMCK18-5.2</i>C.....A.G.....C.....A.T...A.A.C...T.C...T.T.T.....TT...A...C..
<i>Pa_punctigeniculata_AMCK11-17.</i>C.....A.G.....C.....A.T...A.A...C...T.C...T.T.T.....TT...A...C..
<i>Pa_carpenteri_CAL3.2</i>	..A.T...A.A.....T.....A.T.C...A.A...T.A.....T.T...C...T.C.....
<i>Pa_aragaoi_AMCK18-17.1</i>A.....A...T.T.T.....A.T...A.A...T...T.....T.T.A...TT...A.T...
<i>Pa_aragaoi_AMA53.1</i>A.....A...T.T.T.....A.T...A.A...T...T.....T.T.A...TT...A.T...
<i>Pa_shannoni_REM67</i>G.A...T.....G.A.T...A.A.T.C...T.C...T.T.T...C.TT...A.T...
<i>Pa_shannoni_REM34</i>G.A...T.....G.T...A.A.T.C...T.C...T.T.T...C.TT...G.T...
<i>Pa_dendrophylla_AMA48.1</i>	.T...T.....T.....T.T...A.A.A...T.A.T.....T.T.T...T.A.TT...T.C...
<i>Ps_serie_davisi_AMCT9.13</i>C.....A.T.T.T.....A...A.A.C.C.A.T.....T.T.T.....TT...A.T.C...
<i>Ps_amazonensis_AMB3.1</i>A.T.....T.....A...A.CA.T.T...T...T...T...TT...A...C...
<i>Ps_serie_guyanensis_AMA40.1</i>A.T.....T.....A.T.CA.A...A.A...A.A...T.....T...AT.A.TT...A...C..
<i>Ps_panamensis_COR1.1</i>	.T.A.....T.T.....T.T.C...A.T...T.A.....T.T.T.C...TT...A.T...
<i>Ps_panamensis_PAN4.2</i>	.T.A.....T.....T.T...A.T...T.A.....T.T.T.C...TT...A...C...
<i>Ps_panamensis_PAN3.4</i>	.T.A.....T.....T.T...A.T...T.A.....T.T.T.C...TT...A...C...
<i>Ps_panamensis_CAL5.2</i>	.T.A.....T.....T.T...A.A...T.A.....T.T.T.C...TT...A...C...
<i>Ps_panamensis_CALB24.1</i>	.T.A.....T.....T.T...A.A...T.A.....T.T.T.C...TT...A...C...
<i>Psychodopygus_sp_AMB9.1</i>	.T.A.T...A...T...T.....A.T...C.AA...A...T.....T.T.T...A.TT...T...
<i>Ps_hirsutus_hirsutus_AMA51.1</i>A.C...A.G.T.T.T...T.A.T...A.A...C.C...T.T.T...TT...A.T...
<i>Ps_hirsutus_hirsutus_AMA47.2</i>A.C...A.G.T.T.T...T.A.T...A.A...C.C...T.T.T...TT...A.T...
<i>Ps_ayrozai_CAL28.2</i>	.T.A.T...A...T...T.....A.T...C.AA...T...T.....T.T.T...A.TT...G.T...
<i>Ps_ayrozai_CAL33.3</i>	.T.A.T...A...T...T.....A.T...C.AA...T...T.....T.T.T...A.TT...G.T...
<i>Ps_ayrozai_CAL31.2</i>	.T.A.T...A...T...T.....A.T...C.AA...T...T.....T.T.T...A.TT...G.T...
<i>Ny_antunesi_AMA22.1</i>A.....A.T.....A.T...A.A.G...T...T.....T.T.AT.A...T...T...
<i>Ny_antunesi_AMA10.3</i>A.....A.T.....A.T...A.A...T...T.....T.T.AT.A...T...T...
<i>Ny_antunesi_AMB11.1</i>A.....A.T.....A.T...A.A...T...T.....T.T.AT.A...T...T...
<i>Ny_antunesi_AMA10.2</i>A.....A.T.....A.T...A.A...T...T.....T.T.AT.A...T...T...
<i>Ny_antunesi_AMA8.3</i>A.....A.T.....A.T...A.A...T...T.....T.T.AT.A...T...T...
<i>Ny_antunesi_AMB1.2</i>A.....A.T.....A.T...A.A...T...T.....T.T.AT.A...T...T...
<i>Ny_antunesi_AMA45.1</i>A.....A.T.....A.T...A.A...T...T.....T.T.AT.A...T...T...
<i>Ny_antunesi_AMA4.2</i>A.....A.T.....A.T...A.A...T...T.....T.T.AT.A...T...T...
<i>Ny_antunesi_AMA8.1</i>A.....A.T.....A.T...A.A...T...T.....T.T.AT.A...T...T...
<i>Ny_trapidoi_CAL18.4</i>	.T...T.G.....T.....T.T...C.CA.A.C.C...T...G...T...A...T...
<i>Ny_trapidoi_CALB10.2</i>	.T...T.G.....T.T...T.T...C.CA.A.T.C...T...G...T...A...T...
<i>Ny_trapidoi_REM72</i>	.T...T.G.....T...T...T.T...C.CA.A.T.C...T...G...T...A...T...
<i>Ny_trapidoi_REM69</i>	.T...T.G.....T...T...T.T...C.CA.A.T.C...T...G...T...A...T...
<i>Ny_trapidoi_COR4.1</i>	.T...T.....T...T...T.T...C.CA.A.C.C...T...G...T...T.A...T...
<i>Ny_trapidoi_COR4.2</i>	.T...T.....T...T...T.T...C.A.A.C.C...T...G...T...T.A...T...
<i>Ny_yuilli_yuilli_REM66</i>A.T...A.T.....A.T...C.A.A.G...T...T.....T.T.AT.A.TT...C.T...

Mi_cayennensis_cayennensis_SOA C..A..C.T...T.....A.T.G.....A.T.....T.....A...T.....T.....A..
Mi_cayennensis_cayennensis_SOA C..A..C.T...T.....A.T.A.....A.T.....T.....A...T.....T.....A..
Mi_cayennensis_cayennensis_SOA C..A..C.T...T.....A.T.G.....A.T.....T.....A...T.....T.....A..
Mi_micropyga_SOA63 T.....T.....T.....A.T.A.....T.....T.....T.....CT.....A...T.....T.....T.....A..
Mi_micropyga_SOA72 T.....T.....T.....A.T.A.....T.....T.....T.....CT.G...A...T.....T.....T.....A..
Mi_micropyga_APA12.6 T..A.....T.....C...A.....C.T.....A.T.....AT.....A...A...TA...T...AA
Mi_micropyga_APA12.7 T..A.....T.....C...A.....C.T.....A.T.....AT.....A...A...TA...T...AA
Mi_chassigneti_AMA48.3 ..A.....T.....A...A.....T.....A.T.....A...C.A...A...T...G.....A..
Mi_chassigneti_AMCK11-17.7 ..A.....T.....A...A.....T.....A.T.....AT...C.A...G...TC.....A..
Mi_chassigneti_AMA48.4 ..A.....T.....A...A.....T.....A.T.....AT...C.A...G...TC.....A..
Sc_sordellii_AMB18.1 ..A.....T.....A...A.....T.....T.....AT.....A...A...TC...T...A
Sc_sordellii_AMB18.2 ..A.....T.....A...A.....T.....T.....AT.G.....A...TC...T...A
Sc_sordellii_AMCK11-15.1 ..A.....T.....A...A.....T.....T.....AT.G.....A...TC...T...A
Sc_preclara_AMA31.1 T..A...C...G.....C.C.C.....T.....A.....A.....A...T...TC...T...T...
Sc_preclara_AMA2.2 T..A...C...G.....C.C.C.....T.....A.....A.....A...T...TC...T...T...
Sc_preclara_AMCT9.7 T..A...C...G.....C.C.C.....T.....A.....A.....A...T...TC...T...T...
Sc_preclara_AMB3.2 T..A...C...G.....C.C.C.....T.....A.....A.....A...T...TC...T...T...
Sc_preclara_AMA26.1 T..A...C...G.....C.C.C.....T.....A.....A.....A...T...TC...T...T...
Lu_hartmanni_CAL7.4 T.....C.....T.C...A...T.....T.....A.C...AT.....T.....TA...C...A
Lu_hartmanni_CALB19.3 T.....C.....T.C...A...T.....T.....A.C...AT.....T.....TA...C...A
Lu_hartmanni_CALB27.1 T.....C.....T.C...A...T.....T.....A.C...AT.....T.....TA...C...A
Lu_lichyi_REM12 T..A...C.T.T.T.....C.C.A.C.T.....T.....CT.....C...T...TA...A.C
Lu_lichyi_REM11 T..A...C.T.T.T.....C.C.A.C.T.....T.....CT.....C...T...TA...A.C
Lu_bifoliata_REM48 ..A.....T.....A.T.....T.....T.....T.....A...G...T...T...TA..
Lu_bifoliata_REM61 ..A.....T.....A.T.....T.....T.....T.....A...G...T...T...TA..
Lu_bifoliata_CALB21.2 ..A.....C.....A.T.....T.....T.....T.....A...G...T...T...TA..
Lu_longipalpis_HON2.10 ..A.....T.....A.....T.....C.A...A...TC...T...C...A
Lu_longipalpis_HON2.4 ..A.....T.....A.....T.....C.A...A...TC...T...C...A
Lutzomyia_(Tr1)_AMB8.1 T.....G.....T.....T.....C...T.T.T...CT.....T.....TC...T...T...A
Lutzomyia_(Tr1)_AMCK18-18.2 T.....G.....T.....T.....C...T.T.T...CT.....T.....TC...T...T...A
Lu_sherlocki_AMCK18-7.1 C..A.....T.....T.A...T.....AT.....T...C.A...T...T...T...A
Lu_sherlocki_AMCK18-18.1 C..A.....T.....T.A...T.....AT.....T...C.A...T...T...T...A
Lu_sherlocki_AMCK11-19.5 C..A.....T.....T.A...T.....AT.....T...C.A...T...T...T...A
Lu_sherlocki_AMCK11-19.4 C..A.....T.....T.A...T.....CT.....T...C.A...T...T...T...A
Lu_gomezi_SOA35 T..A.....T.....C.....T.....C...T.T...T...C.A...T...T...T...A
Lu_gomezi_REM7 T..A.....T.....T.....T.....C...T.T...T...C.A...T...T...T...A
Lu_gomezi_REM71 T..A.....T.....T.....T.....C...T.T...T...C.A...T...T...T...A
Lu_gomezi_REM68 T..A.....T.....T.....T.....C...T.T...T...C.A...T...T...T...A
Lu_gomezi_SAN1.3 T..A.....T.....T.....T.....C...T.T...T...C.A...T...T...T...A
Lu_gomezi_CAL5.3 T..A.....T.....T.....T.....C...T.T...T...C.A...T...T...T...A
Pi_evansi_HON2.21 T.....T.....A...A.....T.....T.....CT...C.....T...TC...T...T...
Pi_evansi_HON2.3 T.....G...T.....A...A.....T.....A.....CT...C.....T...TC...T...T...
Pi_evansi_NIC2.8 T.....T.....A...A.....T.....A.....CT...C.....T...TC...T...T...
Pi_evansi_SOA101 T.....T.....A.T.A...T.....A.....CT...A...T...T...T...T...T...
Pi_evansi_SOA110 T.....T.....A.T.A...T.....A.....CT...A...T...T...T...T...T...
Pi_evansi_SOA10 T.....T.....A.T.A...T.....A.....CT...A...T...T...T...T...T...
Pi_evansi_SOA18 T.....T.....A.T.A...T.....A.....CT...A...T...T...T...T...T...
Pi_evansi_SOA21 T.....T.....A.T.A...T.....A.....CT...A...T...T...T...T...T...

Pi_evansi_SOA24 T.....A.T.A...T.....A.....CT.....A...T...T...T.T...
Pi_evansi_SOA25 T.....A.T.A...T.....A.....CT.....A...T...T...T.T...
Pi_evansi_SOA26 T.....A.T.A...T.....A.....CT.....A...T...T...T.TA...
Pi_evansi_SOA27 T.....A.T.A...T.....A.....CT.....A...T...T...T.T...
Pi_evansi_SOA28 T.....A.T.A...T.....A.....CT.....A...T...T...T.T...
Pi_evansi_SOA2 T.....A.T.A...T.....A.....CT.....A...T...T...T.T...
Pi_evansi_SOA3 T.....C.....A.T.A...T.....A.....CT.....A...T...T...T.T...
Pi_evansi_SOA40 T.....A.T.A...T.....A.....CT.....A...T...T...T.T...
Pi_evansi_SOA41 C.....A.T.A...T.....A.....CT.....A...T...T...T.T...
Pi_evansi_SOA42 T.....A.T.A...T.....A.....CT.....A...T...T...T.T...
Pi_evansi_SOA5 T.....A.T.A...T.....A.....CT.....A...T...T...T.T...
Pi_evansi_SOA6 T.....A.T.A...T.....A.....CT.....A...T...T...T.T...
Pi_evansi_SOA7 T.....A.T.A...T.....A.....CT.....A...T...T...T.T...
Pi_rangeliana_SOA31 C.A.....G.T.....A.T.A...T.....A.....C.....A.G.A...CTC...C.A...
Pr_choti_AMA54.2 T.....A.T...T.....A.....AT.....C...T...G...C...
Pr_choti_AMA68.1 T.....A.T...T.....A.....AT.....C...T...G...C...
Pr_choti_AMA58.1 T.....A.T...T.....A.....AT.....C...T...G...C...
Pr_choti_AMA67.1 T.....A.T...T.....A.....AT.....C...T...G...C...
Pr_choti_AMCD13.1 T.....A.T...T.....A.....AT.....C...T...G...C...
Pr_choti_AMCD13.2 T.....A.T...T.....A.....AT.....C...T...G...C...
Pr_choti_AMCP8.1 T.....A.T...T.....A.....AT.....C...T...G...C...
Pr_choti_AMA54.1 T.....A.T...T.....A.....AT.....C...T...G...C...
Pr_camposi_APAA2.1 T.....G.....A.T...C.T...A.....A.....C...T...TA...
Pr_camposi_CAL28.3 T.....A.T...C.T.G...A.....A.....C...C...T...TA...
Ty_triramula_CAL18.3 C.....T.....C.....A...T.....T...AT...C.A...T...TA...T.T...
Ty_triramula_CAL33.1 C.....T.....C.....A...T.....T...AT...C.A...T...TA...T.T...
Ev_dubitans_PAN1.2 C.A...C.....A...T...T.A.T...CT...A.G.T...TA...T.T.A...
Ev_walkeri_AMA32.1 C.A...A...T...T...C.A...TC...T...G...T.T.A...
Ev_walkeri_AMA73.1 C.A...A...T...T...C.A...TC.G...T...G...T.T.A...
Ev_walkeri_AMCT8.1 C.A...A...T...T...C.A...TC...T...G...T.T.A...
Ev_walkeri_AMCT8.3 C.A...A...T...T...C.A...TC...T...G...T.T.A...
Ev_walkeri_AMCT9.6 C.A...A...T...T...C.A...TC...T...G...T.T.A...
Ev_walkeri_AMCP3.3 T.A...C.....T...A...T...T...C.A...T...T...T.T.A...
Ev_walkeri_AMCK11-2.1 C.A...A...T...T...C.A...TC.G...T...G...T.T.A...
Ev_georgii_AMA79.3 C.A...T.T.C.....A...T...C.C...CT...C...A...TA...T.CA...
Ev_saulensis_AMB7.1 C.A...T.....A.T...T...T.A...T...T...GC.T...T...T...
Pa_punctigeniculata_AMCK18-5.1 .A...C...T...T...T...T...A...T...T...T...T.A...
Pa_punctigeniculata_AMCK18-5.2 .A...C...T...T...T...T...A...T...T...T...T.A...
Pa_punctigeniculata_AMCK11-17. .A...C...T...T...T...T...A...T...T...T...T.A...
Pa_carpenteri_CAL3.2 .A...G...C...A.C...T...A...AT...A...T...T...C.A.A...
Pa_aragaoi_AMCK18-17.1 .A...C.T...A.T.A...T...C.A...T...T.C.A...T...T...T.T.A...
Pa_aragaoi_AMA53.1 .A...C.T...A.T.A...T...C.A...T...T.C.A...T...T...T.T.A...
Pa_shannoni_REM67 .A...C.T.G.T...T...T...C.T...A...T...T...C.T.A...
Pa_shannoni_REM34 .A...C.T.G.T...T...T...A.TA...A...T...T...C.T.A...
Pa_dendrophyla_AMA48.1 T.A...CC.T...T...C...T...T...T...A...T...T...T...T.T.A...
Ps_serie_davisi_AMCT9.13 T.A...G.C...A...T...T...T...A...T...T...T...T.T...
Ps_amazonensis_AMB3.1 T.A...C...A...T...G...T...A...T...T...T...T.T...
Ps_serie_guyanensis_AMA40.1 .A...A...T...T.C...AT...A...T...T...T...A...

Ps_panamensis_COR1.1 T.....T.....T.....T...A...T.....T.....T..A
Ps_panamensis_PAN4.2 T.....T.....T.....T...A...A...T.....T...A
Ps_panamensis_PAN3.4 T.....T.....T.....G...T...A...A...T.....T..A
Ps_panamensis_CAL5.2 T.....T.....T.....T...A...A...TC.....T..A
Ps_panamensis_CALB24.1 T.....T.....T.....T...A...A...TC.....T..A
Psychodopygus_sp_AMB9.1 ..A.....G..T..T.....A...T..C...T...C..A...TC...TA...C..C..A
Ps_hirsutus_hirsutus_AMA51.1 ..A.....T.....A...T.....AT.....A...TC.....T...T..T..A
Ps_hirsutus_hirsutus_AMA47.2 ..A.....T.....A...T.....AT.....A...TC.....T...C..T..A
Ps_ayrozai_CAL28.2 ..A.....T.....T...A...T..C...T...C..A...T...TA...C...A..A
Ps_ayrozai_CAL33.3 ..A.....T.....T...A...T..C...T...C..A...T...TA...C...A..A
Ps_ayrozai_CAL31.2 ..A.....T.....T...A...T..C...T...C..A...T...TA...C...A..A
Ny_antunesi_AMA22.1 ..C.....T.....T..A...T.....T.....T.....T...T...T..T..A
Ny_antunesi_AMA10.3 ..C.....T.....T..A...T.....T.....T.....T...T...T..T..A
Ny_antunesi_AMB11.1 ..C.....T.....T..A...T.....T.....T.....T...T...T..T..A
Ny_antunesi_AMA10.2 ..C.....T.....T..A...T.....T.....T.....T...T...T..T..A
Ny_antunesi_AMAA8.3 ..C.....T.....T..A...T.....T.....T.....T...T...T..T..A
Ny_antunesi_AMB1.2 ..C.....T.....T..A...T.....T.....T.....T...T...T..T..A
Ny_antunesi_AMA45.1 ..C.....T.....T..A...T.....G...T.....T.....T...T...T..T..A
Ny_antunesi_AMA4.2 ..C.....T.....T..A...T.....T.....T.....T...T...T..T..A
Ny_antunesi_AMA8.1 ..C.....T.....T..A...T.....T.....T.....T...T...T..T..A
Ny_trapidoi_CAL18.4 C..A...G.....A...T..G...A..T.....AT.....T...TC.....T..A
Ny_trapidoi_CALB10.2 C..A...G..G.....A...T..G...A..T.....AT.....T...TC.....AT..A
Ny_trapidoi_REM72 C..A...G..G.....A...T..G...A..T.....AT.....T...TC.....T..A
Ny_trapidoi_REM69 C..A...G.....A...T..G...A..T.....AT.....T...TC.....T..A
Ny_trapidoi_COR4.1 C..A...G..G.....G..A...T..G...A..T.....AT.....T...TC.....T..A
Ny_trapidoi_COR4.2 C..A...G.....A...T..G...A..T.....AT.....T...TC.....T..A
Ny_yuilli_yuilli_REM66 ..G...T.....T..A...T.....T.....T.....T...T...T..T..A
Ny_yuilli_yuilli_CAL14.3 ..G...T.....T..A...T.....T.....T.....T...T...T..T..A
Ny_yuilli_yuilli_CAL7.2 ..G...T.....T..A...T.....T.....T.....T...T...AT...T..T..A
Ny_yuilli_yuilli_AMA57.1 ..T.....T..A...T.....T.....T.....C...T...TC...T..T..A
Ny_yuilli_yuilli_AMA81.2 ..T.....T..A...T.....T.....T.....C...T...TA...T..T..A
Ny_yuilli_yuilli_AMCK11-15.2 ..T.....T..A...T.....T.....T.....C...T...TC...T..T..A
Ny_yuilli_yuilli_AMCK11-1.3 ..T.....T..A...T.....T.....T.....C...T...TC...T..T..A
Ny_yuilli_yuilli_AMCK11-17.2 ..T.....T..A...T.....T.....T.....C...T...TC...T..T..A
Ny_yuilli_pajoti_AMCD5.2 ..C.....T.....T..A...T.....T.....T.....T...TC...T..T..A
Ny_yuilli_pajoti_AMCT9.1 ..C.....T.....T..A...T.....T.....T.....T...TC...T..T..A
Ny_yuilli_pajoti_AMA5.1 ..C.....T.....T..A...T.....T.....T.....T...T...T..T..A
Ny_ylephiletor_COR7.1 ..A...G..T.....A...T...A..T.....AT...C..A...T...TC...C..T..A
Ny_umbratilis_AMA79.1 ..T.....T.....T..A...T.....T.....T.....T...T...T..T..A
Ny_umbratilis_AMCK11-19.1 ..T.....T.....T..A...T.....T.....T.....T...T...T..T..A
Ny_umbratilis_AMCK11-17.5 ..T.....T.....T..A...T.....T.....T.....T...T...T..T..A
Ny_umbratilis_AMA75.2 ..T.....T.....T..A...T.....T.....CT.....T...T...T..T..A
Ny_umbratilis_AMCK11-17.6 ..T.....T.....T..A...T.....T.....T.....T...T...T..T..A
Ny_umbratilis_AMCK11-19.3 ..T.....T.....T..A...T.....T.....T.....T...T...T..T..A
Ny_umbratilis_AMCK11-17.4 ..G...T.....T..A...T.....T.....T.....T...T...T..T..A
Trichophoromyia_AMA4.3 T.....T...C...T...T...C...T...C..T...A...T...T...T...
Trichophoromyia_AMA2.1 T.....T...C.....T...G..C.....T...C..C..T...A...T...T...T...
Trichophoromyia_AMCT8.2 T.....T...C.....T...C...T...C..C..T...A...T...T...T...

Trichophoromyia_AMA3.1 T.....T.....C.....T.....C.....T.C.C.T...A...T...T...T...
Trichophoromyia_AMCT9.8 T.....T.....C.....T.....C.....T.C.C.T...A...T...T...T...
Trichophoromyia_AMCK11-2.2 T.....T.....C.....T.....C.....G...C.T.C.A...T...T...T...
Trichophoromyia_AMA73.2 T.....T.....C.....T.....C.....G...C.T.A...T...T...T...
Th_howardi_AMA75.1 T.....T.....C.....T.....C.....G...C.T.A...T...T...T...
Th_howardi_AMCK11-15.3 T.....T.....C.....T.....C.....G...C.T.A...T...T...T...

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Br_mesai_AMCT9.3 ATTACAGCAGTTCCTTTTACTTTTATCACTCCCGATTTTAGCTGGAGCAATTACAATATTATTAAC TGACCCGAAATTTAAATACTTCCTTTTTTCGACCCCG
Br_mesai_AMA48.2C.....
Br_leopoldoi_CAL6.2T.....GC.T.....T.T.T.C...A.....C.TC...A.T.....C.C.T...A.
Mi_trinidadensis_APAA1.3T.T...GC.T...C...T.T.T...G.....T.T.....A.C.C.T.T.A.
Mi_trinidadensis_APAA13.1T.T...GC.T...C...T.T.T...G.....T.T.....A.C.C.T.T.A.
Mi_trinidadensis_APAA1.7T.T...GC.T...C...T.T.T...G.....T.T.....A.C.C.T.T.A.
Mi_trinidadensis_SOA32T.T.A.AC.T...C...T.T.T...G.....T.....A.C.C.T...A.
Mi_atroclavata_SOA84T.T.A.....T.A.T.A...A.....C.T...T.....A...T...A.
Mi_atroclavata_SOA34T.T.A.....C...T.A.T.A...A.....C.TC...T.....A...T...A.
Mi_atroclavata_SOA44T.T.A.....C...T.A.T.A...A.....C.TC...T.....A...T...A.
Mi_atroclavata_SOA97T.T.A.....C...T.A.T.A...A.....C.C...T.....A...T...A.
Mi_cayennensis_cayennensis_PANT...T.AC...C...CT.A.T...A...T.....A.T...C.T...A...T...T.
Mi_cayennensis_cayennensis_SOAC...T.A...C...CT.A.T...A...T.....A.T...C.T...A...T...T.
Mi_cayennensis_cayennensis_SOAC...T.A...C...CT.A.T...A...T.....A.T...C.T...A...T...T.
Mi_cayennensis_cayennensis_SOAC...T.A...C...CT.A.T...A...T.....A.T...C.T...A...T...T.
Mi_micropyga_SOA63AT.A.T.A...TT.A.T...T...T.....T.....A.A...T.T.T.
Mi_micropyga_SOA72AT.A.T.A...TT.A.T...T...T.....T.....A.A...T.T.T.
Mi_micropyga_APAA12.6A.T.A...T.AC.C.T...T...C...T...T.....A.T...A.C...T...T.
Mi_micropyga_APAA12.7A.T.A...T.AC.C.T...T...C...T...T.....A.T...A.C...T...T.
Mi_chassigneti_AMA48.3CA.T.A...T.A...T.A...A...A...C.T...C.T...A.C...T...T.
Mi_chassigneti_AMCK11-17.7CA.T.A...T.A...T.A...A...A...C.T...C.T...A.C...T...T.
Mi_chassigneti_AMA48.4CA.T.A...T.A...T.A...A...A...C.T...C.T...A.C...T...T.
Sc_sordellii_AMB18.1AT.AC.C...C.T.TT.G.T...T.C.T.C...A...A...T...A.
Sc_sordellii_AMB18.2AT.AC.C...C.T.TT.G.T...T.C.T.C...A...A...T...A.
Sc_sordellii_AMCK11-15.1AT.AC.C...C.T.TT.G.T...T.C.T.C...A...A...T...A.
Sc_preclara_AMA31.1C.CC.T...TT.A.C.A...G.T.C...C.T.T.C...T...T.
Sc_preclara_AMA2.2C.CC.T...TT.A.C.A...G.T.C...C.T.T.C...T...T.
Sc_preclara_AMCT9.7C.CC.T...TT.A.C.A...G.T.C...C.T.T.C...T...T.
Sc_preclara_AMB3.2C.CC.T...TT.A.C.A...G.T.C...C.T.T.C...T...T.
Sc_preclara_AMA26.1C.CC.T...TT.A.C.A...G.T.C...C.T.T.C...T...T.
Lu_hartmanni_CAL7.4T.T.A...C.T...T.T.T.C...C.T.T...T.C.T...A...A.A.C.T.T.T.
Lu_hartmanni_CALB19.3T.T.A...C.T...T.T.T.C...C.T.T...T.C.T...A...A.A.C.T.T.T.
Lu_hartmanni_CALB27.1T.T.A...C.T...T.T.T.C...C.T.T...T.C.T...A...A.A.C.T.T.T.

Lu_lichyi_REM12T.TA.C...C.C...C.T.C...T.A...A...T.C.T...C.TC.T.A.T.T.....A.A.C.T...T.
Lu_lichyi_REM11T.TA.C...C.C...C.T.C...T.A...A...T.C.T...C.TC.T.A.T.T.....A.A.C.T...T.
Lu_bifoliata_REM48T.....C.T.C.T...C.A...T.C...GC.TC.T.A.T.T.....A.A...T...A.
Lu_bifoliata_REM61T.....C.T.C.T...C.A...T.C...GC.TC.T.A.T.T.....A.A...T...A.
Lu_bifoliata_CALB21.2T.....C.T.C.T...C.A...T.C...GC.TC.T.A.T.T.....A.A...T...A.
Lu_longipalpis_HON2.10T.....T.A...T...T...C.A...T...T.C.T...T...C.....T.T.T.
Lu_longipalpis_HON2.4T.....T.A...T...T...C.A...T...T.C.T...T...C.....T.T.T.
Lutzomyia_(Tr1)_AMB8.1T.T.AT.A..T.A...T.....A...T.C...T...T...A.A...T...T.
Lutzomyia_(Tr1)_AMCK18-18.2T.T.AT.A..T.A...T.....A...T.C...T...T...A.A...T...T.
Lu_sherlocki_AMCK18-7.1C.T...A.A...C...TT.A...C...A...T.C...T...T...A...T...T...
Lu_sherlocki_AMCK18-18.1C.T...A.A...C...TT.A...C...A...T.C...T...T...A...T...T...
Lu_sherlocki_AMCK11-19.5C.T...A.A...C...TT.A...C...A...T.C...T...T...A...T...T...
Lu_sherlocki_AMCK11-19.4C.T...A.A...C...TT.A...C...A...T.C...T...T...A...T...T...
Lu_gomezi_SOA35T.T.AT.A...TT.A.T.CC.T.A...C.T.C.C...G.T...A...T...T...
Lu_gomezi_REM7T.T.AT.A...TT.A.T.CC.T.A...C.T.C.C...A...T...T...T...
Lu_gomezi_REM71T.T.AT.A...TT.A.T.CC.T.A...C.T.C.C...A.T...T...T...T...
Lu_gomezi_REM68T.T.AT.A...TT.A.T.CC.T.A...C.T.C.C...A.T...T...T...T...
Lu_gomezi_SAN1.3T.T.AT.A...TT.A.T.CC.T.A...C.T.C.C...A.T...T...T...T...
Lu_gomezi_CAL5.3T.T.AT.A...TT.A.T.CC.T.A...C.T.C.C...A...T...T...T...
Pi_evansi_HON2.21T.C...C.C...C.C...T.A.T.C...G...T...T...C...T...T...A...C.T...T...
Pi_evansi_HON2.3T.C...C.C...C.C...T.A.T.C...G...T...T...C...T...T...A...C.T...T...
Pi_evansi_NIC2.8T.C...C.C...C.C...T.A.T.C...G...T...T...C...T...T...A...C.T...T...
Pi_evansi_SOA101T.T...C.T.C.C...TT.A.T...G.C.T...T...T...C...T...T...C...T...T...
Pi_evansi_SOA110T.T...C.T.C.C...TT.A.T...A.T.T...T...T...T...T...C...T...T...
Pi_evansi_SOA10T.T...C.T.C.C...TT.A.T...G.T.T...T...T...T...G...T...C...T...T...
Pi_evansi_SOA18T.T...C.T.C.C...TT.A.T...A.T.T...T...T...T...G...T...C...T...T...
Pi_evansi_SOA21T.T...C.T.C.C...TT.A.T...G.T.T...T...T...T...G...T...C...T...T...
Pi_evansi_SOA24T.T...C.T.C.C...TT.A.T...A.T.T...T...T...T...G...T...C...T...T...
Pi_evansi_SOA25T.T...C.T.C.C...TT.A.T...A.T.T...T...T...T...G...T...C...T...T...
Pi_evansi_SOA26T.T...C.T.C.C...TT.A.T...G.T.C...T...T...T...G...T...C...T...T...
Pi_evansi_SOA27T.T...C.T.C.C...TT.A.T...G.T.T...T...T...T...G...T...C...T...T...
Pi_evansi_SOA28T.T...C.T.C.C...TT.A.T...G.T.T...T...T...T...G...T...C...T...T...
Pi_evansi_SOA2T.T...C.T.C.C...TT.A.T...A.T.T...T...T...T...G...T...C...T...T...
Pi_evansi_SOA3T.T...C.T.C.C...TT.A.T...A.T.T...T...T...T...G...T...C...T...T...
Pi_evansi_SOA40T.T...C.T.C.C...TT.A.T...G.T.T...T...T...T...G...T...C...T...T...
Pi_evansi_SOA41T.T...C.T.C.C...TT.A.T...G.T.T...T...T...T...G...T...C...T...T...
Pi_evansi_SOA42T.T...C.T.C.C...TT.A.T...A.T.T...T...T...T...G...T...C...T...T...
Pi_evansi_SOA5T.T...C.T.C.C...TT.A.T...G.T.T...T...T...T...G...T...C...T...T...
Pi_evansi_SOA6T.T...C.T.C.C...TT.A.T...A.T.T...T...T...T...G...T...C...T...T...
Pi_evansi_SOA7T.T...C.T.C.C...TT.A.T...G.T.T...T...T...T...G...T...C...T...T...
Pi_rangeliana_SOA31T.C...C.T.CC.C.C.T.T.A...A...T...T...T...G...T.T...C...T...A...
Pr_choti_AMA54.2T.T...C.T.CT.A.T.C...A...C.T...T...T...C...C...T...T...
Pr_choti_AMA68.1T.T...C.T.CT.A.T.C...A...C.T...T...T...C...C...T...T...
Pr_choti_AMA58.1T.T...C.T.CT.A.T.C...A...C.T...T...T...C...C...T...T...
Pr_choti_AMA67.1T.T...C.T.CT.A.T.C...A...C.T...T...T...C...C...T...T...
Pr_choti_AMCD13.1T.T...C.T.CT.A.T.C...A...C.T...T...T...C...C...T...T...
Pr_choti_AMCD13.2T.T...C.T.CT.A.T.C...A...C.T...T...T...C...C...T...T...
Pr_choti_AMCP8.1T.T...C.T.CT.A.T.C...A...C.T...T...T...C...C...T...T...

Pr_choti_AMA54.1T.T.....C.T.CT.A.T..C..A.....C.T.....C..C.T.....
Pr_camposi_APAA2.1T.T.A.....CC.T.CT.G.T..C..A.....C..T.C.T.....C.....C..C.T.T.T.
Pr_camposi_CAL28.3T.T.A.....CC.T.CT.G.T..C..A.....C..T.C.T.....C.....C..C.T.T.T.
Ty_triramula_CAL18.3G.....C.....T.AC...T.A.T.....A.....C.....C.A.....T.T.T.
Ty_triramula_CAL33.1A.....T.AC...T.A.T.....C.....G.....C.A..G.T.T.T.
Ev_dubitans_PAN1.2A.C.CC.....T.....C..A...T...T...C..A.....C.....A.C.C.T...A.
Ev_walkeri_AMA32.1T.T.G.....C.....C..C..T.....T.....C.A.....T...A.
Ev_walkeri_AMA73.1T.T.A.....C.....C.....C.....T.....T.....C.A.....T...A.
Ev_walkeri_AMCT8.1T.T.G.....C.....C..C..T.....T.....C.A.....T...A.
Ev_walkeri_AMCT8.3T.T.G.....C.....C..C..T.....T.....C.A.....T...A.
Ev_walkeri_AMCT9.6T.T.G.....C.....C..C..T.....T.....C.A.....T...A.
Ev_walkeri_AMCP3.3T.T.A.....C.....C.....T.....C.C..G.T.....C.A.....T...A.
Ev_walkeri_AMCK11-2.1T.T.G.....C.....C..C..T.....T.....C.A.....T...A.
Ev_georgii_AMA79.3T...A..C.....TT.A..A.....T...C.....C..A.T...C.....A.A.....T...T.
Ev_saulensis_AMB7.1T.A.C.T...TT.A.T..C.T.A.T.....C.T.A.T...C.....A.A.....T...A.
Pa_punctigeniculata_AMCK18-5.1T.C..T.A..T.A.....TT.A.T..C.T.....C.T...A.T.....C..A.A.C.T...T.
Pa_punctigeniculata_AMCK18-5.2T.C..T.A..T.A.....TT.A.T..C.T.....C.T...A.T.....C..A.A.C.T...T.
Pa_punctigeniculata_AMCK11-17.T.C..T.A..T.A.....TT.A.T..C.T.....C.T...A.T.....C..A.A.C.T...T.
Pa_carpanteri_CAL3.2T.TA..T.AC.T...C.T...TT.A.T..C.T.A.....C.T.....T.....A.C.....T...T.
Pa_aragaoi_AMCK18-17.1TA..T.A..T.A.....TT.A.T..C.T.....C.T.....T.....A.....T...T.
Pa_aragaoi_AMA53.1TA..T.A..T.A.....TT.A.T..C.T.....C.T.....T.....A.....T...T.
Pa_shannoni_REM67T...AT.AC...C.T..T.A.T.CC.T.....T.C.T.....T.....A.A.....T...T.
Pa_shannoni_REM34T...AT.AC...C.T..T.A.T.CC.T.....T.C.T.....T.....A.A.....T...T.
Pa_dendrophyla_AMA48.1T.T.AT.A...C.T..T.A...C.T.....T.C.T.....T.....A.A.....T...T.
Ps_serie_davisi_AMCT9.13T...GT.AC..T.A...A...C.T.....T.C.T.....T.....A.C.....T...A.
Ps_amazonensis_AMB3.1T...AT.AC..T.A...C.T.....C.C.T.....T.....A.C.....T...A.
Ps_serie_guyanensis_AMA40.1T...AT.A...A...T.A...C.T.A...T...T.C.TC.....T.....A...C.....T...A.
Ps_panamensis_COR1.1T...AT.A...A...T.A...C.T.A...T...T.....T.....T...T...A.
Ps_panamensis_PAN4.2T...T.AC...A...T.A...C.T.A...T...T.....T.....T...T...A.
Ps_panamensis_PAN3.4T...AT.AC...A...T.A...C.T.A...T...T.....T.....T...T...A.
Ps_panamensis_CAL5.2T...AT.AC...A...T.A...C.T.A...C...T.....C.....T...T...A.
Ps_panamensis_CALB24.1T...AT.AC...A...T.A...C.T.A...C...T.....C.....T...T...A.
Psychodopygus_sp_AMB9.1A..GC..T.A...T...C.CC.T.....T...C.T...A.T.....T...T...T.
Ps_hirsutus_hirsutus_AMA51.1T.T.AT.A...A...A.T..C.T.A...C.T.....T...CC.....A...T...T...T.
Ps_hirsutus_hirsutus_AMA47.2T.T.AT.A...AC...A.T..C.T.A...C.T.....T...G.CC.....A...T...T...T.
Ps_ayrozai_CAL28.2A..A..T.A...T...CC.T.....T.C.T...A.T.....T...T...T.
Ps_ayrozai_CAL33.3A..A..T.A...T...CC.T.....T.C.T...A.T.....T...T...T.
Ps_ayrozai_CAL31.2A..A..T.A...T...CC.T.....T.C.T...A.T.....T...T...T.
Ny_antunesi_AMA22.1T...AT.A...CC...TT.A.T.AC...C.....T.C.C..A.T.....A.....T...T...T.
Ny_antunesi_AMA10.3T...AT.A...CC...TT.A.T.AC...C.....T.C.C..A.T.....A.....T...T...T.
Ny_antunesi_AMB11.1T...AT.A...CC...TT.A.T.AC...C.....T.C.C..A.T.....A.....T...T...T.
Ny_antunesi_AMA10.2T...AT.A...CC...TT.A.T.AC...C.....T.C.C..A.T.....A.....T...T...T.
Ny_antunesi_AMAA8.3T...AT.A...CC...TT.A.T.AC...C.....T.C.C..A.T.....A.....T...T...T.
Ny_antunesi_AMB1.2T...AT.A...CC...TT.A.T.AC...C.....T.C.C..A.T.....A.....T...T...T.
Ny_antunesi_AMA45.1T...AT.A...CC...TT.A.T.AC...C.....T.C.C..A.T.....A.....T...T...T.
Ny_antunesi_AMA4.2T...AT.A...CC...TT.A.T.AC...C.....T.C.C..A.T.....A.....T...T...T.
Ny_antunesi_AMA8.1T...AT.A...CC...TT.A.T.AC...C.....T.C.C..A.T.....A.....T...T...T.
Ny_trapidoi_CAL18.4T.C...G.....TT.A.T.CC.T.A...T...T.....A.T.....A.A.C.T...T...T.

Ny_trapidoi_CALB10.2T.C.....GAC.....TT.A.T.CC.T.A.....T.....T.....A.T.....AA.G.C.T.....T.
Ny_trapidoi_REM72T.C.....G.....TT.A.T.CC.T.A.....T.....T.....A.T.....A.A.C.T.....T.
Ny_trapidoi_REM69T.C.....G.....TT.A.T.CC.T.A.....T.....T.....A.T.....A.A.C.T.....T.
Ny_trapidoi_COR4.1T.C.....G.....TT.A.T.CC.T.A.....T.....T.....A.T.....A.A.C.T.....T.
Ny_trapidoi_COR4.2T.C.....G.....TT.A.T.CC.T.A.....T.....T.....A.T.....A.A.C.T.....T.
Ny_yuilli_yuilli_REM66T.....AT.A.....AC.....TT.A.T.AC.....T.....T.....C.C.....A.....A.C.T.T.T.
Ny_yuilli_yuilli_CAL14.3T.....AT.A.....AC.....TT.A.T.AC.....T.....T.....C.C.....A.....A.C.T.T.T.
Ny_yuilli_yuilli_CAL7.2T.....AT.A.....AC.....TT.A.T.AC.....T.....T.....C.C.....A.....A.C.T.T.T.
Ny_yuilli_yuilli_AMA57.1T.....AT.A.....A.....TT.A.T.AC.....T.....T.....C.C.....A.....A.C.T.T.T.
Ny_yuilli_yuilli_AMA81.2T.....AT.A.....A.....TT.A.T.AC.....C.....T.....C.C.....A.....A.C.T.T.T.
Ny_yuilli_yuilli_AMCK11-15.2T.....AT.A.....A.....TT.A.T.AC.....T.....T.....C.C.....A.....A.C.T.T.T.
Ny_yuilli_yuilli_AMCK11-1.3T.....AT.A.....A.....TT.A.T.AC.....T.....T.....C.C.....A.....A.C.T.T.T.
Ny_yuilli_yuilli_AMCK11-17.2T.....AT.A.....A.....TT.A.T.AC.....T.....T.....C.C.....A.....A.C.T.T.T.
Ny_yuilli_pajoti_AMCD5.2T.....AT.A.....CC.....TT.A.T.AC.....T.....T.....C.C.....A.....A.C.T.T.T.
Ny_yuilli_pajoti_AMCT9.1T.....AT.A.....CC.....TT.A.T.AC.....T.....T.....C.C.....A.....A.C.T.T.T.
Ny_yuilli_pajoti_AMA5.1T.....AT.A.....CC.....TT.A.T.AC.....T.....T.....C.C.....A.....A.C.T.T.T.
Ny_ylephiletor_COR7.1C.T.....AT.A.....TT.A.T..C.T.A.....C.....C.....A.....A.A.C.T.....T.
Ny_umbratilis_AMA79.1AT.AC.....CC.....TT.A.T.AC.....T.....T.....C.C.....A.....C.A.....C.T.T.T.
Ny_umbratilis_AMCK11-19.1AT.AC.G.CC.....TT.A.T.AC.....T.....T.....C.C.....A.....C.A.....C.T.T.T.
Ny_umbratilis_AMCK11-17.5AT.AC.G.CC.....TT.A.T.AC.....T.....T.....C.C.....A.....C.A.....C.T.T.T.
Ny_umbratilis_AMA75.2AT.AC.G.CC.....TT.A.T.AC.....T.....T.....C.C.....A.....C.A.....C.T.T.T.
Ny_umbratilis_AMCK11-17.6AT.AC.G.CC.....TT.A.T.AC.....T.....T.....C.C.....A.....C.A.....C.T.T.T.
Ny_umbratilis_AMCK11-19.3AT.AC.G.CC.....TT.A.T.AC.....T.....T.....C.C.....A.....C.A.....C.T.T.T.
Ny_umbratilis_AMCK11-17.4AT.AC.G.CC.....TT.A.T.AC.....T.....T.....C.C.....A.....A.....C.T.T.T.
Trichophoromyia_AMA4.3T.....CT.A.....C.T.....TT.A.T.A.....G.....C.....G.....C.....T.....T.....T.
Trichophoromyia_AMA2.1T.....CT.A.....C.T.....TT.A.T.A.....G.....C.....G.....C.....T.....T.....T.
Trichophoromyia_AMCT8.2T.....CT.A.....C.T.....TT.A.T.A.....A.....C.....G.....C.....T.....G.....T.....T.
Trichophoromyia_AMA3.1T.....CT.A.....C.T.....TT.A.T.A.....G.....C.....G.....C.....T.....T.....T.
Trichophoromyia_AMCT9.8T.....CT.A.....C.T.....TT.A.T.A.....G.....C.....G.....C.....T.....T.....T.
Trichophoromyia_AMCK11-2.2T.....CCT.A.....C.T.....TT.A.T.A.....G.....C.....G.....C.....T.....T.....T.
Trichophoromyia_AMA73.2T.....CT.A.....C.T.....TT.A.T.A.....G.....C.....G.....C.....T.....T.....T.
Th_howardi_AMA75.1T.....CT.A.....C.T.....TT.A.T.A.....G.....C.....G.....C.....T.....T.....T.
Th_howardi_AMCK11-15.3T.....CT.A.....C.T.....TT.A.T.A.....G.....C.....G.....C.....T.....T.....T.

Br_mesai_AMCT9.3 .
Br_mesai_AMA48.2 C
Br_leopoldoi_CAL6.2 .
Mi_trinidadensis_APAA1.3 .
Mi_trinidadensis_APAA13.1 .
Mi_trinidadensis_APAA1.7 .
Mi_trinidadensis_SOA32 .
Mi_atroclavata_SOA84 .
Mi_atroclavata_SOA34 .

Mi_atroclavata_SOA44 .
Mi_atroclavata_SOA97 .
Mi_cayennensis_cayennensis_PAN .
Mi_cayennensis_cayennensis_SOA .
Mi_cayennensis_cayennensis_SOA .
Mi_cayennensis_cayennensis_SOA .
Mi_cayennensis_cayennensis_SOA .
Mi_micropyga_SOA63 .
Mi_micropyga_SOA72 .
Mi_micropyga_APAA12.6 .
Mi_micropyga_APAA12.7 .
Mi_chassigneti_AMA48.3 .
Mi_chassigneti_AMCK11-17.7 .
Mi_chassigneti_AMA48.4 .
Sc_sordellii_AMB18.1 .
Sc_sordellii_AMB18.2 .
Sc_sordellii_AMCK11-15.1 .
Sc_preclara_AMA31.1 .
Sc_preclara_AMA2.2 .
Sc_preclara_AMCT9.7 .
Sc_preclara_AMB3.2 .
Sc_preclara_AMA26.1 .
Lu_hartmanni_CAL7.4 .
Lu_hartmanni_CALB19.3 .
Lu_hartmanni_CALB27.1 .
Lu_lichyi_REM12 .
Lu_lichyi_REM11 .
Lu_bifoliata_REM48 .
Lu_bifoliata_REM61 .
Lu_bifoliata_CALB21.2 .
Lu_longipalpis_HON2.10 .
Lu_longipalpis_HON2.4 .
Lutzomyia_(Tr1)_AMB8.1 .
Lutzomyia_(Tr1)_AMCK18-18.2 .
Lu_sherlocki_AMCK18-7.1 .
Lu_sherlocki_AMCK18-18.1 .
Lu_sherlocki_AMCK11-19.5 .
Lu_sherlocki_AMCK11-19.4 .
Lu_gomezi_SOA35 .
Lu_gomezi_REM7 .
Lu_gomezi_REM71 .
Lu_gomezi_REM68 .
Lu_gomezi_SAN1.3 .
Lu_gomezi_CAL5.3 .
Pi_evansi_HON2.21 .
Pi_evansi_HON2.3 .
Pi_evansi_NIC2.8 .
Pi_evansi_SOA101 .

Pi_evansi_SOA110 .
Pi_evansi_SOA10 .
Pi_evansi_SOA18 .
Pi_evansi_SOA21 .
Pi_evansi_SOA24 .
Pi_evansi_SOA25 .
Pi_evansi_SOA26 .
Pi_evansi_SOA27 .
Pi_evansi_SOA28 .
Pi_evansi_SOA2 .
Pi_evansi_SOA3 .
Pi_evansi_SOA40 .
Pi_evansi_SOA41 .
Pi_evansi_SOA42 .
Pi_evansi_SOA5 .
Pi_evansi_SOA6 .
Pi_evansi_SOA7 .
Pi_rangeliana_SOA31 .
Pr_choti_AMA54.2 .
Pr_choti_AMA68.1 .
Pr_choti_AMA58.1 .
Pr_choti_AMA67.1 .
Pr_choti_AMCD13.1 .
Pr_choti_AMCD13.2 .
Pr_choti_AMCP8.1 .
Pr_choti_AMA54.1 .
Pr_camposi_APAA2.1 .
Pr_camposi_CAL28.3 .
Ty_triramula_CAL18.3 .
Ty_triramula_CAL33.1 .
Ev_dubitans_PAN1.2 .
Ev_walkeri_AMA32.1 .
Ev_walkeri_AMA73.1 .
Ev_walkeri_AMCT8.1 .
Ev_walkeri_AMCT8.3 .
Ev_walkeri_AMCT9.6 .
Ev_walkeri_AMCP3.3 .
Ev_walkeri_AMCK11-2.1 .
Ev_georgii_AMA79.3 .
Ev_saulensis_AMB7.1 .
Pa_punctigeniculata_AMCK18-5.1 .
Pa_punctigeniculata_AMCK18-5.2 .
Pa_punctigeniculata_AMCK11-17. .
Pa_carpanteri_CAL3.2 .
Pa_aragaoi_AMCK18-17.1 .
Pa_aragaoi_AMA53.1 .
Pa_shannoni_REM67 .
Pa_shannoni_REM34 .

Pa_dendrophyla_AMA48.1 .
Ps_serie_davisi_AMCT9.13 .
Ps_amazonensis_AMB3.1 .
Ps_serie_guyanensis_AMA40.1 .
Ps_panamensis_COR1.1 .
Ps_panamensis_PAN4.2 .
Ps_panamensis_PAN3.4 .
Ps_panamensis_CAL5.2 .
Ps_panamensis_CALB24.1 .
Psychodopygus_sp_AMB9.1 .
Ps_hirsutus_hirsutus_AMA51.1 .
Ps_hirsutus_hirsutus_AMA47.2 .
Ps_ayrozai_CAL28.2 .
Ps_ayrozai_CAL33.3 .
Ps_ayrozai_CAL31.2 .
Ny_antunesi_AMA22.1 .
Ny_antunesi_AMA10.3 .
Ny_antunesi_AMB11.1 .
Ny_antunesi_AMA10.2 .
Ny_antunesi_AMA8.3 .
Ny_antunesi_AMB1.2 .
Ny_antunesi_AMA45.1 .
Ny_antunesi_AMA4.2 .
Ny_antunesi_AMA8.1 .
Ny_trapidoi_CAL18.4 .
Ny_trapidoi_CALB10.2 .
Ny_trapidoi_REM72 .
Ny_trapidoi_REM69 .
Ny_trapidoi_COR4.1 .
Ny_trapidoi_COR4.2 .
Ny_yuilli_yuilli_REM66 .
Ny_yuilli_yuilli_CAL14.3 .
Ny_yuilli_yuilli_CAL7.2 .
Ny_yuilli_yuilli_AMA57.1 .
Ny_yuilli_yuilli_AMA81.2 .
Ny_yuilli_yuilli_AMCK11-15.2 .
Ny_yuilli_yuilli_AMCK11-1.3 .
Ny_yuilli_yuilli_AMCK11-17.2 .
Ny_yuilli_pajoti_AMCD5.2 .
Ny_yuilli_pajoti_AMCT9.1 .
Ny_yuilli_pajoti_AMA5.1 .
Ny_ylephiletor_COR7.1 .
Ny_umbratilis_AMA79.1 .
Ny_umbratilis_AMCK11-19.1 .
Ny_umbratilis_AMCK11-17.5 .
Ny_umbratilis_AMA75.2 .
Ny_umbratilis_AMCK11-17.6 .
Ny_umbratilis_AMCK11-19.3 .

Ny_ umbratilis_ AMCK11-17.4 .
Trichophoromyia_ AMA4.3 .
Trichophoromyia_ AMA2.1 .
Trichophoromyia_ AMCT8.2 .
Trichophoromyia_ AMA3.1 .
Trichophoromyia_ AMCT9.8 .
Trichophoromyia_ AMCK11-2.2 .
Trichophoromyia_ AMA73.2 .
Th_ howardi_ AMA75.1 .
Th_ howardi_ AMCK11-15.3 .

Anexo 4:

Tablas obtenidas mediante el uso del software ABGD (Automatic Barcode Gap Discovery), con las secuencias de las diferentes especies de flebotómíneos discriminadas por géneros.

Resultados del análisis ABGD para 5 especies del género *Micropygomyia*

Modelo de sustitución	X	Partición	Divergencia Intraespecífica								
			0.001000	0.0017	0.0028	0.0046	0.0077	0.0129	0.0215	0.0359	0.0599
Simple	1.0	Inicial	6	6	6	6	6	6	6	6	7
		Recursiva	7	7	7	7	7	7	7	7	7
JC	1.0	Inicial	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Recursiva	8	8	8	8	8	8	8	7	6
K2P	1.0	Inicial	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Recursiva	8	8	8	8	8	8	8	7	6

X, ancho relativo del "gap"; Simple, distancia p; JC69, modelo de sustitución Jukes-Cantor; K2P, modelo de sustitución Kimura 2-parametros

Resultados del análisis ABGD para 2 especies del género *Sciopemyia*

Modelo de sustitución	X	Partición	Divergencia Intraespecífica							
			0.001000	0.0017	0.0028	0.0046	0.0077	0.0129	0.0215	0.0359
Simple	1.0	Inicial	2	2	2	2	2	2	2	2
		Recursiva	2	2	2	2	2	2	2	2
JC	1.0	Inicial	2	2	2	2	2	2	2	2
		Recursiva	2	2	2	2	2	2	2	2
K2P	1.0	Inicial	2	2	2	2	2	2	2	2
		Recursiva	2	2	2	2	2	2	2	2

X, ancho relativo del "gap"; Simple, distancia p; JC69, modelo de sustitución Jukes-Cantor; K2P, modelo de sustitución Kimura 2-parametros

Resultados del análisis ABGD para 7 especies del género *Lutzomyia*

Modelo de sustitución	X	Partición	Divergencia Intraespecífica							
			0.001000	0.0017	0.0028	0.0046	0.0077	0.0129	0.0215	0.0359
Simple	1.0	Inicial	7	7	7	7	7	7	7	7
		Recursiva	7	7	7	7	7	7	7	7
JC	1.0	Inicial	7	7	7	7	7	7	7	7
		Recursiva	7	7	7	7	8	7	7	7
K2P	1.0	Inicial	7	7	7	7	7	7	7	7
		Recursiva	7	7	7	7	8	7	7	7

X, ancho relativo del "gap"; Simple, distancia p; JC69, modelo de sustitución Jukes -Cantor; K2P, modelo de sustitución Kimura 2-parametros

Resultados del análisis ABGD para 2 especies del género *Pintomyia*

Modelo de sustitución	X	Partición	Divergencia Intraespecífica							
			0.001000	0.0017	0.0028	0.0046	0.0077	0.0129	0.0215	0.0359
Simple	1.0	Inicial	3	3	3	3	3	2	2	2
		Recursiva	3	3	3	3	3	2	2	2
JC	1.0	Inicial	3	3	3	3	3	3	2	2
		Recursiva	3	3	3	3	3	3	2	2
K2P	1.0	Inicial	3	3	3	3	3	3	2	2
		Recursiva	18	18	18	3	3	3	2	2

X, ancho relativo del "gap"; Simple, distancia p; JC69, modelo de sustitución Jukes -Cantor; K2P, modelo de sustitución Kimura 2-parametros

Resultados del análisis ABGD para 2 especies del género *Pressatia*

Modelo de sustitución	X	Partición	Divergencia Intraespecífica							
			0.001000	0.0017	0.0028	0.0046	0.0077	0.0129	0.0215	0.0359
Simple	1.0	Inicial	2	2	2	2	2	2	2	2
		Recursiva	2	2	2	2	2	2	2	2
JC	1.0	Inicial	5	5	2	2	2	2	2	2
		Recursiva	5	5	2	2	2	2	2	2
K2P	1.0	Inicial	5	5	2	2	2	2	2	2
		Recursiva	5	5	2	2	2	2	2	2

X, ancho relativo del "gap"; Simple, distancia p; JC69, modelo de sustitución Jukes -Cantor; K2P, modelo de sustitución Kimura 2-parametros

Resultados del análisis ABGD para 4 especies del género *Evandromyia*

Modelo de sustitución	X	Partición	Divergencia Intraespecífica							
			0.001000	0.0017	0.0028	0.0046	0.0077	0.0129	0.0215	0.0359
Simple	1.0	Inicial	5	5	5	5	5	4	4	4
		Recursiva	5	5	5	5	5	4	4	4
JC	1.0	Inicial	6	6	6	5	5	4	4	4
		Recursiva	6	6	6	5	5	4	4	4
K2P	1.0	Inicial	6	6	6	5	5	4	4	4
		Recursiva	6	6	6	5	5	4	4	4

X, ancho relativo del "gap"; Simple, distancia p; JC69, modelo de sustitución Jukes -Cantor; K2P, modelo de sustitución Kimura 2-parametros

Resultados del análisis ABGD para 4 especies del género *Psathyromyia*

Modelo de sustitución	X	Partición	Divergencia Intraespecífica							
			0.001000	0.0017	0.0028	0.0046	0.0077	0.0129	0.0215	0.0359
Simple	1.0	Inicial	5	5	5	5	5	5	5	5
		Recursiva	5	5	5	5	5	5	5	5
JC	1.0	Inicial	5	5	5	5	5	5	5	5
		Recursiva	5	5	5	5	5	5	5	5
K2P	1.0	Inicial	5	5	5	5	5	5	5	5
		Recursiva	5	5	5	5	5	5	5	5

X, ancho relativo del "gap"; Simple, distancia p; JC69, modelo de sustitución Jukes -Cantor; K2P, modelo de sustitución Kimura 2-parametros

Resultados del análisis ABGD para 6 especies del género *Psychodopygus*

Modelo de sustitución	X	Partición	Divergencia Intraespecífica						
			0.001000	0.0017	0.0028	0.0046	0.0077	0.0129	0.0215
Simple	1.0	Inicial	9	9	9	9	9	5	5
		Recursiva	9	9	9	9	9	6	6
JC	1.0	Inicial	9	9	9	9	9	5	5
		Recursiva	9	9	9	9	9	6	6
K2P	1.0	Inicial	9	9	9	9	9	5	5
		Recursiva	9	9	9	9	9	6	6

X, ancho relativo del "gap"; Simple, distancia p; JC69, modelo de sustitución Jukes -Cantor; K2P, modelo de sustitución Kimura 2-parametros

Resultados del análisis ABGD para 6 especies del género *Nyssomyia*

Modelo de sustitución	X	Partición	Divergencia Intraespecífica							
			0.001000	0.0017	0.0028	0.0046	0.0077	0.0129	0.0215	0.0359
Simple	1.0	Inicial	5	5	5	5	5	3	3	
		Recursiva	7	7	7	6	5	3	3	
JC	1.0	Inicial	8	8	8	8	5	3	3	1
		Recursiva	11	11	9	8	5	3	3	1
K2P	1.0	Inicial	10	10	10	10	5	3	3	1
		Recursiva	11	11	10	10	5	3	3	1

X, ancho relativo del "gap"; Simple, distancia p; JC69, modelo de sustitución Jukes -Cantor; K2P, modelo de sustitución Kimura 2-parametros

Resultados del análisis ABGD para 5 especies de los géneros *Trichophoromyia*, *Brumptomya* y *Tryramula*

Modelo de sustitución	X	Partición	Divergencia Intraespecífica							
			0.001000	0.0017	0.0028	0.0046	0.0077	0.0129	0.0215	0.0359
Simple	1.0	Inicial	9	9	9	4	4	4	4	4
		Recursiva	9	9	9	4	4	4	4	4
JC	1.0	Inicial	9	9	9	4	4	4	4	4
		Recursiva	9	9	9	4	4	4	4	4
K2P	1.0	Inicial	9	9	9	4	4	4	4	4
		Recursiva	9	9	9	4	4	4	4	4

X, ancho relativo del "gap"; Simple, distancia p; JC69, modelo de sustitución Jukes -Cantor; K2P, modelo de sustitución Kimura 2-parametros

Referencias bibliográficas

Abonnenc E. Les phlébotomes de la région éthiopienne (Diptera, Psychodidae). Paris : ORSTOM, 1972, (55), 289 p. multigr. (Mémoires ORSTOM ; 55).

Agudelo LA, Uribe J, Sierra D, Ruíz F, Vélez ID. 2002. Presence of American Cutaneous Leishmaniasis Vectors Surrounding the City of Medellín, Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 97(5): 641-642*, July 2002.

Alexander B. Manual de entomología médica para investigadores de América Latina. Ciclo de vida de los flebotomos. 1994; 1: 26-28.

Alexander B. Sampling methods for phlebotomine sand flies. *Med Vet Entomol.* 2000; 14: 109-122.

Alexander JB, Agudelo LA, Navarro F, Ruiz F, Molina J, Aguilera G, Quiñones ML. Phlebotomine sandflies and leishmaniasis risks in Colombian coffee plantations under two systems of cultivation. *Med Vet Entomol.* 2001; 15: 364-373.

Aliabadian M1, Kaboli M, Nijman V, Vences M. Molecular identification of birds: performance of distance-based DNA barcoding in three genes to delimit parapatric species. *PLoS One.* 2009;4(1):e4119. doi: 10.1371/journal.pone.0004119. Epub 2009 Jan 7.

Alvar JP. Las leishmaniasis: De la biología al control. Centro colaborador de la OMS para leishmaniasis. Servicio de Parasitología. Instituto de Salud Carlos III. Centro Nacional de Microbiología. 2001.

Anderson B, Neumann M. *Bartonella* spp. As emerging human pathogens. *Clinical Microbiology Review.* 1997. Vol. 10(2):203-219.

Aransay AM, Scoulica E, Chaniotis B, Tselentis Y. Typing of sandflies from Greece and Cyprus by DNA polymorphism of 18S rRNA gene. *Insect Mol Biol.* 1999 May;8(2):179-84.

Armed Forces Pest Management Board (AFPMB). Regional disease vector ecology profile. Defense pest management information analysis center. Forest Glen section. Washington DC: Walter Reed Army Medical Center; 2001: Pp. 231. Disponible

en:http://books.google.pt/books?id=Hpr10wAwoE0C&printsec=frontcover&dq=reginal+dise+ase+vector+ecology+profile+Central+Europe&ei=VOyOSa3UG4iUzATy_PyB.

Arias JR, Miles MA, Naiff RD, Povoá MM, de Freitas RA, Biancardi CB, et al. Flagellate infections of Brazilian sand flies (Diptera: Psychodidae): Isolation in vitro and biochemical identification of *Endotrypanum* and *Leishmania*. *Am J Trop Med Hyg.* 1985;34:1098-108.

Arrivillaga JC, Norris DE, Feliciangeli MD, Lanzaro GC. Phylogeography of the neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* inferred from mitochondrial DNA sequences. *Infect Genet Evol.* 2002; 2(2):83-95.

Artemiv MM, Flerova AO, Belyaev AE. Quantitative evaluation of the productivity of breeding places of sandflies in the wild and in villages. *Med. Parazitol. (Mosk)* 1972. 41: 31-35.

Avise JC. Phylogeography. The History and formation of species. Harvard University Press, Cambridge Attardi, G. (1985) *Int. Rev. Cytol.* 2000. 93-145.

Azevedo AC, Souza NA, Meneses CR, Costa WA, Costa SM, Lima JB, Rangel EF. Ecology of sand flies (Diptera: psychodidae: phlebotominae) in the north of the state of Mato Grosso, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002; 97(4): 459-64.

Azpuruá J, De La Cruz D, Valderama 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 Negl Trop Dis* 4(3): e627. doi:10.1371/journal.pntd.0000627

Bachtrog D, Thornton K, Clark A, Andolfatto P. Barreto, M.P. Extensive introgression of mitochondrial DNA relative to nuclear genes in the *Drosophila yakuba* species group. *Evolution.* 2006 Feb;60(2):292-302.

Barreto, M.P. Novos subgeneros de *Lutzomyia* França, 1924 (Psychodidae, subfamilia Phlebotominae). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1962; 4:91-100.

Barreto M, Burbano ME y Barreto P. Registros de *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) en nuevas localidades de Colombia. *Colombia Médica-Universidad Del Valle.* 2006. Vol 37 N 1.

Barreto M, Burbano ME y Barreto P. HALLAZGOS NUEVOS EN LA DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE *Warileya* Y *Brumptomyia* (DIPTERA: PSYCHODIDAE) EN EL SUROESTE DE COLOMBIA. *Acta Biológica Colombiana*, 12(2), 143-148. 2007., from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-548X2007000200012&lng=en&tlng=es.

Bates P, Depaquit J, Galati E, Kamhawi S, Maroli M, McDowell MA, Picado A, Ready P, Salomón D, Shaw JJ, Traub-Csekö YM y Warburg A. Recent advances in phlebotomine sand fly research related to leishmaniasis control. En: *Parasites & Vectors* 2015;8:131 DOI: 10.1186/s13071-015-0712-x

Beati L, Cáceres AG, Lee JA, Munstermann LE. Systematic relationships among *Lutzomyia* sand flies (Diptera: Psychodidae) of Peru and Colombia based on the analysis of 12S and 28S ribosomal DNA sequences. *Int J Parasitol*. 2004; 34: 225–234.

Bejarano EE, Uribe S, Rojas W, Vélez I.D. Presence of *Lutzomyia evansi*, a vector of American visceral leishmaniasis, in an urban area of the Colombian Caribbean coast. *Trans. R Soc Trop Med Hyg*. 2001; 95(1): 27-28.

Bejarano EE, Uribe S, Rojas W, Vélez I.D. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) associated with the appearance of urban leishmaniasis in the city of Sincelejo, Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002; 97(5): 645-647.

Bejarano EE, Sierra D, Vélez ID. Novedades en la distribución geográfica del grupo *verrucarum* (Diptera: Psychodidae) en Colombia. *Biomédica*. 2003; 23: 341-350.

Bejarano EE. Lista actualizada de los psicódidos (Diptera: Psychodidae) de Colombia. *Folia Entomol Mex*. 2006; 45: 47-56.

Bejarano EE, Castro M, Pérez-Doria A, Hernández-Oviedo E, Vélez A, Vélez ID. Primer informe de *Lutzomyia Franca* en el departamento de Guainía, Amazonia colombiana, y de *Brumptomyia mesai* Sherlock (Diptera: Psychodidae) en el litoral Caribe colombiano. *Neotrop Entomol*. 2007;36:990-993

Bejarano EE, Uribe SI, Pérez-Doria A, Egurrola J, Dib JC, Porter CH. Nuevos hallazgos de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) en la Sierra Nevada de Santa Marta, Colombia. *Acta biol. Colomb*. 2015;20(1):221-224. doi: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v20n1.45176>.

Bensasson D, Zhang D, Hartl DL, Hewitt GM. Trends Ecol Evol. Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. 2001 Jun 1;16(6):314-321.

Besansky NJ, Severson DW, Ferdig MT. DNA barcoding of parasites and invertebrate disease vectors: what you don't know can hurt you. Trends Parasitol. 2003; (12): 545-546.

Bergsten J., Bilton David T., Fujisawa Tomochika, Elliott Miranda, Monaghan Michael T., Balke Michael, Hendrich Lars, Geijer Joja, Herrmann Jan, Foster Garth N., Ribera Ignacio, Nilsson Anders N., Barraclough Timothy G., and Vogler Alfred P. The Effect of Geographical Scale of Sampling on DNA Barcoding. Syst Biol 2012 : sys037v1-sys037.

Berlacher, S. Insect Molecular Systematics. Annual Review of Entomology. 1984; 29: 403-433 DOI: 10.1146/annurev.en.29.010184.002155

Black W, Kondratieff B. Evolution of Arthropod Disease Vectors. *En: Biology of disease vectors*. 2005. 2da Ed. Marquardt *et al.* P. 785.

Cabrera OL, Neira M, Bello F, Ferro C. Ciclo de vida y colonización de *Lutzomyia ovallesi* (Diptera: Psychodidae) vector de Leishmania sp en América Latina. Biomédica. 1999; 19: 223-229.

Cabrera OL, Ferro C. Ciclo de vida de *Lutzomyia spinicrassa*, *L. quasitownsendi* y *L. youngi*, especies del grupo verrucarum (Diptera: Psychodidae). Actualidades Biológicas. 2000; 22: 225-232

Cárdenas R, Pabón E, Anaya H, Sandoval C. Presencia de *Lutzomyia longiflocosa* (Díptera: Psychodidae) en el foco de leishmaniasis tegumentaria americana del municipio de Abrego, Norte de Santander. Primer registro para el departamento. Clon. 2005; 3(1): 7-14.

Casanova C. A soil emergent trap for collections of phlebotomine sand flies. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2001; 96: 273-275.

Caterino MS, Cho S, Sperling FA. The current state of insect molecular systematics: a thriving Tower of Babel. Annu Rev Entomol. 2000; 45: 1-54.

Chianotis BN. Sugar-feeding behavior of *Lutzomyia trapidoi* (Diptera: Psychodidae) under experimental conditions. *Journal of Medical Entomology*. 1974. 11:73-79.

Christensen HA, Fairchild GB, Herrera A, Johnson CM, Young DG, Vásquez AN. The ecology of cutaneous leishmaniasis in the Republic of Panama. *J Med Entomol* 1983 20: 463-484.

Claborn DM, Rowton ED, Lawyer PG, Brown GC, Keep LW. Species diversity and relative abundance of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) on three Army installations in the southern United States and susceptibility of a domestic sand fly to infection with Old World *Leishmania major*. *Mil Med.* 2009;174:1203-8.

Cochero S, Amaya Y, Díaz Y, Paternina M, Luna A, Paternina L y Bejarano (EE. Infección natural de *Lutzomyia cayennensis cayennensis* con parásitos tripanosomatídeos (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) en Los Montes de María, Colombia. *REV CUBANA MED TROP* 2007;59(1):35-9

Comer J, Tesh R. Phlebotomine sand flies as vectors of vesiculoviruses: A review. *Parassitologia.* 1991; 33: 143-150.

Cohnstaedt LW, Beati L, Caceres A, Ferro C, Munstermann LE. Phylogenetics of the Phlebotomine Sand Fly Group *Verrucarum* (Diptera: Psychodidae: *Lutzomyia*). *Am J Trop Med Hyg.* 2011; 84(6): 913–922.

Collins FH, Mendez MA, Rasmussen MO, Mehaffey PC, Besansky NJ, Finnerty V. A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. *Am J Trop Med Hyg.* 1987; 37 (1): 37-41.

Consortium for the Barcode of Life (CBOL). A global standard for identifying biological specimens. National History Museum, Smithsonian Institution, Washington, DC. 2005. (www.barcoding.si.edu).

Contreras Gutiérrez MA. *Lutzomyia* spp. (Diptera: Psychodidae) en zonas cafeteras de la región andina colombiana: taxonomía e importancia médica. Tesis para optar al título de: Magister en Entomología. (2013), Universidad nacional.

Contreras Gutiérrez MA, Vivero RJ, Vélez ID, Porter CH, Uribe S (2014) DNA Barcoding for the Identification of Sand Fly Species (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in Colombia. *PLoS ONE* 9(1): e85496. doi:10.1371/journal.pone.0085496

Cortés L, Pérez-Doria A, & Bejarano EE. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) antropofílicos de importancia en salud pública en Los Montes de María, Colombia. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 61(3), 220-225. (2009). Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602009000300003&lng=es&tln=es.

Coutinho-Abreu IV, Sonoda IV, Fonseca JA, Melo MA, Balbino VQ y Ramalho-Ortigão M. *Lutzomyia longipalpis* s.l. in Brazil and the impact of the Sao Francisco River in the speciation of this sand fly vector. *PARASITE VECTOR*: Vol 1:16, 2008.

Crozier RH1, Crozier YC. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. *Genetics*. 1993 Jan;133(1):97-117.

Dedet JP. Leishmania et leishmaniose du continent américain. *Ann Inst Pasteur Actualités*. 1993.4: 3-25.

Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2001; 27: 305-318.

Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002; 95(3): 239-43.

Duckhouse DA. *A catalogue of the Diptera of the Americas south of the United States. 6A. Family Psychodidae, subfamilies Bruchomyiinae, Trichomyiinae, Sycoracinae and Psychodinae.* Universidade de Sao Paulo, Museu de Zoologia. 1973.

Duckhouse DA & Lewis DJ. Family Psychodidae, pp 93-105. *En: RJ Crosskey [ed]. Catalogue of the Diptera of the Afrotropical región.* British Museum (Natural History). London. 1980.

Dujardin, F. Pont, E. Bianchi Galati. Cryptic speciation suspected by morphometry within *Lutzomyia runoides*. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III – Sciences de la Vie.* 1999; 322(5): 375-382.

Duque P, Vélez I, Morales M, Sierra D. Sand flies fauna involved in the transmission of cutaneous leishmaniasis in Afro-Colombian and American communities of Chocó, Pacific coast of Colombia. *Neotrop Entomol.* 2004; 33: 255-64.

Endris RD, Young DG, P Perkins. Ultrastructural comparison of egg surface morphology of five *Lutzomyia* species (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol.* 1987; 24: 412- 415.

Escovar J, Bello FJ, Morales A, Moncada L, Cárdenas E. 2004. Life tables and reproductive parameters of *Lutzomyia spinicrassa* (Diptera: Psychodidae) under laboratory conditions. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004; 99(6): 603-607.

Fairchild GB, Hertig M. Notes on the *Phlebotomus* of Panama (Diptera, Psychodidae). VII. The subgenus *Shannonomyia*. *Pratt Ann Ent Soc Amer.* 1951; 44: 399-421.

Feliciangeli MD, Castejón O, Limongi J. Egg surface ultrastructure of eight New World phlebotomine sand fly species (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol.* 1993; 30: 651-656.

Feliciangeli MD. Natural breeding places of phlebotomine sandflies. *Med Vet Entomol.* 2004; 18: 71-80.

Fernandez R, Lopez V, Cardenas y Requena E. Description of *Lutzomyia (Trichophoromyia) nautaensis* n. sp. (Diptera: Psychodidae) from the Peruvian Amazon Basin. *En: J. Med. Entomol.* 52(4): 622–625 (2015); DOI: 10.1093/jme/tjv057.

Ferro C, Morales A. Flebótomos de Colombia: Estudios realizados por el laboratorio de entomología 1966-1997. En: Toro G, Hernández CA, Raad J, editores. Instituto Nacional de Salud 1917-1997: una historia, un compromiso. Bogotá: Instituto Nacional de Salud; 1998: 219-33.

Ferro C, Cabrera OL, Ayala M, Santamaria E, Castillo M, Neira M. Especies del grupo verrucarum (Diptera: Psychodidae) y su papel como vectores de dos focos de *Leishmania braziliensis* del centro e Colombia. Resúmenes, XXV Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología, Cali.1998a: Pp. 41.

Ferro C, Marín D, Góngora R, Carrasquilla MC, Trujillo JE, Rueda NK. Phlebotomine vector ecology in the domestic transmission of American cutaneous leishmaniasis in Chaparral, Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 2011;85:847-56.
<http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0560>.

Ferro C, Fuya P, Pérez S, Lugo L y González C. Valoración de la Ecoepidemiología de la leishmaniasis en Colombia a partir de la distribución espacial y ecológica de los insectos vectores. *Biomedica* 31. 2011. (sup. 3): 3-315.

Floch H, Abonnenc E. Phlébotomes de Guyana Française.(VII). Description de six espèces nouvelles. Inst Pasteur Guyane Publ.1944, N° 80: 20.

Forattini OP. Sobre a classificação da subfamília Phlebotominae nas Américas (Diptera, Psychodidae). Papeis avulsos Depto Zool S Paulo. 1971;24:93-111.

Forattini OP. Entomologia médica. Psychodidae, Phlebotominae, Leishmanioses, Bartonelose. São Paulo: Edgard Blücher/Editora da USP; 1973.v.4, 658p

Freitas R y Barrett T. Descriptions of *Lutzomyia* (*Evandromyia*) *georgii* n. sp. and a Synopsis of the Series *infraspinoso* (Diptera: Psychodidae). Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, (2002) Vol. 97(2): 239-245.

Galati EAB. Phylogenetic systematics of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) with emphasis on American groups. *Bol Dir. Malariol y San Amb.* 1995; 35(Supl. 1): 133-142.

Galati EAB. Morfologia, terminologia de adultos e identificação dos táxons da América. Pp.53-175. Em: *Rangel EF, Lainson R (eds.). Flebotomíneos do Brasil.* Rio do Janeiro. Editora Fiocruz. 2003: Pp368.

Galati EAB. Classificação Morfologia e Terminologia E Identificação de Adultos Vol. I. Apostila Disciplina HEP 5752. Bioecologia e Identificação de Phlebotominae. Departamento de Epidemiologia Faculdade de Saúde Pública Universidade de São Paulo Av. Dr. Arnaldo, 715, 01246-904, São Paulo, SP, Brasil. 2010

Galati EAB. Classificação Morfologia e Terminologia E Identificação de Adultos Vol. I. Apostila Disciplina HEP 5752. Bioecologia e Identificação de Phlebotominae. Departamento de Epidemiologia Faculdade de Saúde Pública Universidade de São Paulo Av. Dr. Arnaldo, 715, 01246-904, São Paulo, SP, Brasil. 2014.

Galtier N, Nabholz B, Glemin S, Hurst GD. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology.*2009; 18: 4541–4550.

Godoy R y Galati E. Revalidation of *Nyssomyia fraihai* () (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology.*(2016). DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/jme/tjw108> tjw108.

González R. C, Maguiña V. C, Heras M. F y Conde-Salazar L. Bartonellosis (Fiebre de la Oroya o Verruga Peruana) ¿Enfermedad ocupacional?. *Med. segur. trab.* v.58 n.209 Madrid dic. 2007.

Hamilton J, Ramsoondar T. Attraction of *Lutzomyia longipalpis* to human odours. *Medical and Veterinary Entomology*. 1994. Vol 8: 375-380.

Hebert PDN, Cywinska A, Ball S, de Waard JR. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc Roy Soc Lond B*. 2003; 270: 313– 321.

Hebert PD1, Gregory TR. The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Syst Biol*. 2005 Oct;54(5):852-9.

Herbeck JT1, Novembre J. Codon usage patterns in cytochrome oxidase I across multiple insect orders. *J Mol Evol*. 2003 Jun;56(6):691-701. Hoyos R, Uribe S, y Vélez I. Tipificación de especímenes colombianos de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) mediante “Código de Barras” *Revista Colombiana de Entomología* 38 (1): 134-140 (2012).

Hoyos R, Uribe S, y Vélez I. Tipificación de especímenes colombianos de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) mediante “Código de Barras” *Revista Colombiana de Entomología* 38 (1): 134-140 (2012).

Ibáñez BS. Phlebotominae de México. I. *Brumptomyia* França y Parrot; *Lutzomyia* França, las especies de *L. (Lutzomyia) França* y del grupo verrucarum. *Folia Entomol* 1999 Mex. 107: 61-116.

Ilango K. Structure and function of the spermathecal complex in the phlebotomine sandfly *Phlebotomus papatasi* Scopoli (Diptera: Psychodidae): II. Post copulatory histophysiological changes during gonotrophic cycle. *J Biosci*. 2005; 30 (5): 733-747.

Jaramillo C, Travi BL, Montoya J. Vector competence of some Neotropical sandflies for the *Leishmania (Viannia) braziliensis* complex. *Med Vet Entomol*. 1994; 8: 1-7.

Jinbo U, Kato T, Ito M. Current progress in DNA barcoding and future implications for entomology. *Entomol Sci*. 2011; 14: 107–124.

Jones T, Quinnell R. Testing prediction for the evolution of lekking in the sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. *Animal behavior*. 2002. 63: 605-612.

Jukes T, Cantor C: Evolution of protein molecules, Munro HN, Mammalian protein metabolism, 1969, 21-132. In.: Academic Press, New York

Kamhawi S. 2006. Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes? *Trends Parasitol.* Vol: 22:439-45.

Killick-Kendrick y Killick-Kendrick. Honeydew of aphids as a sugar source for *Phlebotomus ariasi*. *Medical and Veterinary Entomology.* 1:297:302 (1987)

Killick-Kendrick. The biology and control of phlebotomine sand flies. *R. Clin Dermatol.* 1999; 17(3): 279-289.

Klowden M, Zwiebel L. Vector olfaction and behavior. *En: Biology of disease vectors.* 2005. 2da Ed. Marquardt *et al.* Pp. 785.

Kreutzer RD, Corredor A, Grimaldi G, GrogL GR, Rowton ED, Young DG, Morales A, McMahon-Pratt D, Guzmán H, Tesh RB. Characterization of *Leishmania colombiensis* sp. n (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a new parasite infecting humans, animals, and phlebotomine sand flies in Colombia and Panama. *Am J Trop Med Hyg.* 1991; 44(6): 662-675.

Lambraño Cruz LF, Manjarrez G, Bejarano EE. Variación temporal de especies de *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) en el área urbana de Sincelejo (Colombia). *Revista Científica Uninorte,* (2012) Vol 28, N 2.

Lane R.P. Sandflies (Phlebotominae) In: Lane R.P., Crosskey R.W., editors. *Medical Insects and Arachnids.* Chapman and Hall; London: 1993. pp. 78–119

Lanteri AA., Loíacono MS, Margaría C. Aportes de la Biología Molecular a la Conservación de los insectos. Pp.: 207-220. En: Costa, C., S.A. Vanin, J.M. Lobo & A. Melic (eds.). *Proyecto de Red Iberoamericana de Biogeografía y Entomología Sistemática Prlbes 2002.* Sociedad Entomológica Aragonesa, m3m Monografías Tercer Milenio.

Lawyer PG, Young DG. Experimental transmission of *Leishmania mexicana* to hamsters by bites of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from the United States. 1987. *J Med Entomol.* 1987; 24: 458-462.

Leng YJ. A preliminary survey of phlebotomine sandflies in limestone caves of Sichuan and Guizhou Provinces, south- west China, and description and discussion of a primitive new genus *Chinius*. *Ann Trop Med Parasitol.* 1987; 81 (3): 311–317.

Lewis DJ, Young DG, Fairchild GB, Minter DM. Proposals for a stable classification of the Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). *System Entomol.* 1977; 2 (4): 319 –332.

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.

Lucientes J, Antonio J, Gracia MJ, Peribañez MA. Flebotomos, de la biología al control. *REDVET.* 2005; 6 (8). Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n080805/080502B.pdf>

Lunt DH1, Zhang DX, Szymura JM, Hewitt GM. The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Mol Biol.* 1996 Aug;5(3):153-65.

Martínez E, Le Pont F, Torres M, Telleria J, Vargas F, Dujardin JC, Dujardin JP. *Lutzomyia nuñeztovari anglesi* (Le Pont & Desjeux, 1984) as a vector of *Leishmania amazonensis* in a sub-Andean leishmaniasis focus of Bolivia. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;61: 846-9.

Martínez LP, Rebollo JA, Luna AL, Cochero S, Bejarano EE. Molecular identification of the parasites causing cutaneous leishmaniasis on the Caribbean coast of Colombia. *Parasitol Res.* 2010 Feb;106(3):647-52. doi: 10.1007/s00436-009-1712-6.

Mascari T. Novel methods for the control of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). Tesis de Doctorado. University of London. Inglaterra. 2008.

Mazzoni CJ, Souza NA, Andrade-Coelho C, Kyriacou CP, Peixoto AA. Molecular polymorphism, differentiation and introgression in the period gene between *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia whitmani*. *BMC Evol Biol.* 2006 Oct 27;6:85.

Mazzoni CJ, Araki AS, Ferreira GE, Azevedo RV, Barbujani G, Peixoto AA, Franco et al. Multilocus analysis of introgression between two sand fly vectors of leishmaniasis. *BMC Evol Biol.* 2008 May 12;8:141. doi: 10.1186/1471-2148-8-141.

Memmott J 1991. Sandfly distribution and abundance in a tropical rain forest. *J Med Entomol* 5: 403-411.

Montenegro, Franco et al. Presencia del género *Lutzomyia* (Diptera Psychodidae: Phlebotominae) en focos históricos de Bartonellosis en el departamento de Nariño-Colombia. Revista Facultad de Salud - RFS, [S.l.], v. 5, n. 1, p. 37-45, mayo 2015.

Montoya J, Cadena H, Jaramillo C. Rearing and colonization of *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae), a vector of visceral leishmaniasis in Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1998; 93: 263-268.

Montoya-Lerma J, Ferro C. Flebótomos (Diptera: Psychodidae) de Colombia. En Amat G, Andrade MG, Fernández F (eds.) Insectos de Colombia Vol. 2. Bogotá: Editora Guadalupe;1999. p. 211-245.

Morales A, Corredor A, Cáceres E, Ibagos AL, Rodríguez CI. Aislamiento de tres cepas de *Leishmania* a partir de *Lutzomyia trapidoi* en Colombia. Biomédica. 1981; 4: 37-41.

Morales A, Ferro C, De Rodríguez C. Establecimiento de una colonia de *Lutzomyia walkeri* (Newstead, 1914) (Diptera: Phlebotominae). Biomédica.1984; 4: 37-41.

Morales A, Bello F, Cárdenas E. Establecimiento, mantenimiento y productividad de una colonia de laboratorio de *Lutzomyia spinicrassa* Morales, Osorno-Mesa, Osorno y Hoyos, 1969 (Diptera: Psychodidae) en Colombia. Rev. Cienc. Salud. 2005; 3(2): 129-135. Disponible en:

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S169272732005000200003&lng.

Morrison AC 1993. Dispersal of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. J Med Entomol 30: 427-435.

Munstermann LE. Phlebotomine sand flies, the Psychodidae. In: Marquardt, W.C.; Black,WC, Freier JE; Hagedorn HH, Hemingway J, Higgs S, James AA, Kondratieff B, Moore CG. (Eds.). *Biology of Disease Vectors*, Second edition. Elsevier, San Diego, CA. 2004. pp. 141–151.

Munstermann LE. Phlebotomine sand flies, the Pshychodidae. In Biology of disease vectors (2nd edn). Mrquardt WC (Ed). *Elsevier Academic Press*. 2005: 141 -151.

Muñoz G. The sandfly vectors and epidemiology of cutaneous leishmaniasis in the Landázuri focus, Colombia (tesis). Londres: University of London; 1998: Pp.257.

Murray HW1, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *En: The Lancet*. 2005 Oct 29-Nov 4;366(9496):1561-77.

Neira M, Díaz-Martínez A, Bello F, Ferro C. Estudio en condiciones de laboratorio de los ciclos de vida de *Lutzomyia torvida* y *Lutzomyia longiflocosa* (Diptera: Psychodidae), posibles vectores de *Leishmania braziliensis* en la zona cafetera colombiana. *Biomédica*. 1998; 18: 251-255.

Oliveira AFJ, Teles CBG, Medeiros JF, Camargo LMA, Pessoa FAC Description of *Trichophoromyia rufreitasi*, a new phlebotomine species (Diptera, Psychodidae) from Acre State, Brazilian Amazon. *ZooKeys* (2015) 526: 65-73. doi: 10.3897/zookeys.526.6128

Organización Mundial de la Salud OMS 60ª Asamblea Mundial de la Salud. Control de la leishmaniasis. Informe de la Secretaría; Resolución N° A60/10; Ginebra, Suiza. 2007. Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud - OPS, O. P. S. Leishmaniasis: Actualización. 2007.

Ovalle CE, Porrás L, Rey M, Ríos M, Camargo YC. Distribución geográfica de especies de *Leishmania* aisladas de pacientes consultantes al Instituto Nacional de Dermatología Federico Lleras Acosta, E.S.E., 1995-2005. *Biomédica*. 2006; 26(1):145-151.

Padial JM, Miralles A, De la Riva I, Vences M. The integrative future of taxonomy. *Front Zool*. 2010; 7:16. doi:10.1186/1742-9994-7-16.

Padial JM, De La Riva I. Integrative Taxonomists Should Use and Produce DNA Barcodes. *Syst Biol*. 2007;1586:67-68

Paternina LE, Verbel-Vergara D, Romero-Ricardo L, Pérez-Doria A, Paternina-Gómez M, Martínez L, Bejarano EE. Evidence for anthropophily in five species of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from northern Colombia, revealed by molecular identification of bloodmeals. *Acta Tropica* Volume 153, January 2016, Pages 86–92

Pennington J, Wells M. The adult Midgut Structure and Function. *En: Biology of disease vectors*. 2005. 2da. Ed. Marquardt Pp. 785

Pérez J, Ogusuku E. Chorion patterns on eggs of *Lutzomyia* sandflies from the Peruvian Andes. *Med Vet Entomol*. 1997, 11: 127-133.

Pérez-Doria A, Bejarano EE, Sierra D, Vélez ID. Molecular evidence confirms the taxonomic separation of *Lutzomyia tihuiensis* from *Lutzomyia pia* (Diptera: Psychodidae) and the usefulness of pleural pigmentation patterns in species identification. *J Med Entomol.* 2008; 45(4): 653-659.

Pessoa SB, Barreto MP 1948. *Leishmaniose Tegumentar Americana*, Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, 527 pp.

Pinto IdS, Chagas BDd, Rodrigues AAF, Ferreira AL, Rezende HR, Bruno RV, et al. (2015) DNA Barcoding of Neotropical Sand Flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): Species Identification and Discovery within Brazil. *PLoS ONE* 10(10): e0140636. doi:10.1371/journal.pone.0140636
Porter C.H, De Foliart GR. The man-biting activity of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in tropical wet forest environment in Colombia. *Arq Zool Sao Paulo.* 1981; 30: 81-158.

Puillandre N, Lambert A, Brouillet S, Achaz G (2012) ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Mol Ecol* 21: 1864–1877
Pennington J, Wells M. The adult Midgut Structure and Function. *En: Biology of disease vectors.* 2005. 2da. Ed. Marquardt Pp. 785

Rangel EF, Lainson R, Souza AA, Ready P, Azevedo ACR. Variation between geographical populations of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) sensu lato (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1996; 91: 43-50.

Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous Leishmaniasis. *Lancet Infect Dis.* 2007; 7(9):581-96.

Rodriguez-Barraquer I, Gongora R, Prager M, Pacheco R, Montero LM, Navas A, Ferro C, Miranda MC, Saravia NG. Etiologic agent of an epidemic of cutaneous leishmaniasis in Tolima, Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 2008; 78: 276–282.

Rodríguez N, Aguilar CM, Barrios MA, Barker DC. Detection of *Leishmania braziliensis* in naturally infected individual sand flies by the polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1999; 93: 47-49.

Romero M, Sánchez J. Una mirada a la epidemiología y al control de la Leishmaniasis zoonótica en Colombia. *Biosalud.* 2007; 6: 99-111.

Romero-Ricardo L, Lastre-Meza N, Pérez-Doria A, Bejarano EE. DNA barcoding to identify species of phlebotomine sand fly (Diptera: Psychodidae) in the mixed leishmaniasis focus of the Colombian Caribbean. *En: Acta Tropica* <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.03.017>

Rubinoff D. Utility of mitochondrial DNA barcodes in species conservation. *Conserv Biol.* 2006 Aug;20(4):1026-33.

Sábio PB, Andrade AJ, Galati EA. Assessment of the taxonomic status of some species included in the shannoni complex, with the description of a new species of *Psathyromyia* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *J Med Entomol.* 2014 Mar;51(2):331-41.

Santamaría E, Ponce N, Zipa Y, Ferro C. Presencia en el peridomicilio de vectores infectados con *Leishmania (Viannia) panamensis* en dos focos endémicos en el occidente de Boyacá, piedemonte del valle del Magdalena medio, Colombia. *Biomédica.* 2006; 26(suppl.1): 82-94.

Santos TV, Silva FMM, Barata IR, Andrade AJ, Galati EAB. A new species of phlebotomine, *Trichophoromyia adelsonsouzai* (Diptera: Psychodidae) of Brazilian Amazonia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 109: (2014) 140–147. doi: 10.1590/0074-0276130159.

Salomón D. Vectores de leishmaniasis en las Américas. *Gazeta Médica da Bahia* 2009;79 (Supl.3):3-15.

Scarpassa VM, Alencar RB *Lutzomyia umbratilis*, the Main Vector of *Leishmania guyanensis*, Represents a Novel Species Complex? (2012) *PLoS ONE* 7(5): e37341. doi:10.1371/journal.pone.0037341

Schultz MG. A history of bartonellosis (Carrión's disease). *Am J Trop Med Hyg.* 1968 Jul;17(4):503-15.

Sierra A, Vélez B, Uribe S. Identificación de *Lutzomyia* spp. (Diptera: Psychodidae) grupo verrucarum por medio de microscopia electrónica de sus huevos. *Rev biol Trop.* 2000; 48 (2-3): 615-622.

Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública –SIVIGILA. Boletín epidemiológico semana 28.2015- <http://www.ins.gov.co/>

Tesh RB, Guzman H. Sandflies and the agents they transmit. En: The biology of disease vectors. University Press of Colorado. 1996:117-27.

Tesh RB, Boshell J, Modi GB, Morales A, Young DG, Corredor A. Natural infection of humans, animals and phlebotomine sand flies with Alagoas serotype of vesicular stomatitis virus in Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 1987; 36: 653 – 661

Theodor O. Classification of the Old World species of the subfamily Phlebotominae (Diptera: Psychodidae). *Bull Entomol Res.* 1948; 39: 85-115.

Theodor O. On the classification of the American Phlebotominae. *Journal of Med Entomol.* 1965; 2: 171-197.

Travi BL, Montoya J, Solarte Y, Lozano L, Jaramillo C. Leishmaniasis in Colombia. I. Studies on the phlebotomine fauna associated with endemic foci in the Pacific coast region. *Am J Trop Med Hyg.* 1988; 39 :261-6.

Travi BL, Vélez ID, Brutus L, Segura I, Jaramillo C, Montoya J. *Lutzomyia evansi*, an alternate vector of *Leishmania chagasi* in a Colombian focus of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990; 84: 676-677.

Travi B, Montoya J. Manual de entomología médica para investigadores de América Latina. Cali, Colombia. Fundación Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas fundación CIDEIM. 280 paginas. (1994).

Travi BL, Montoya J, Gallego J, Jaramillo C, Llano R, Vélez ID. Bionomics of *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae) vector of visceral leishmaniasis in northern Columbia. *J Med Entomol.* 1996; 33(3):278-285.

Travi BL, Ferro C, Cadena H, Montoya-Lerma J, Adler GH. Canine visceral leishmaniasis: dog infectivity to sand flies from non-endemic areas. *Res Vet Sci.* 2002; 72: 83-6.

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

Uribe S, Lehmann T, Rowton E, Velez ID & Porter CH. Speciation and population structure in the morphospecies *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva) as derived from the mitochondrial ND4 gene. *Mol Phylo Evol.* 2001; 18: 84 – 93.

Valderrama A, García Tavares M y Andrade Filho JD. Phylogeography of the *Lutzomyia gomezi* (Diptera: Phlebotominae) on the Panama Isthmus. *PARASITE VECTOR*: Vol 7:9, 2014.

Valenzuela Jesus G., Garfield Mark, Rowton Edgar D., Van M. Identification of the most abundant secreted proteins from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*, vector of *Leishmania chagasi*. *Pham Journal of Experimental Biology* 2004 207: 3717-3729; doi: 10.1242/jeb.01185.

Vargas GS, Álvarez G, Wolff M, López Y, Gómez ME. Estudio de un foco de leishmaniasis en dos barrios de Remedios, Antioquia, 1990. *Bol Epidemiol de Ant* 2001; 16: 48-59.

Vélez ID, Wolff M, Valderrama R, Escobar JP, Osorio L. Community and environmental risk factors associated with cutaneous leishmaniasis in Montebello, Antioquia, Colombia. En: IDRC, editors. *Leishmaniasis control strategies: a critical evaluation of IDRCsupported research*. London: IDRC Publications; 1991; 261-74.

Vélez ID, Hendrickx E, Robledo SM, Agudelo S. Leishmaniosis cutánea en Colombia y género. *Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, (2001) 17(1):171-180*.

Vexenat JA, Barreto AC, Cuba Cuba C, Marsden PD. Características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana em região endêmica do Estado da Bahia. III. Fauna flebotomínica. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1986; 81: 293-301.

Vivero RJ, Bejarano EE, Contreras MA. Análisis de la estructura primaria y secundaria del ARN de transferencia mitocondrial para serina en siete especies de *Lutzomyia*. *Biomédica*. 2007; 27(3): 429-438.

Vivero RJ, Bejarano EE, Contreras MA. Cambios en el extremo carboxilo terminal de citocromo b como carácter taxonómico en *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae). *Rev. Colomb. Entomol*. 2009; 35(1): 83–88.

Wallbanks KR, Moore JS, Benet LR, Soren R, Molyneux DH, Carlin JM, Perez JE. Aphid derived sugars in the Neotropical sandfly- *Lutzomyia peruensis*. *Tropical and Parasitology*. 42: 60-62 (1990).

Walters Laurel L., Irons Katherine P., Modi Govind B., and Robert B. Tesh. Refractory Barriers in the Sand Fly *Phlebotomus Papatasi* (Diptera: Psychodidae) to Infection with *Leishmania Panamensis*. *Am J Trop Med Hyg* February 1992 46:211-228.

Wolff M, Sierra D, Murcia LM, VÉLEZ ID. Phlebotominae Fauna (Diptera: Psychodidae) in the Department of Amazonas, Colombia. *Neotropical Entomology* 32(3):523-526 (2003).

World Health Organization (WHO). 2010. Control of the leishmaniasis. Report of meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. *WHO Technical Report Series* 949.

World Health Organization (WHO). 2014. Control of the leishmaniasis. Report of meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. WHO Technical Report Series 949.

Young DG, Fairchild GB. Studies on phlebotomine sandflies. Gainesville, Dept. of *Entomology and Nematology*, University of Florida. 1974. 151 pp.

Young DG. A review of the bloodsucking psychodid flies of Colombia (Diptera: Phlebotominae and Sycoracinae). Tech Bull 806. Gainesville: Universidad de la Florida; 1979. Pp.226.

Young DG, Perkins PV, Endriss RG. A larval diet for rearing Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*. 1981. 18:446.

Young DG, Morales A, Kreutzer RD, Alexander B, Corredor A, Tesh RB, Ferro C, de Rodríguez C. Isolations of *Leishmania braziliensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) from cryopreserved Colombian sandflies (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol*. 1987; 24:587-589.

Young DG, Arias JR. Flebótomos: Vectores de leishmaniasis en las Américas. Organización Panamericana de la Salud, Cuaderno Técnico 33; 1992. 28 pp.

Young DG, Duncan MA. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem Am Entomol*. 1994; 54: 1-881.

Zambrano P. Comportamiento de Leishmaniasis en Colombia, Informe Final 2011. Instituto Nacional de Salud, Colombia.

Zapata S. Contribution à l'étude des Psychodopygina d'Equateur (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): Systématique et biologie. 2012. THÈSE Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Reims Champagne-Ardenne.

Zhang DX1, Hewitt GM. Highly conserved nuclear copies of the mitochondrial control region in the desert locust *Schistocerca gregaria*: some implications for population studies. *Mol Ecol*. 1996 Apr;5(2):295-300.

Zhioua E, Chelbi I. Efficacy of active underground rabbit holes around houses for reducing the indoor density of sandflies. *Arch Inst Pasteur Tunis*. 2005; 82: 76 ISOPS.