

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO
PROGRAMA CENTROAMERICANO DE MAESTRÍA EN
ENTOMOLOGÍA

TESIS DE MAESTRÍA

“ESTADO TAXONÓMICO Y RELACIONES FILOGENÉTICAS DE LOS
MIEMBROS DEL GÉNERO *TOXORHYNCHITES* (DIPTERA:
CULICIDAE) EN PANAMÁ: UN ENFOQUE INTEGRADOR”

POR:

RICHARD M. BENNETT VAZ

TESIS SOMETIDA PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN
CIENCIAS CON ÉNFASIS EN ENTOMOLOGÍA

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

2025

APROBADO

_____ Asesor

_____ Jurado

_____ Jurado

RESUMEN

La investigación sobre la sistemática y taxonomía de los mosquitos del Género *Toxorhynchites* (Diptera: Culicidae), conocidos por sus larvas depredadoras de mosquitos vectores de enfermedades, ha sido históricamente escasa, fragmentada, y geográficamente restringida. El presente estudio es un intento, por medio de técnicas de taxonomía integrativa, de elucidar la identidad taxonómica y las relaciones filogenéticas de las especies de *Toxorhynchites* presentes en Panamá. Se recolectaron muestras de *Toxorhynchites* en 10 localidades del país, utilizando métodos de colecta activa y pasiva para larvas. Los especímenes fueron identificados inicialmente en base a caracteres morfológicos del estado adulto. Posteriormente, se extrajo ADN de estas muestras y se amplificó el gen mitocondrial citocromo oxidasa subunidad uno (COI). Las secuencias parciales del gen COI de mosquitos colectados en Panamá fueron cotejadas con secuencias depositadas en los repositorios BOLD Systems y GenBank, y posteriormente, usadas para corroborar la identidad taxonómica de las especies en base a criterios de distancia genéticas y homologías filogenéticas dentro del Género *Toxorhynchites*. Además, se incluyeron especies de otros Géneros dentro de Culicidae para evaluar la posición filogenética de *Toxorhynchites* dentro de esta familia. Los resultados sugieren que *Toxorhynchites* es un grupo monofilético, pero su posición dentro en la cladograma de Culicidae es incierta. Además, reportamos la presencia de cuatro especies de *Toxorhynchites* en Panamá, cuyos hábitats larvales parecen ser discretos. Los resultados de la identificación molecular alinean con la identidad taxonómica de las tres especies que fueron identificadas morfológicamente, y elucidan las relaciones filogenéticas con otros miembros de *Toxorhynchites*. Además, estos hallazgos sugieren la necesidad de revisar la nomenclatura de ciertos grupos dentro del Género *Toxorhynchites*. Las secuencias parciales del gen COI obtenidas de especímenes colectados en Panamá fueron efectivas para corroborar no solo la identidad taxonómica de las especies locales, sino también las relaciones filogenéticas con otras secuencias del Género *Toxorhynchites* de otros 10 países. Sin embargo, el gen COI no posee la resolución suficiente para esclarecer la posición ancestral y/o derivada de *Toxorhynchites* dentro de la Familia Culicidae.

Palabras clave: COI 5P (Citocromo Oxidasa I), *Culicidae*, Filogenética, Monofilético, Taxonomía integrativa, *Toxorhynchites*.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	4
ÍNDICE DE TABLAS.....	6
ÍNDICE DE FIGURAS	6
INTRODUCCIÓN.....	7
OBJETIVOS.....	11
OBJETIVOS GENERALES	11
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	11
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	12
GENERALIDADES DEL GÉNERO <i>TOXORHYNCHITES</i>	12
EL GÉNERO <i>TOXORHYNCHITES</i> COMO AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO	13
SISTEMÁTICA, NOMENCLATURA Y TAXONOMÍA DE <i>TOXORHYNCHITES</i>	17
ESPECIES NEOTROPICALES DE <i>TOXORHYNCHITES</i> PRESENTES EN PANAMÁ.....	23
METODOLOGÍA.....	25
MUESTREO DE MOSQUITOS <i>TOXORHYNCHITES</i>	25
IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE <i>TOXORHYNCHITES</i>	26
EXTRACCIÓN DE ADN, AMPLIFICACIÓN, Y SECUENCIACIÓN DEL GEN MITOCONDRIAL CITOCROMO OXIDASA SUBUNIDAD UNO (COI).....	27
SECUENCIAS DEL GEN COI MINADAS DE GENBANK Y BOLD SYSTEMS.....	27
ANÁLISIS FILOGENÉTICO	29
RESULTADOS	32
IDENTIDAD TAXONÓMICA DE LAS ESPECIES DE <i>TOXORHYNCHITES</i> PRESENTES EN PANAMÁ	32
RELACIONES FILOGENÉTICAS DENTRO DEL GÉNERO <i>TOXORHYNCHITES</i>	42
POSICIÓN FILOGENÉTICA DE <i>TOXORHYNCHITES</i> DENTRO DE LA FAMILIA CULICIDAE.....	45
DISCUSIÓN.....	47
CONCLUSIONES.....	56
RECOMENDACIONES	58
REFERENCIAS	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Posición filogenética de Toxorhynchites dentro de la Familia Culicidae de acuerdo con antecedentes.....	21
Tabla 2. Criterios de selección (exclusión e inclusión) para las secuencias del gen mitocondrial COI de las bases de datos globales.....	28
Tabla 3. Tabla de resultados del muestreo de los mosquitos del Género Toxorhynchites en Panamá.	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa con las localidades de muestreo visitadas durante este estudio.	26
Figura 2. Géneros de mosquitos clasificados en larvas predadoras, larvas no predadoras, adultos hematófagos, adultos no hematófagos.....	31
Figura 3. Mapa de Panamá demarcando los sitios de colecta de los especímenes de Toxorhynchites que fueron secuenciados para el gen COI.	34
Figura 4. Árbol filogenético de los mosquitos del Género Toxorhynchites de Panamá construido con secuencias parciales del gen COI y el método estadístico Neighbor-Joining.....	35
Figura 5. Características morfológicas del adulto de la especie Toxorhynchites moctezuma.	36
Figura 6. Características morfológicas del adulto de la especie Toxorhynchites del Clado B.....	38
Figura 7. Características morfológicas del adulto de la especie Toxorhynchites hypoptes.	40
Figura 8. Características morfológicas del adulto de Toxorhynchites del Clado C, que corresponde posiblemente a la especie: Toxorhynchites haemorroidalis superbus.....	41
Figura 9. Árbol filogenético global del Género Toxorhynchites construido con el método Maximum Likelihood, utilizando secuencias del gen COI de individuos colectados en Panamá y otras secuencias minadas de BOLD y GenBank.	42
Figura 10. Árboles filogenéticos con clados por Género reducidos, construidos con el método Maximum Likelihood; utilizando secuencias de Toxorhynchites colectados en Panamá y secuencias minadas de Toxorhynchites y otros miembros de Culicidae.	45

INTRODUCCIÓN

Los mosquitos son animales invertebrados, y se ubican taxonómicamente dentro del Filo Artrópoda, Clase Insecta, Orden Diptera, y Familia Culicidae. Históricamente, los mosquitos han sido considerados sinónimo de picaduras, sufrimientos, y malestares para nuestra sociedad. Esto debido a su hábito hematófago y la capacidad de transmitir patógenos causantes de enfermedades en los seres humanos. La malaria, fiebre amarilla, Chikungunya y dengue son todas enfermedades transmitidas por mosquitos que causan gran morbilidad y mortalidad a nivel mundial (Delrieu et al., 2023; D. S. Shepard et al., 2016).

A pesar de la gran significancia en salud pública que poseen algunas especies dentro de Culicidae (> 10%), existe también un grupo de especies no vectores altamente especializadas, que han sido estudiadas por su potencial como agentes de control biológico, y actualmente, son consideradas aliadas en la lucha integral contra los mosquitos vectores (Collins & Blackwell, 2000). Todas las especies del Género *Toxorhynchites*, conocidos vernáculamente como “Mosquito elefante” o “Asesino de mosquitos”, son depredadoras durante las etapas larvales y se alimentan principalmente de las larvas de otros mosquitos (Collins & Blackwell, 2000). Por otro lado, a diferencia de los mosquitos vectores, las hembras de *Toxorhynchites* no se alimentan de sangre, y por lo tanto, no representan peligro alguno de infección o molestia para los seres humanos (Donald et al., 2020). Las hembras de *Toxorhynchites* adquieren los nutrientes necesarios para la ovogénesis durante la etapa larval depredadora (Collins & Blackwell, 2000; Donald et al., 2020). Las larvas de *Toxorhynchites* son voraces depredadores y algunas especies pueden consumir hasta 5000 larvas de mosquitos vectores, dependiendo del estadio larval (Focks, 2007). Bennette y colaboradores (2018) reportaron que una larva de cuarto estadio de *Toxorhynchites splendens* consumió hasta 222 larvas del mosquito transmisor del dengue, *Aedes aegypti*.

El control de los mosquitos vectores de enfermedades ha consistido tradicionalmente en la aplicación de insecticidas para aniquilarlos. Sin embargo, el uso indiscriminado de este método de control químico ha demostrado ser insostenible y perjudicial para las especies no vectores. Por ejemplo, algunos estudios previos reportan una mortalidad de hasta 93 % en insectos polinizadores como las abejas sin aguijón, luego de estar expuestas a la nebulización con insecticidas destinados al control de mosquitos (Abeyasuriya et al., 2017). La aplicación de insecticidas en ecosistemas terrestres también afecta a los ecosistemas acuáticos mediante escurrimiento, aniquilando de esta manera tanto a organismos terrestres como acuáticos; y potencialmente causando efectos disruptivos de cascada en las cadenas tróficas de ambos tipos de ecosistemas (Niemi et al., 1999). Adicionalmente, poblaciones de mosquitos vectores del Género *Aedes* han demostrado tener capacidad de sobrevivir el efecto letal de estos químicos, generando adaptabilidad y resistencia a los insecticidas sintéticos (Vontas et al., 2012).

Es necesario explorar opciones más sostenibles para el control de los mosquitos vectores y usarlas en conjunto con otras estrategias de control más amigables con el ambiente para potenciar sus efectos. Una de estas opciones más amigables es la implementación de mosquitos nativos del Género *Toxorhynchites* como agentes de control biológico, tomando en cuenta que sus larvas atacan directamente a las larvas de los mosquitos vectores y pueden ser efectivos en lugares fuera del alcance de métodos tradicionales de control (Collins & Blackwell, 2000).

El uso de especies de *Toxorhynchites* en el manejo de mosquitos vectores ha dado resultados positivos, demostrando una reducción significativa del vector en el área de aplicación (Focks et al., 1982; Toohey et al., 1985). Los mejores resultados provienen de su aplicación en el manejo integrado de plagas; sin embargo, algunos esfuerzos de control biológico utilizando *Toxorhynchites* han sido poco efectivos debido a la falta de conocimiento sobre la taxonomía, biología, y ecología

de la especie utilizada (Donald et al., 2020). Se ha demostrado que la efectividad de algunas especies de *Toxorhynchites* como depredadores de larvas de vectores puede variar en base a la estructura de su hábitat (Mohamad & Zuharah, 2014). Su efectividad para controlar un mosquito vector puede depender de su “preferencia” alimenticia por una presa en particular (Malla et al., 2023), o su coincidencia en selección de sitio de oviposición con los mosquitos vectores (Focks et al., 1983), las cuales pueden variar dependiendo de la especie de *Toxorhynchites*.

La investigación del Género *Toxorhynchites* ha tenido una perspectiva principalmente enfocada en el control biológico, lo cual ha resultado en el descuido de otros aspectos importantes, como su taxonomía, sistemática y evolución. En el pasado, ha habido casos en el que una sola especie ha sido nombrada con varios nombres distintos, o identificada de manera errónea. Igualmente, dos especies distintas han sido confundidas e identificadas como una sola, lo cual puede complicar los esfuerzos de control biológico y el estudio del Género *Toxorhynchites* en general (Donald et al., 2020).

A pesar del potencial que tienen las especies de *Toxorhynchites* como agentes de control biológico, la mayoría han sido poco estudiadas en su taxonomía, biología, ecología y comportamiento. Antes de poder incluirlos de manera exitosa en esfuerzos de control biológico, es necesario aumentar nuestro entendimiento sobre aspectos importantes de su historia demográfica y evolutiva (Collins & Blackwell, 2002; Donald et al., 2020; Focks, 2007). Entre los aspectos que han sido poco estudiados en este grupo de mosquitos, están su identidad taxonómica, las relaciones filogenéticas entre las especies del grupo y la posición de *Toxorhynchites* dentro de Culicidae; lo cual ha resultado en una clasificación sistemática incierta (Donald et al., 2020).

El presente estudio busca elucidar aspectos relacionados con la sistemática del Género *Toxorhynchites* utilizando herramientas de taxonomía integrativa. A través del análisis de

secuencias parciales del gen mitocondrial citocromo oxidasa subunidad uno (COI), obtenidas de muestras de *Toxorhynchites* colectadas en Panamá, y su comparación con otras secuencias de *Toxorhynchites*, del mismo marcador, obtenidas de muestras colectadas a nivel mundial y depositadas en repositorios como GenBank ([GenBank Overview \(nih.gov\)](#)) y BOLD Systems ([Bold Systems v4](#)); investigamos las relaciones filogenéticas entre las principales especies del grupo. Además, las muestras de *Toxorhynchites* colectadas en Panamá fueron previamente identificadas en base a caracteres morfológicos y corroboradas taxonómicamente mediante el uso de matrices de distancias genética entre secuencias de la región Folmer o Barcoding del gen COI. Esto nos permitió entender cuántas especies hay en el país y donde encajan dentro de la filogenia del Género *Toxorhynchites*. Finalmente, el análisis también incluye especies de mosquitos de otros géneros con características o estrategias ecológicas similares y distintas a las especies de *Toxorhynchites* (eje. larvas depredadoras y larvas filtradoras), lo cual permitirá entender la naturaleza monofilética o parafilética de *Toxorhynchites*, así como elucidar su posición dentro de la filogenia de Culicidae.

OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

- Investigar la identidad taxonómica y relaciones filogenéticas de los mosquitos del Género *Toxorhynchites*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar las relaciones filogenéticas dentro del Género *Toxorhynchites* mediante análisis filogenéticos.
- Identificar la posición filogenética de *Toxorhynchites* en la topología de Culicidae.
- Verificar la identidad taxonómica y relaciones filogenéticas entre las especies de *Toxorhynchites* presentes en Panamá.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

1. El Género *Toxorhynchites* es un grupo natural o monofilético dentro de la subfamilia Culicinae.
2. Las especies del Género *Toxorhynchites* presentes en Panamá son unidades evolutivas independientes.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

GENERALIDADES DEL GÉNERO *TOXORHYNCHITES*

Algunos miembros del Género *Toxorhynchites* son considerados entre los más coloridos y grandes en tamaño dentro de Culicidae; su probóscide esta curvada hacia abajo y adaptada para alimentarse de fluidos ricos en azúcar, como frutas o néctar de flores (Focks, 2007). Se sabe poco sobre las estrategias de alimentación y el papel de los adultos de *Toxorhynchites* en la polinización (Donald et al., 2020). Además, las observaciones de campo sobre el comportamiento de alimentación en la etapa adulta son muy limitadas y no permiten entender rasgos importantes de la biología de los adultos (Collins & Blackwell, 2000). Las hembras de *Toxorhynchites* ovipositan un solo huevo ovalado de color blanco, por sitio de oviposición; sobrevolando y soltándolo sin hacer contacto con el agua (Steffan et al., 1981). Los huevos tienen una capa exterior hidrofóbica y flotan en la superficie del agua (Focks, 2007). La fecundidad o número de huevos puestos por la hembra por día varía mucho entre las especies de *Toxorhynchites*; con algunas colocando entre 1 y 3.2 huevos por día, mientras que otras pueden poner hasta 14.3 huevos en un solo día (Focks, 2007; Steffan et al., 1980).

Los miembros del Género *Toxorhynchites* están distribuidos en regiones tropicales alrededor del mundo, con algunas especies habitando regiones subtropicales e incluso templadas; pero se sabe poco sobre la distribución de las especies del grupo en general (Collins & Blackwell, 2000). La taxonomía confusa de estos mosquitos ha trabajado en contra del conocimiento sobre la distribución geográfica de las especies, lo cual a su vez desvirtúa aún más su taxonomía y sistemática. En América Central, esto a resultado en la identificación errónea de especies comunes de *Toxorhynchites* como *Toxorhynchites hypoptes* y *Toxorhynchites moctezuma* (Zavortink &

Chaverri, 2009). La integración de métodos de taxonomía molecular con trabajos robustos de taxonomía en base a caracteres morfológicos tiene el potencial para elucidar la identidad taxonómica y posición filogenética de las especies del Género *Toxorhynchites*. De esta misma manera, tener claridad y certeza sobre la distribución geográfica de cada especie, puede jugar un papel importante en obtener una taxonomía precisa.

EL GÉNERO *TOXORHYNCHITES* COMO AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO

Debido a su biología y ecología, el Género *Toxorhynchites* ha sido considerado como un agente candidato para el control biológico de mosquitos vectores (Collins & Blackwell, 2000; Donald et al., 2020; Focks, 2007). Collins & Blackwell (2000) mencionan que el Género *Toxorhynchites* fue propuesto como un candidato potencial para el manejo de mosquitos vectores en las primeras décadas de 1900, por W. R. Colledge. Las palabras de Colledge fueron textualmente las siguientes: “Pero en el *Toxorhynchites* creemos que tenemos un vegetariano que no hace daño a ningún ser humano, y al mismo tiempo es un enemigo mortal para los jóvenes de otros tipos dañinos dentro de la Familia Culicidae. Se puede contratar en términos muy razonables. Sus horas de trabajo no están limitadas y es muy poco probable que se declare en huelga.” (Steffan et al., 1981). Desde entonces, ha habido múltiples esfuerzos para investigar y estudiar los efectos del uso de estos mosquitos para el manejo de vectores; muchos de los cuales han mostrado resultados prometedores.

En 1980, Focks et al., (1982) realizaron experimentos de campo en los que se introdujeron larvas de primer estadio de *Toxorhynchites rutilus* en diferentes tipos de contenedores artificiales, para evaluar su efectividad en el control de larvas de *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus*. La ubicación fue un vecindario de Nueva Orleans (Estados Unidos) con poblaciones de *Aedes aegypti* por encima del promedio habitual por residencia. Los experimentos arrojaron resultados positivos, ya que *Toxorhynchites rutilus* logró un control promedio general del 74% de los

mosquitos vectores en los contenedores; con un control promedio del 90% para uno de los tipos de contenedores artificiales.

Por otro lado, la introducción de adultos de *Toxorhynchites amboinensis* en la isla Yanuca, Fiyi, en 1980 mostró resultados efectivos similares (Toohey et al., 1985). Toohey et al. (1985) monitorearon latas y neumáticos colocados alrededor de la isla, antes y después de la liberación de *Toxorhynchites amboinensis*; y estimaron una reducción de presas del 61.5% y 90%, para cada tipo de contenedor, respectivamente. Un estudio más reciente, enfocado en el monitoreo de ovitrampas en un cementerio de Malasia, registró datos sobre la presencia y el número de *Toxorhynchites splendens*, *Aedes albopictus* y *Culex fuscocephala* (Nyamah et al., 2011). El estudio encontró una correlación negativa entre la presencia de *Toxorhynchites splendens* y la presencia de *Aedes albopictus* en las ovitrampas, con el número de ovitrampas positivas para *Aedes albopictus* disminuyendo a medida que aumentaba la presencia de *Toxorhynchites splendens* en las mismas.

Aunque varios estudios han mostrado resultados prometedores en la aplicación de mosquitos *Toxorhynchites* como agentes de control biológico, este no siempre ha sido el caso. Una serie de experimentos de campo en Nueva Orleans (Estados Unidos), que involucraron la liberación de *Toxorhynchites rutilus* en entornos urbanos, mostraron una pobre dispersión espacial de esta especie (Focks et al., 1983). Los experimentos consistieron en liberar hembras grávidas de *Toxorhynchites rutilus* en un campo de golf, y jardines caseros en un área de nueve cuerdas; y monitorear su oviposición en contenedores artificiales. Focks et al. (1983) descubrieron que *Toxorhynchites rutilus* ovipositó con mayor frecuencia en huecos de árboles que en los contenedores artificiales donde ocurren las larvas de mosquitos vectores como *Aedes aegypti*, limitando su dispersión en entornos urbanos y su potencial para controlar dicho vector. Algunas especies

de *Toxorhynchites* pueden ser más adecuadas para controlar *Aedes* que *Culex*, ya que sus larvas pueden depredar más frecuentemente a las de *Aedes* (Bennette et al., 2018; Nyamah et al., 2011). Elegir una especie de *Toxorhynchites* que oviposite con mayor frecuencia en neumáticos y otros contenedores artificiales, en lugar de agujeros naturales como huecos de árboles y plantas epífitas, podría haber mejorado la dispersión del mosquito depredador en los experimentos. No obstante, esta lógica basada en preferencias ecológicas de las hembras grávidas no fue utilizada en esta ocasión (Focks et al. 1983).

Los miembros del Género *Toxorhynchites* son crípticos y la identificación de especies basada solo en la morfología de las larvas o los adultos es difícil; lo que ha resultado en problemas taxonómicos como identificaciones erróneas, especies nombradas dos veces, o dos especies distintas nombradas como una misma especie; obstaculizando su efectividad en los esfuerzos de control biológico (Collins & Blackwell, 2000; Donald et al., 2020). Zavortink y Chaverri (2009), demuestran como esto puede ocurrir, con el caso de la clasificación errónea de *Toxorhynchites moctezuma* y *Toxorhynchites hypoptes* como sinónimos de *Toxorhynchites theobaldi* en Centroamérica. Zavortink y Chaverri (2009) explican que *Toxorhynchites theobaldi* fue descrito de especímenes encontrados en Colombia, a 2,700 metros de altura sobre el nivel del mar, lo cual hace poco probable que los especímenes descritos como *Toxorhynchites theobaldi* en tierras bajas de Centroamérica realmente hayan sido esta especie; y presentan tablas de caracteres morfológicos para separar estas especies crípticas.

Pocos estudios incluyen esfuerzos de taxonomía integrativa que faciliten la identificación con caracteres morfológicos de mosquitos del Género *Toxorhynchites*, y que a la vez, tengan respaldo de taxonomía molecular. Tyagi et al. (2015), presentan un esfuerzo más reciente que proporciona una clave dicotómica dedicada a 25 especies del Subgénero de mismo nombre *Toxorhynchites* de

la región sur este de Asia; e incluye la descripción de una nueva especie que fue confirmada como nueva a través de la secuenciación del gen COI. Ribeiro, (2005) presenta una clave dicotómica para las especies conocidas de *Toxorhynchites* Afro tropicales, sin embargo, hay poco respaldo molecular para esta región.

La taxonomía del Género *Toxorhynchites* en el continente americano requiere de mayor trabajo y esfuerzos respaldados con técnicas moleculares. Actualmente una de las pocas herramientas para identificar *Toxorhynchites* del nuevo mundo proviene de claves dicotómicas de 1928 del libro “The Mosquitoes of the Americas”; el cual incluye a *Toxorhynchites* como “Megarhinus”, puesto que el Género se conocía por esa nominación a comienzos del siglo veinte (Dyar, 1928). Trabajos más recientes como los de Zavortink y Chaverri, (2009), aclaran ciertas inconsistencias como la identificación errónea de *Toxorhynchites moctezuma* y *Toxorhynchites hypoptes* en Centroamérica y proveen herramientas de identificación más recientes. Además, demuestran la importancia de tomar en cuenta información espacial relacionada con la distribución geográfica de las especies y como esta puede ser efectiva en estudios taxonómicos. Este tipo de trabajos son necesarios para esclarecer la identidad taxonómica de los miembros de este Género, no obstante, es elemental hacerlos de la mano con técnicas de taxonomía molecular que respalden los resultados. Integrar técnicas de taxonomía tradicional en base a morfología con técnicas moleculares modernas basadas en el uso de macromoléculas permite generar conocimiento innovador sobre la sistemática y distribución de especies, y nos brinda además la posibilidad de delimitar nuevos taxones o de ampliar los rangos de distribución de las especies ya descritas. Igualmente, la extracción y secuenciación de ADN, por ejemplo, nos permite elucidar los factores que promueven la formación y diversificación de especies dentro de *Toxorhynchites* incluyendo las barreras ecológicas como geográficas, altitudinales, y/o climáticas.

SISTEMÁTICA, NOMENCLATURA Y TAXONOMÍA DE *TOXORHYNCHITES*

En la actualidad, *Toxorhynchites* es considerado el único Género dentro de la tribu Toxorhynchitini de la Subfamilia Culicinae; y contiene aproximadamente 90 especies divididas en los Subgéneros *Lynchiella* y *Ankylorhynchus*, ambos del nuevo mundo, mientras que *Toxorhynchites* es del viejo mundo, y *Afrorhynchus* de África (Donald et al., 2020). Este no siempre fue el caso; ya que durante la mayor parte del siglo veinte, el Género *Toxorhynchites* fue considerado como una Subfamilia aparte dentro de Culicidae, llamada Megarhinia; la cual incluía los Géneros *Megarhinus* y *Toxorhynchites* (Theobald, 1903). Los entomólogos de la época, como Fred Theobald, clasificaron al grupo como Subfamilia Toxorhynchitinae basándose en los caracteres morfológicos distintivos del grupo, entre ellos, su probóscide curvada hacia abajo; carácter que no comparten con ningún otro miembro dentro de Culicidae. Posteriormente, la taxonomía de *Toxorhynchites* fue revisada, determinándose que solo existía un Género con el nombre *Megarhinus*; como podemos ver en los trabajos de Harrison Dyar (Dyar, 1928). A mediados del siglo veinte se determinó que *Megarhinus* era homólogo con el nombre *Toxorhynchites* que había sido utilizado para nombrar al grupo inicialmente; y de esta manera *Toxorhynchites* reemplazó a *Megarhinus* como nombre del Género. *Toxorhynchites* se mantuvo como el único Género en la Subfamilia Toxorhynchitinae, grupo hermano de la Subfamilia Culicinae durante la mayor parte de este siglo. Sin embargo, avances más recientes con técnicas de taxonomía molecular y análisis filogenéticos llevaron a revisar esta clasificación nuevamente.

La integración de técnicas de taxonomía molecular con técnicas tradicionales de identificación en base a caracteres morfológicos ha mejorado nuestro entendimiento de las relaciones entre los miembros de Culicidae y *Toxorhynchites*. Un estudio por Mitchell et al. (2002) evaluó el potencial del gen mitocondrial citocromo oxidasa subunidad uno (COI) para elucidar la identidad taxonómica

de especies de mosquitos, y poder aclarar con esto el estado cuestionado de *Toxorhynchites* como parte de la Subfamilia *Toxorhynchitinae*. Los resultados del estudio colocaron a *Toxorhynchites* como grupo hermano de *Sabehtes*, es decir que no apoyaron la posición monofilética de *Toxorhynchitinae*, sino que *Toxorhynchites* fue ubicado dentro de la Subfamilia *Culicinae*. El estudio de Mitchell et al. (2002) demostró la efectividad de las técnicas moleculares para elucidar relaciones filogenéticas entre especies de mosquitos y sentó la base para estudios de sistemática del Género *Toxorhynchites*. A pesar de la contribución notable de Mitchell et al. (2002), su estudio incluyó una cantidad relativamente pequeña de especies dentro de la Familia *Culicidae*, lo cual pudo limitar la robustez de sus inferencias. Incluir una mayor cantidad de especies de mosquitos en este análisis, es decir especies representativas de otros Géneros de *Culicidae*, hubiese podido cambiar el resultado obtenido, brindando un mayor entendimiento de las relaciones evolutivas entre los miembros de *Culicidae* y *Toxorhynchites*. Por otro lado, a pesar de que este estudio resalta la importancia de integrar técnicas moleculares con técnicas morfológicas de taxonomía, los autores solo se enfocaron en técnicas moleculares. De igual manera, el estudio realizado por Mitchell et al. (2002) no fue representativo de la diversidad geográfica de *Toxorhynchites* y otros miembros de *Culicidae*, al incluir muestras mayormente de un solo continente.

Un estudio por Shepard et al. (2006) utilizó ADN ribosomal del gen 18S para investigar las relaciones filogenéticas entre los miembros de *Culicidae*. A diferencia de Mitchell et al. (2002), los resultados de Shepard et al. (2006) colocan al Género *Toxorhynchites* como grupo monofilético hermano del resto de los taxa dentro de la Subfamilia *Culicinae*, y mencionó que, este grupo podría ser incluido dentro de la Subfamilia *Culicinae* o mantenerse como parte de su propia Subfamilia *Toxorhynchitinae*. El estudio de Shepard et al. (2006) se enfocó en mosquitos del Noreste de los Estados Unidos y no incluyó otras especies de mosquitos tropicales pertenecientes a la Subfamilia *Culicinae*, los cuales pudiesen potencialmente estar más cercanamente relacionados con

Toxorhynchites. Esta limitación geográfica en cuanto a la diversidad de especies incluidas en Shepard et al. (2006), puede ser la razón por la que los resultados colocan a *Toxorhynchites*

Por otro lado, Reidenbach et al. (2009), buscaron resolver las relaciones filogenéticas entre miembros de Culicidae, utilizando datos fósiles y secuencias de ADN para inferir sobre los tiempos de diversificación de las especies de mosquitos. El estudio utilizó genes nucleares y caracteres morfológicos; para elucidar las relaciones filogenéticas entre 25 géneros de mosquitos, entre ellos *Toxorhynchites* (Reidenbach et al., 2009). Los investigadores (Reidenbach et al., 2009) utilizaron secuencias de *Toxorhynchites amboinensis* en su análisis y fósiles de *Toxorhynchites mexicanus* para estimar el tiempo de divergencia. Sus resultados colocaron nuevamente a *Toxorhynchites* dentro de la Subfamilia Culicinae, justo a lado del Género *Aedeomyia*; sin embargo, el estudio menciona que resultados sobre estas relaciones internas dentro de Culicinae fueron inconsistentes y requieren de un mayor esfuerzo taxonómico de muestreo para ser resueltas (Reidenbach et al., 2009).

Un estudio realizado por Zhou et al. (2014), utilizó “Deep transcriptome profiling” para identificar y comparar los genes quimiorreceptores de *Toxorhynchites amboinensis* con los de mosquitos hematófagos. Los investigadores Zhou et al. (2014) emplearon individuos de las especies *Anopheles gambiae*, *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti*, y *Toxorhynchites amboinensis*, y utilizaron los genes identificados para hacer un análisis filogenético y elucidar las relaciones entre estos taxa. Los resultados colocaron a *Toxorhynchites* dentro de la Subfamilia Culicinae, como grupo hermano del Género *Aedes* (Zhou et al., 2014). El enfoque de este trabajo fue entender variaciones en los quimiorreceptores de los mosquitos hematófagos y de aquellos no hematófagos como *Toxorhynchites* (Zhou et al., 2014), y, por ende, no incluyó grupos potencialmente más cercanos a *Toxorhynchites* en su análisis filogenético. Los hallazgos de Zhou et al. (2014) proporcionan una

base sólida para estudios sobre la evolución de quimiorreceptores en mosquitos, pero su análisis filogenético limitado a cuatro especies miembros de Culicidae, nos brinda una topología incompleta sobre la posición del Género *Toxorhynchites* dentro de Culicidae.

Un trabajo realizado por da Silva et al. (2020) investiga la historia evolutiva de Culicidae, con un enfoque en la Subfamilia Culicinae; utilizando el genoma mitocondrial de 15 Géneros y 89 especies de mosquitos. Con respecto al Género *Toxorhynchites*, los resultados lo colocaron dentro de la Subfamilia Culicinae, pero hubo variabilidad en cuanto a la posición exacta dentro de esta Subfamilia (da Silva et al., 2020). Esta variabilidad demuestra la complejidad de las relaciones filogenéticas entre mosquitos y la necesidad de continuar investigándolas. El estudio de da Silva et al. (2020) utilizó una sola especie de *Toxorhynchites* en su análisis, pero un estudio dedicado a este Género pudiese obtener resultados más robustos en cuanto a su posición aumentando la diversidad de sus representantes, al igual que la de representantes de otros Géneros de Culicidae potencialmente más cercanos.

Un estudio más reciente por Lorenz et al. (2021), utilizó el genoma mitocondrial completo de 102 especies de Culicidae, distribuidas en 21 Géneros, y análisis filogenéticos. Los resultados colocaron a la tribu Toxorhynchitini dentro de la Subfamilia Culicinae, como grupo hermano a Aedeomyini y cercano a Sabethini (Lorenz et al., 2021). Este estudio buscaba estudiar las relaciones filogenéticas dentro de la familia Culicidae, con un enfoque en grupos neotropicales, y estimar tiempos de divergencia entre ellos (Lorenz et al., 2021). Lorenz et al. (2021), presentaron una contribución significativa a nuestro entendimiento sobre la evolución y distribución de los miembros de Culicidae; y proporcionan una filogenia dedicada a Culicidae neotropicales. Además, elucidan el origen filogenético del Género *Toxorhynchites*, pero solo utilizan en su análisis una especie neotropical de *Toxorhynchites*, el cual tiene distribución global. Estudios enfocados en *Toxorhynchites* pudiesen

tener resultados más representativos de la diversidad del grupo al incluir varias especies de sus cuatro subgéneros y miembros de todos los continentes donde existen representantes del grupo. La tabla 1 resume los hallazgos de los estudios discutidos en relación a la posición de *Toxorhynchites* dentro de Culicidae.

Tabla 1. Tabla resumen con información sobre la posición filogenética de *Toxorhynchites* dentro de la Familia Culicidae de acuerdo con los estudios de Mitchell et al. (2002), Shepard et al. (2006), Reidenbach et al. (2009), Zhou et al. (2014), da Silva et al. (2020) y Lorenz et al. (2021).

Estudio	Apoya la hipótesis de <i>Toxorhynchites</i> dentro de la subfamilia Culicinae	Apoya la hipótesis de <i>Toxorhynchites</i> fuera de la subfamilia Culicinae
Mitchell et al. (2002)	x	
Shepard et al. (2006) *		x
Reidenbach et al. (2009)	x	
Zhou et al. (2014)	x	
da Silva et al. (2020)	x	
Lorenz et al. (2021)	x	

* Shepard et al. (2006) * propone que *Toxorhynchites* pertenece a la subfamilia Toxorhynchitinae.

Es importante resaltar que en estudios dedicados a investigar las relaciones filogenéticas en grupos diversos y de amplia distribución geográfica, es necesario ser igual de abarcadores en nuestro análisis con la diversidad biológica y el área geográfica representada por estas. Un enfoque limitado en estos aspectos puede resultar en una topología débil, especialmente cuando trabajamos con

grupos cuya distribución es global como *Toxorhynchites*. Al no incluir representantes de otras regiones, particularmente áreas tropicales, podemos estar excluyendo de nuestro estudio, relaciones evolutivas importantes y diversidad genética que pudiese darnos una filogenia más precisa y comprensiva. La inclusión de mosquitos con estrategias ecológicas similares a *Toxorhynchites* en estudios filogenéticos es clave para entender sobre su historia evolutiva y origen, la evolución de la depredación en las larvas, la naturaleza no hematófaga de los adultos, y su relación con otros miembros dentro de Culicidae. Por ejemplo, las larvas de *Sabethes* y *Trichoprosopon* exhiben depredación facultativa, mientras que las larvas del Género *Lutzia* dentro de *Culex* y del Subgénero *Psorophora* son depredadores obligados (Hancock et al., 2022). Los rasgos predatorios de las larvas de mosquitos del Género *Toxorhynchites* pueden haber evolucionado a partir de caracteres plesiomórficos en estos grupos y compartir un ancestro común con alguno de ellos. Por otro lado, sus estrategias similares pueden ser simplemente el resultado de evolución ecológica convergente, en cuyo caso, los rasgos morfológicos producto del hábito depredador serían homoplásicos.

Futuros estudios del Género *Toxorhynchites* deben incluir una mayor cantidad de especies, y un mayor número de representantes de otros Géneros dentro Culicidae. Esto resultaría en análisis filogenéticos robustos y proporcionaría un entendimiento más comprensivo de las relaciones evolutivas entre los miembros de *Toxorhynchites* y el resto de la Familia Culicidae. Los estudios deben integrar técnicas morfológicas y moleculares que se respalden. Para esto, es crítico asegurar la identificación correcta de un espécimen antes de publicar una secuencia de este en repositorios. Una secuencia subida a un repositorio bajo una identificación errónea solo desvirtuaría la taxonomía que se intenta mejorar y perjudicaría estudios que intenten utilizarla. Finalmente, futuras investigaciones deben incluir especies representantes de las distintas regiones geográficas donde los miembros de *Toxorhynchites* ocurren; y así producir análisis representativos de la diversidad del grupo a escala mundial. Incluir especímenes de distintas regiones puede proveer conocimiento sobre

potenciales patrones que nos permitan inferir sobre su origen e historia evolutiva. De no tomar esto en cuenta, nuestros análisis pueden pasar por alto relaciones evolutivas importantes.

ESPECIES NEOTROPICALES DE *TOXORHYNCHITES* PRESENTES EN PANAMÁ

A la fecha actual, no existe en Panamá un registro exhaustivo y definitivo, soportado con evidencia molecular, de las especies de *Toxorhynchites* que ocurren en el país. Durante la realización del proyecto “Mosquitoes of Middle America: Panama, including Canal Zone”, se colectaron muestras de *Toxorhynchites* en más de 22 localidades del país. Las muestras de *Toxorhynchites* incluyeron más de 50 especímenes colectados en estado larval y fueron colectados de agua estancada en recipientes artificiales, huecos en árboles, bromelias y heliconias (Heinemann & Belkin, 1978). Tres especies de *Toxorhynchites* fueron identificadas morfológicamente durante este proyecto: *Toxorhynchites moctezuma*, *Toxorhynchites hypoptes*, y *Toxorhynchites haemorroidalis superbus*; sin embargo, muchas muestras no pudieron ser identificadas a nivel de especie (Heinemann & Belkin, 1978). Este ha sido hasta ahora, el mayor esfuerzo de colecta e identificación de especies de *Toxorhynchites* que se ha realizado en Panamá. Esfuerzos como estos que además cuenten con el soporte de técnicas moleculares, serán clave en resolver las interrogantes de taxonomía del Género *Toxorhynchites* en Panamá y la region Neotropical.

De estos esfuerzos se conoce que al menos dos especies, *Toxorhynchites hypoptes* y *Toxorhynchites moctezuma*, son ambos comunes en Panamá y Centroamérica; con el primero reportado desde Ecuador hasta Honduras y el segundo desde Venezuela hasta México e incluso también en el sur de los Estados Unidos (Heinemann & Belkin, 1978; Zavortink & Chaverri, 2009). Zavortink y Chaverri (2009), lograron identificar y separar *Toxorhynchites hypoptes* y *Toxorhynchites moctezuma* con descripciones de Dyar (1928) y Knab (1907). Estas descripciones junto a los registros de Heinemann & Belkin (1978) pueden ser útiles para identificar y comenzar un registro apoyado por testigos

morfológicos y/o moleculares de *Toxorhynchites* en Panamá, que además permita entender la distribución geográfica de las especies del grupo en la parte sur de la región Mesoamericana.

En Panamá, para aclarar, la taxonomía del Género *Toxorhynchites* no solo hace falta incluir técnicas moleculares, sino además, trabajar y entender la distribución geográfica y los rasgos ecológicos de las especies presentes en el país. Entender en donde cada especie está presente y que factores geográficos o ecológicos, entre otros; las separan, puede aportar a una taxonomía más clara; como demostrado por (Zavortink & Chaverri, 2009). Actualmente no hay trabajos dedicados a entender patrones de distribución geográfica de *Toxorhynchites* en Panamá. Anteriormente, se han demostrado patrones de separación geográfica en otros miembros de Culicidae en Panamá. Un estudio por (Loaiza et al., 2013) busco aclarar la taxonomía de la especie críptica *Anopheles punctimacula* en Panamá y partes de Costa Rica; utilizando secuencias de las regiones 3'COI, 5'COI y ITS2. Loaiza et al. (2013), identificaron las muestras morfológicamente y entre ellas encontraron *Anopheles punctimacula* y *Anopheles malefactor*. Los resultados de sus análisis moleculares soportan varios linajes, para los mosquitos identificados morfológicamente como *Anopheles punctimacula*; aislados genética y geográficamente en Panamá (Loaiza et al., 2013). Trabajos como este, pero dedicados al género *Toxorhynchites* en Panamá, son necesarios para aclarar los patrones en la distribución de las especies del Género en el país, y las condiciones que las separan. Trabajos como este son importantes para elucidar la identidad taxonómica de especies crípticas. En el caso del Género *Toxorhynchites*, entender que patrones de distribución puede ser útil, no solo para obtener una taxonomía más robusta; sino también para entender que especies tienen mayor potencial para el control de mosquitos vectores.

METODOLOGÍA

MUESTREO DE MOSQUITOS *TOXORHYNCHITES*

Para la colecta de material biológico se realizaron 22 giras de campo y se visitaron específicamente 12 localidades distribuidas en 8 de las 10 provincias de Panamá (Figura 1). En cada localidad se colocaron ovitrampas para capturar larvas de mosquitos del Género *Toxorhynchites*. El uso de recipientes artificiales de color negro u ovitrampas como método para la captura de mosquitos es una práctica estándar, y ha demostrado ser efectiva para capturar miembros del Género *Toxorhynchites* (Hoel et al., 2011; Yap & Foo, 1984). Las primeras giras fueron realizadas con el objetivo de hacer reconocimiento de los sitios potenciales de muestreos y probar diversos tipos de ovitrampas como métodos de colecta. Estas ovitrampas consistían en envases de plástico negro de 16 onzas, cubetas de plástico negro de 5 litros, cubetas de plástico negro de 5 galones, y/o llantas de autos en desuso (aproximadamente 2.5 galones de agua por llanta). Adicionalmente, también se revisaron reservorios naturales de agua o fitotelmata como huecos de árboles, plantas epífitas (bromelias y heliconias) y charcas de agua empozada, en búsqueda de larvas de *Toxorhynchites*. Las muestras obtenidas durante la colecta fueron identificadas a nivel de Género u especie con claves taxonómicas basadas en caracteres morfológicos y luego corroboradas molecularmente por medio de la técnica de códigos de barra de ADN o “Barcoding”.

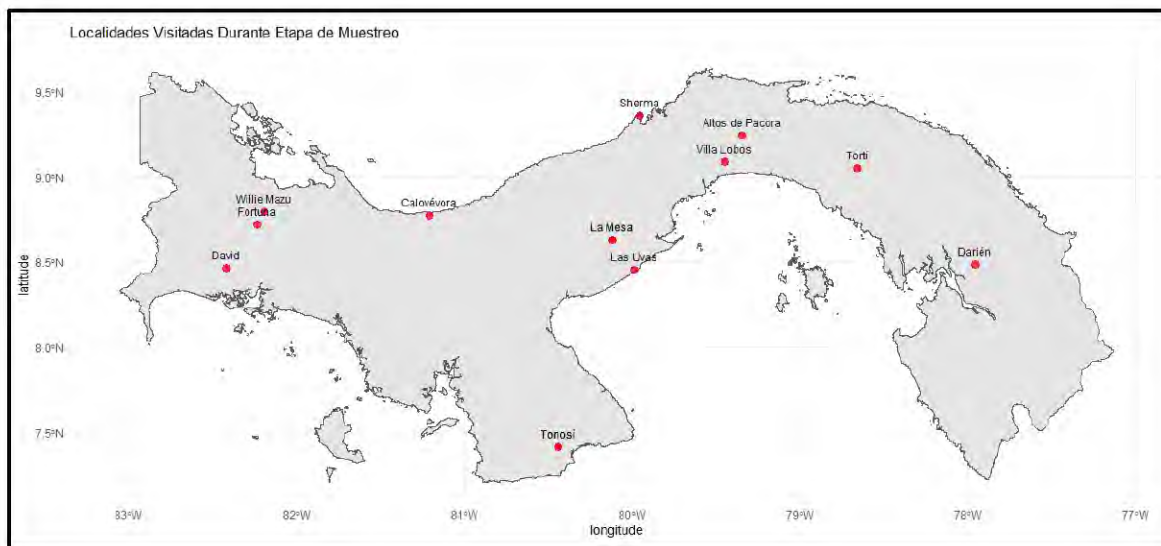


Figura 1. Mapa con las localidades de muestreo visitadas durante este estudio: Altos del Pacora (Panamá), Calovébora (“Peje Prieto” Veraguas), David (Chiriquí), (Darién), Fortuna (Chiriquí), La Mesa, El Valle de Antón (Coclé), Las Uvas (Coclé), Sherman (Colón), Tonosí (Los santos), Torti (Panamá), Villa Lobos (Panamá), Willie Mazú (Bocas del Toro).

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE *TOXORHYNCHITES*

Para fotografiar las muestras se utilizó un estereoscopio LEICA M205 A con cámara LEICA DMC 2900. Las muestras obtenidas durante la colecta fueron identificadas a nivel de Género y especie con claves taxonómicas y descripciones basadas en caracteres morfológicos de la larva de cuarto estadio y los adultos (Dyar, 1928; Zavortink & Chaverri, 2009).

EXTRACCIÓN DE ADN, AMPLIFICACIÓN, Y SECUENCIACIÓN DEL GEN MITOCONDRIAL CITOCROMO OXIDASA SUBUNIDAD UNO (COI)

El ADN de mosquitos del Género *Toxorhynchites* capturados en Panamá fue extraído en etapa de adulto siguiendo el protocolo detallado en el kit comercial de extracción NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel). El ADN extraído fue almacenado en un congelador a - 20° C. La amplificación de los códigos de barras de ADN fue realizada mediante la reacción en cadena de la polimerasa o PCR para la región Folmer del gen COI, utilizando los cebadores o primers 1490F y 2189R, que amplifican 620 pares de base de la parte inicial de este gen. Los productos de la PCR fueron corridos en un gel de agarosa regular con Buffer de 1XTBE, a cien voltios por 45 minutos. Se utilizó un marcador o escalera de peso molecular de 100 pares de bases. Una vez amplificadas, las muestras fueron enviadas a secuenciar (Macrogen, Inc.) para la genotipificación con el método de secuenciación Sanger. El método Sanger (Sanger et al., 1977) es conocido por su precisión y consistencia y funciona utilizando fluorescencia para marcar los nucleótidos en fragmentos de ADN, que luego son cargados en un sistema de gel capilar de electroforesis (Sanger et al., 1977). La fluorescencia permite leer los nucleótidos mientras estos pasan por los capilares del gel de electroforesis, ya que cada marcador fluorescente emite una longitud de onda distinta (Sanger et al., 1977).

SECUENCIAS DEL GEN COI MINADAS DE GENBANK Y BOLD SYSTEMS

Miembros de varios Géneros dentro de la familia Culicidae fueron utilizados para los análisis filogenéticos, de manera que se incluyeron grupos con estrategias ecológicas similares y distintas a las estrategias ecológicas de *Toxorhynchites*, entre las larvas predatorias y los adultos que no se alimentan de sangre de animales vertebrados. Adicionalmente, se incluyeron especies de Culicidae representantes de distintas áreas geográficas del mundo, incluyendo otros miembros del Género

Toxorhynchites. Las especies con potencial para el análisis compartían y/o diferían en múltiples aspectos con la biología de *Toxorhynchites* (Figura 2); como, por ejemplo, el tipo de alimentación en estado de larval y adulto (Donald et al., 2020; Hancock et al., 2022; Karna et al., 2018; Maquart et al., 2021; Sherratt & Church, 1994; Surendran et al., 2013). Las secuencias del ADN utilizadas para estos análisis incluirán muestras de Panamá, que fueron analizadas junto con las secuencias obtenidas de GenBank ([GenBank Overview \(nih.gov\)](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)) y BOLD Systems ([Bold Systems v4](https://www.boldsystems.org/)). Para la selección de las secuencias de ADN provenientes de ambos repositorios mundiales, utilizamos una rubrica de inclusión y exclusión con el objetivo de darle objetividad, calidad, y reducir el sesgo producido por identificaciones taxonómicas erróneas o pobre calidad de las secuencias. La rúbrica fue construida en base a una serie de criterios predeterminados de inclusión y exclusión (Tabla 2).

Tabla 2. Criterios de selección (exclusión e inclusión) para las secuencias del gen mitocondrial COI de las bases de datos globales.

Criterio de Inclusión	Criterios de Exclusión
Secuencias de la región Folmer del gen COI	Secuencias de otra región distinta a la región Folmer del gen COI
Secuencias únicas de GeneBank o BOLD Systems	Secuencias duplicadas de GenBank o BOLD Systems o de otros repositorios
Secuencias consenso en dos direcciones con cebadores o primers forward y reverse	Secuencias en una sola dirección
Secuencias con 600 pares de bases o más	Secuencias con menos de 600 pares de bases
Secuencias sin codones de parada	Secuencias con codones de parada
Secuencias publicadas en revistas indexadas	Secuencias que no han sido publicadas en revistas indexadas
Meta-data de la muestra completa	Meta-data de la muestra incompleta
La identificación de los especímenes fue realizada por un taxónomo de Culicidae	La identificación de los especímenes fue realizada no fue realizada por un taxónomo de Culicidae

ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Las secuencias del gen COI obtenidas de las muestras de *Toxorhynchites* colectadas e identificadas morfológicamente en Panamá fueron editadas utilizando el programa Geneious ([Geneious | Bioinformatics Software for Sequence Data Analysis](#)) y alineadas con el paquete computacional MEGA (<https://www.megasoftware.net/>). Una vez alineadas, estas secuencias fueron utilizadas para generar un árbol filogenético exclusivamente con las muestras colectadas en Panamá. Se utilizó el método estadístico “Neighbor-Joining” y el modelo de evolución molecular Tamura-Nei, con una prueba de Bootstrap de mil repeticiones, para obtener grupos naturales o clusters filogenéticos que fueron identificados con criterios de distancias genéticas y un umbral de separación de 2% de divergencia genética entre grupos emparentados filogenéticamente. Además, verificamos si los especímenes que componían estos cluster correspondían a una misma especie identificada con caracteres morfológicos de la larva o el adulto. Se utilizó el programa estadístico R, con el paquete “ggplot2”, para generar mapas que relacionaban los Clados de *Toxorhynchites* de la topología generada en MEGA, y las posiciones geográficas donde estos fueron colectados en Panamá.

Por otro lado, las secuencias del gen COI obtenidas de las muestras de *Toxorhynchites* colectadas e identificadas morfológicamente en Panamá, fueron alineadas con otras secuencias del mismo gen de especies de *Toxorhynchites* reportadas en GenBank ([GenBank Overview \(nih.gov\)](#)) y BOLD Systems ([Bold Systems v4](#)) utilizando los algoritmos de alineamiento MUSCLE y Clustal del programa MEGA (<https://www.megasoftware.net/>). Luego, para elucidar las relaciones filogenéticas entre las especies del Género *Toxorhynchites* de Panamá, GenBank y/o BOLD, generamos otro árbol filogenético usando el método estadístico “Maximum Likelihood” y modelo de evolución molecular Tamura-Nei, con una de filogenia Bootstrap estándar de mil repeticiones. Finalmente, confirmamos molecularmente la identidad taxonómica de las especies de *Toxorhynchites* presentes en Panamá. Esto se logró por medio de la delimitación de la posición de

estos taxa en la topología generada con las secuencias extraídas de las bases de datos mundiales. Basándonos en el árbol filogenético generado, se utilizó el mismo procedimiento para generar un árbol reducido a tres secuencias por subclado (cuando los subclados incluían más de tres secuencias), consistente en sus resultados con el árbol original. Este árbol reducido representó nuestra topología global para *Toxorhynchites* en este documento.

Para investigar la posición del Género *Toxorhynchites* dentro de la topología de Culicidae, seguimos el mismo procedimiento, pero con la inclusión de hasta cinco secuencias por otros Géneros de Culicidae. La posición filogenética de *Toxorhynchites* fue inferida en base a la divergencia entre el clado de *Toxorhynchites* colectados en Panamá con los otros clados de dentro de Culicidae, o en la cercanía o lejanía entre estos.

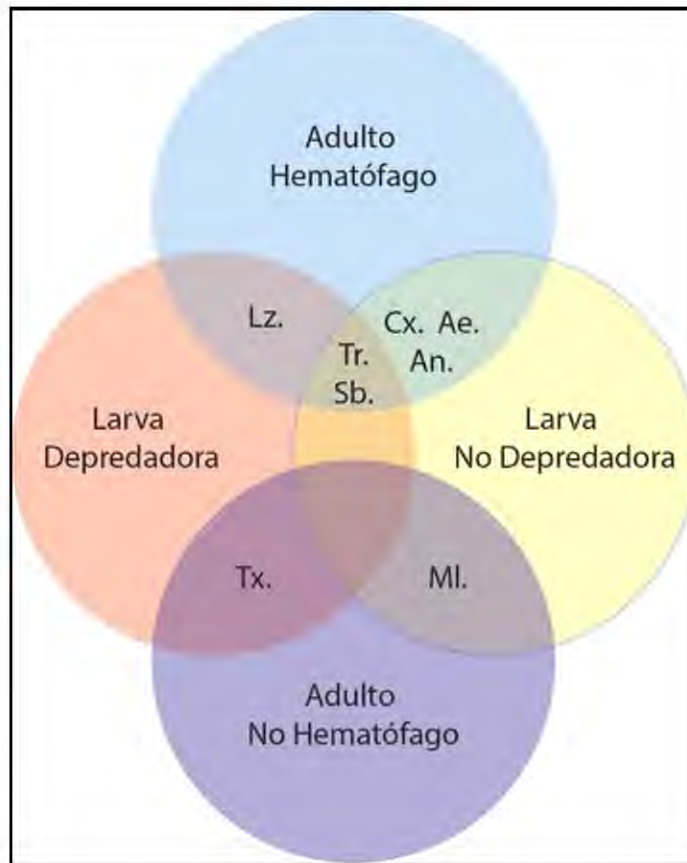


Figura 2. Diagrama de Venn mostrando Géneros de mosquitos clasificados en larvas predadoras, larvas no predadoras, adultos hematófagos, adultos no hematófagos.; donde Tx.: *Toxorhynchites*, Lz.: *Lutzia*, Tr.: *Trichoprosopon*, Sb.: *Sabethes*, ML.: *Malaya*, Ae.: *Aedes*, Cx.: *Culex*, An.: *Anopheles*.

RESULTADOS

IDENTIDAD TAXONÓMICA DE LAS ESPECIES DE *TOXORHYNCHITES* PRESENTES EN PANAMÁ

Se capturaron 147 especímenes de *Toxorhynchites* en 10 de los 12 sitios visitados durante el muestreo; siendo Willie Mazu, Darien, David, Torti, La Mesa del Valle de Antón, Villa Lobos, Tonosi, Sherman, Fortuna y Peje Prieto los sitios donde se consiguieron muestras, mientras que en Las Uvas y Altos del Pacora no se capturaron especímenes. De los 147 especímenes capturados, se obtuvieron 98 secuencias del gen COI, provenientes de las 10 localidades del país, donde se habían colectado muestras de *Toxorhynchites* (Figura 3). La Tabla 3 contiene un resumen de los resultados de muestreo y de la secuenciación del gen COI. Además, la Tabla 3 incluye también los códigos de cada localidad de Panamá donde se obtuvieron las muestras de *Toxorhynchites* (Tabla 3).

Nuestro análisis filogenético, para las secuencias de Panamá, generaron una topología que revela la existencia de 4 Clados o clústeres principales nombrados como clados A, B, C y D (Figura 4). Los especímenes de estos clados poseen caracteres morfológicos y moleculares constantes, que los separan claramente entre ellos. El clado A fue identificado como *Toxorhynchites moctezuma* (Figura 5). Los mosquitos del clado B (*Toxorhynchites sp. B*), fueron capturados exclusivamente en Fortuna (Chiriquí), pero no pudieron ser identificados a nivel de especie (Figura 6). Los mosquitos del clado C fueron identificados como *Toxorhynchites hypoptes* (Figura 7), mientras que los mosquitos del Clado D fueron identificados como *Toxorhynchites haemorrhoidalis superbus* (Figura 8). Cada Clado de la topología en el árbol filogenético de *Toxorhynchites* de Panamá (Figura 4) esta demarcado por un color y un símbolo geométrico que coincide perfectamente con los mismos colores y figuras del mapa (Figura 3). Las muestras dentro de estos Clados o clústeres tienen un

grado considerable de similitud genética y demuestran también cierto grado de aislamiento geográfico, y divergencia ecológica entre ellas en Panamá. Solo hubo una instancia en la que una muestra (PLSTO002) no demostró aislamiento geográfico y ecológico (Ver detalles en sección “Clado C”).

Tabla 3. Tabla de resultados del muestreo de los mosquitos del Género *Toxorhynchites* en Panamá.

Lugar	Código	Muestras Obtenidas	Secuencias COI	Especies de <i>Toxorhynchites</i>
Willie Mazu (Bocas del Toro)	P-BC-WM	6	5	<i>Tx. hypotes</i>
Darién	P-D-Dn	1	1	<i>Tx. moctezuma</i>
David (Chiriquí)	P-CH-D	17	15	<i>Tx. moctezuma</i>
Tortí (Panamá)	P-P-T	16	11	<i>Tx. hypotes</i>
La Mesa del valle de Antón (Coclé)	P-CE-LM	10	8	<i>Tx. moctezuma</i>
	P-CE-LMBR	7	4	<i>Tx. haemorrhoidalis superbus</i>
Villa Lobos (Panamá)	P-P-VL	22	15	<i>Tx. moctezuma</i>
Tonosí (Los Santos)	P-LS-TO	39	13	(x12) <i>Tx. moctezuma</i> * (x1) <i>Tx. hypoptes</i> *
Sherman (Colón)	P-C-S	13	13	<i>Tx. hypotes</i>
Fortuna (Chiriquí)	P-CH-F	11	8	<i>Tx. sp. B</i>
Peje Prieto (Veraguas)	P-PP-V	5	5	<i>Tx. hypotes</i>
Totales		147	98	

* Para Tonosí se obtuvieron 13 secuencias: 12 de *Toxorhynchites moctezuma* y 1 de *Toxorhynchites hypoptes*.

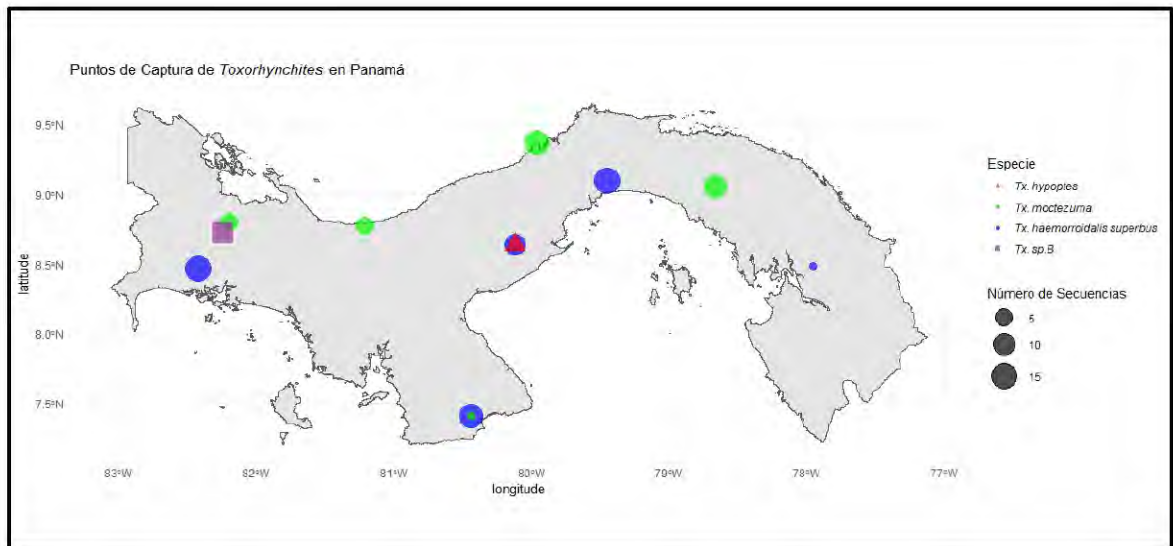


Figura 3. Mapa de Panamá demarcando los sitios de colecta de los especímenes de *Toxorhynchites* que fueron secuenciados para el gen COI, y coloreados en base al Clado al que corresponden según los análisis filogenéticos: Clado A: Azul (*Tx. moctezuma*); Clado B: Morado (*Tx. sp. B*); Clado C: Verde (*Tx. hypoptes*); Clado D: Rojo (*Tx. haemorrhoidalis superbus*).

Clado A

Los miembros del Clado A tienen una diferencia genética mayor al 3% en relación con los miembros del Clado B, y mayor al 5% con los miembros del Clado C. Los especímenes del Clado A fueron capturados con ovitrampas, y con envases de plástico o caucho, entre ellos llantas usadas de auto. El Clado A fue identificado morfológicamente como *Toxorhynchites moctezuma*. Los mosquitos de este clúster tienen el cuarto tarsómero de sus patas posteriores recubiertos de escamas blancas, tanto en las hembras como en los machos. Las escamas del quinto tarsómero son oscuras (Figura 5). Los resultados del análisis filogenético sitúan a las secuencias del Clado A cercanas a otras secuencias de *Toxorhynchites moctezuma* de México; con una divergencia genética que supera levemente el 2% (Figura 9). El Clado de secuencias de *Toxorhynchites moctezuma* de México, también incluye otras secuencias de mosquitos de México identificados como *Toxorhynchites theobaldi* y *Toxorhynchites rutilus*. El Clado A tiene alto soporte estadístico o Bootstrap (97%), tanto en nuestra topología con *Toxorhynchites* de Panamá solamente (Figura 4), como también en nuestra filogenia global con *Toxorhynchites* de varios países (Figura 9).

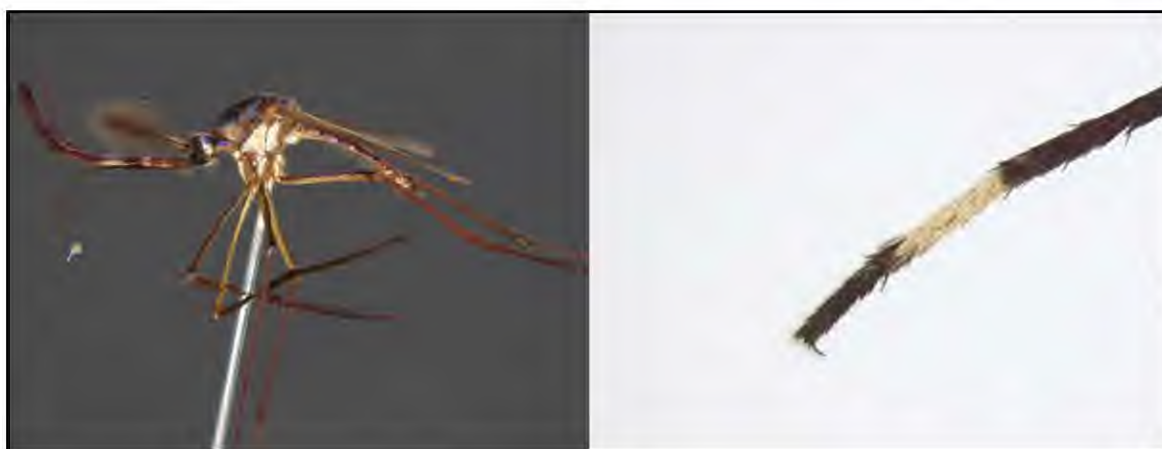


Figure 5. Características morfológicas del adulto de la especie *Toxorhynchites moctezuma*.

Clado B

El Clado B está compuesto exclusivamente por secuencias de mosquitos obtenidas en la localidad de Fortuna, en la Provincia de Chiriquí, a unos 1,220 metros de altura sobre el nivel del mar. Los miembros de este Clado fueron capturados en ovitrampas y su ubicación en el árbol filogenético es cercana a aquella de los miembros del Clado de *Toxorhynchites moctezuma* de México, presentando una divergencia genética mayor del 2%. En nuestra topología global de *Toxorhynchites*, las secuencias del Clado B, no se alinearon con ninguna secuencia minada de GeneBank o BOLD System (Figura 9). Es decir que, aunque no podemos confirmar molecularmente la identidad taxonómica de esta especie, si hemos obtenido suficiente soporte estadístico para separarla como unidad evolutiva independiente (Figura 8). El Clado B posee un elevado soporte estadístico, tanto en la topología del árbol filogenético con muestras de *Toxorhynchites* exclusivas de Panamá (Figura 4), así como también en la topología del árbol filogenético global de *Toxorhynchites* (Figura 9). El Clado B presenta caracteres morfológicos en los tarsos de las patas posteriores y medias y en el mesonoto, que son similares a los que reportó Dyar (1928) para *Toxorhynchites septentrionalis*. No obstante, no pudimos determinar la especie morfológicamente debido a falta de especímenes de ambos sexos, lo cual es necesario para utilizar la clave de este investigador (Dyar, 1928) (Figura 6).



Figura 6. Características morfológicas del adulto de la especie *Toxorhynchites* del Clado B.

Clado C

El Clado C tiene una diferencia genética mayor de 3% con respecto al Clado A y mayor de 5% con respecto a los Clados B y D. Los especímenes del Clado C fueron capturados en ovitrampas, así como también en llantas usadas de auto y envases plástico. El Clado C fue identificado morfológicamente como *Toxorhynchites hypoptes* y los mosquitos tienen escamas blancas en los segmentos cuatro y quinto de sus tarsos posteriores (Figura 7). En el caso de los machos, las escamas blancas se encuentran en la superficie externa del tarso (Figura 7 A), mientras que las hembras las presenta en ambas caras del tarso (Figura 7 B). Los *Toxorhynchites* del Clado C comparten similitudes con una secuencia de *Toxorhynchites hypoptes* presente en nuestra topología de *Toxorhynchites* global (Figura 8). Nuestra filogenia de *Toxorhynchites* de Panamá demuestra alto soporte para el Clado C (Figura 4).

Uno de los especímenes dentro del Clado C (PLSTO002) presentó diferencia en ciertos caracteres morfológicos, como el patrón de escamas en los tarsos traseros, distintos a los del resto de los

miembros de este Clado. Esta secuencia tiene una distancia genética menor al 1% con el resto de las secuencias del Clado C, y formó constantemente un Clado junto a la secuencia PVPP005 (Bootstrap: 98) con la cual no presentó diferencia genética. La muestra PVPP005 no presenta diferencias en los caracteres morfológicos con el resto de los miembros de Clado C. La muestra PLSTO002 no pudo ser identificada morfológicamente por falta de especímenes de ambos sexos (Dyar, 1928), y molecularmente no puede ser considerada una especie distinta al resto del Clado. Es importante mencionar que la muestra PLSTO002 es la única instancia en que una muestra no presentó aislamiento geográfico y ecológico; ya que esta fue la única muestra del Clado C, capturada en la misma localidad que muestras del Clado A; y en el mismo tipo de ecosistema larval (ovitrampa: llanta de auto). La muestra PLSTO002 no comparte los mismos caracteres morfológicos que definen al Clado A como *Toxorhynchites moctezuma*.



Figure 7. Características morfológicas del macho (a) y hembra (b) de la especie *Toxorhynchites hypoptes*.

Clado D

El Clado D tiene una diferencia genética mayor al 5% en relación con los clados A, B y C. Los *Toxorhynchites* miembros del Clado D fueron todos capturados exclusivamente en bromelias e identificados morfológicamente como *Toxorhynchites haemorroidalis superbus* (Figura 8). Esto debido a los penachos rojos distintivos en los últimos segmentos abdominal. Nuestras secuencias del gen COI correspondientes al Clado D alinearon con otras secuencias de *Toxorhynchites*

haemorroidalis provenientes de Trinidad y Tobago, con una distancia genética menor al 1%. Sin embargo, otras secuencias minadas, identificadas como parte de la misma especie, presentan una divergencia genética mayor, lo que sugiere una subestimación de un posible complejo de especies crípticas. El Clado D tiene elevado soporte estadístico tanto en nuestra topología con secuencias de *Toxorhynchites* de Panamá (Figura 4), así como también en la topología global de *Toxorhynchites* con secuencias de Genbank y BOLD system provenientes de 10 países (Figura 9).



Figura 8. Características morfológicas del adulto de *Toxorhynchites* del Clado C, que corresponde posiblemente a la especie: *Toxorhynchites haemorroidalis superbus*.

RELACIONES FILOGENÉTICAS DENTRO DEL GÉNERO *TOXORHYNCHITES*

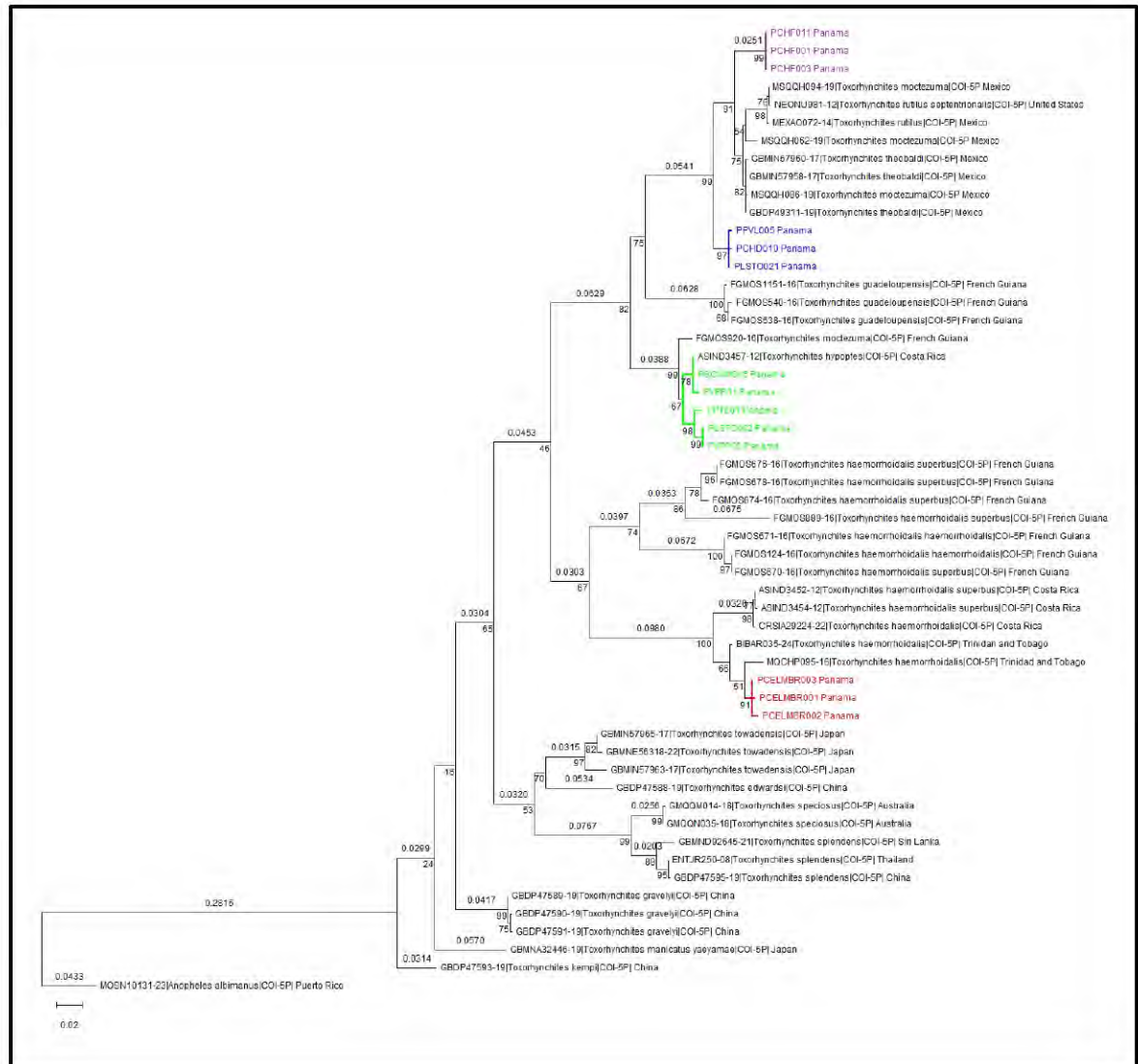


Figura 9. Árbol filogenético global del Género *Toxorhynchites* construido con el método Maximum Likelihood, utilizando secuencias del gen COI de individuos colectados en Panamá y otras secuencias minadas de BOLD y GenBank. Los Clados de Panamá (**Figura 4**) se representan de la siguiente manera: **Clado A:** Azul, **Clado B:** Morado, **Clado C:** Verde, **Clado D:** Rojo.

Los clados del árbol filogenético construido exclusivamente con nuestras y secuencias de *Toxorhynchites* de Panamá (Figura 4) se mantuvieron ocupando posiciones similares una vez se construyó la topología global que además contenía las secuencias minadas de otras especies de este género de mosquitos (Figura 9). La topología muestra que las secuencias del gen COI obtenidas en Panamá están estrechamente agrupadas en subclados específicos, lo cual indica que estas muestras tienen una homología molecular considerable. Las secuencias dentro de los subclados de Panamá demuestran mayor homología molecular entre ellas, que con respecto a las secuencias minadas de sus conespecíficos, posiblemente como resultado de la separación geográfica entre las poblaciones.

Las relaciones filogenéticas en la Figura 9 destacan patrones geográficos claros, con muestras de *Toxorhynchites* de las Américas formando clados distintos, lo que sugiere diversificación regional. En contraste, las especies de Asia y Oceanía se agrupan por separado, lo que indica barreras geográficas y divergencia evolutiva alopátrica. Las secuencias del nuevo mundo, agrupadas en subclados con divergencia genética menor al 2% mantienen en su mayoría valores de bootstrap elevados (Figura 9).

Las secuencias de *Toxorhynchites moctezuma*, *Toxorhynchites rutilus*, y *Toxorhynchites theobaldi* se agruparon en un solo clado con menos de 2% de divergencia, lo que sugiere una sobreestimación de especies o identificaciones erróneas de estos especímenes. Algunas de las secuencias en este clado presentan una divergencia genética menor al 2% con relación a las secuencias de Panamá; mientras que aquellas que poseen mayor distancia genética, apenas superan el 2%.

Las secuencias de *Toxorhynchites haemorrhoidalis* se agruparon en un solo clado, que a su vez se separaron en subclados; uno de estos siendo el Clado D de Panamá, en color rojo. La distancia genética entre estos sugiere por lo menos la existencia de cinco especies distintas (Figura 9). Los resultados sugieren una taxonomía inconsistente y subestimación de especies en este grupo. Las

secuencias de los subclados fueron identificadas como *Toxorhynchites haemorrhoidalis*, *Toxorhynchites haemorrhoidalis haemorrhoidalis* y *Toxorhynchites haemorrhoidalis superbus*. En algunos casos, dos de estos nombres aparecen juntos en un solo clado. Además, el nombre *Toxorhynchites haemorrhoidalis superbus* ocurre en varios subclados separados por distancias genéticas superiores al 2% o indicativas de posibles eventos de especiación.

Las secuencias del viejo mundo utilizadas en el árbol filogenético global de *Toxorhynchites* (Figura 9), incluían varias muestras asiáticas y dos de Australia. Nuestra filogenia coloca estos grupos como ancestrales o basales a los grupos del nuevo mundo. Los grupos del viejo mundo demuestran una taxonomía más consistente; con las secuencias identificadas como una misma especie agrupándose en subclados específicos. La distancia genética entre los grupos también indica los posibles eventos de especiación entre ellos. Los subclados de especies del viejo mundo, con más de una secuencia, mantienen valores Bootstrap arriba de 85%, demostrando consistencia en la agrupación de secuencias de la misma especie.

POSICIÓN FILOGENÉTICA DE *TOXORHYNCHITES* DENTRO DE LA FAMILIA CULICIDAE

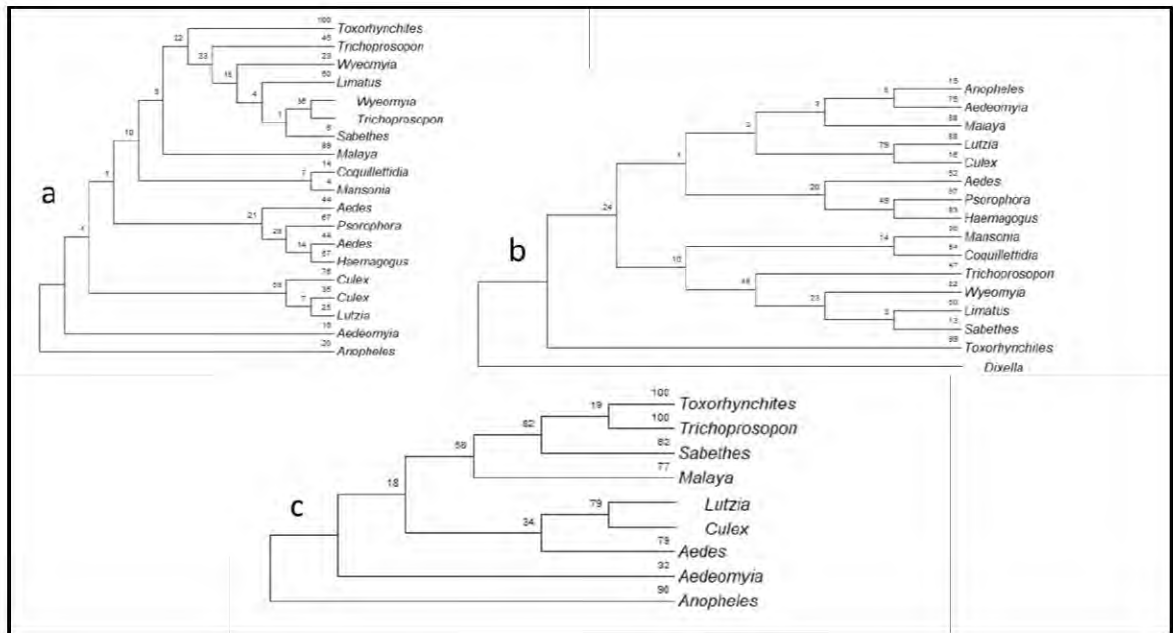


Figura 10. Árboles filogenéticos con clados por Género reducidos, construidos con el método Maximum Likelihood; utilizando secuencias de *Toxorhynchites* colectados en Panamá y secuencias minadas de *Toxorhynchites* y otros miembros de Culicidae. Las topologías a y c utilizan a *Anopheles* como grupo enraizado (o outgroup) mientras la topología b utiliza *Dixella* (Dixidae) como outgroup.

La Figura 10, consiste de tres árboles filogenéticos que fueron construidos utilizando las secuencias del gen COI de *Toxorhynchites* comprendidas en los árboles filogenéticos de Panamá (Figura 4) más las secuencias incluidas en la filogenia global de *Toxorhynchites* (Figura 9); junto a varias secuencias por Género, para los otros miembros de Culicidae (Figura 10). Nuestros resultados del análisis filogenético para esclarecer la posición de *Toxorhynchites* dentro de la Familia Culicidae fueron inconsistentes (Figura 10). A pesar de que *Toxorhynchites* se mantuvo como un grupo monofilético de manera constante (Bootstrap: 100 para filogenias A y C; 99 para filogenia B), los

resultados no soportan una posición clara para el Género dentro de Culicidae. Por ejemplo, al incluir a *Dixella* (Dixidae) como outgroup, por su cercanía a Culicidae (Yeates, 2017), los resultados colocan a *Toxorhynchites* fuera de la subfamilia Culicinae y más basal al resto de los Géneros de Culicidae (Figura 10 B). Sin embargo, esta posición, al igual que la del resto de los Géneros en este árbol filogenético tienen soporte estadístico bajo (Bootstrap < 70%). Por otro lado, los resultados obtenidos al utilizar *Anopheles* como outgroup, colocaron a *Toxorhynchites* dentro de la Subfamilia Culicinae y cercano a los miembros de la tribu *Sabethini* (Figura 10 A, C). Sin embargo, la rama del árbol filogenético que contienen estas secuencias tiene bajo apoyo estadístico (Bootstrap: 22 para filogenia A; 19 para filogenia C). Nuevamente, las posiciones del resto de los Géneros de Culicidae, también demostraban bajo soporte.

DISCUSIÓN

El Género *Toxorhynchites* es único entre los Culicidae por ser los únicos mosquitos con ambos: adultos no hematófagos y larvas depredadoras. Estas características los hace aliados contra los mosquitos vectores de enfermedades y organismos increíbles que simplemente despiertan la curiosidad. Por esto, y por su potencial para el control biológico de mosquitos vectores, se ameritan futuros estudios para elucidar más allá la taxonomía, distribución, biología y ecología del grupo.

Nuestro análisis taxonómico – filogenético del Género *Toxorhynchites* representa uno de los esfuerzos más exhaustivos realizados hasta la fecha actual en Latinoamérica. Este estudio es tal vez, el primero de este tipo, enfocado específicamente en este Género de mosquitos. Resaltamos el valor de integrar diferentes técnicas de taxonomía para obtener resultados más robustos, utilizando información de los estudios de algunos de los primeros entomólogos que trabajó el Género *Toxorhynchites*; como Dyar, (1928) y Theobald, (1903), junto con técnicas de taxonomía molecular que nos ayudan a elucidar las relaciones ancestro – descendientes en grupos crípticos como *Toxorhynchites*.

Los resultados de nuestra filogenia de *Toxorhynchites* de Panamá presenta cuatro clados principales bien soportados, indicativos de la existencia de por lo menos cuatro especies en el país. Tres de estas especies pudieron ser identificadas morfológicamente con la clave presentada por Dyar, (1928) y los caracteres detallados por (Zavortink & Chaverri, 2009). Los mosquitos del Clado B de nuestra filogenia de *Toxorhynchites* de Panamá (Figura 4) no pudieron ser identificados con certeza porque solo contábamos con un macho adulto (PCHF010) y la clave dicotómica requiere de machos y hembras de la misma especie para ser utilizada. El resto de los especímenes no llegaron a etapa adulto o no estaban en un estado que permitiese la identificación. En adición a la clave, Dyar, (1928)

presenta descripciones de las especies de *Toxorhynchites* encontradas en América. PCHF010 comparte ciertos caracteres con las descripciones de *Toxorhynchites septentrionalis* de Dyar, (1928); pero esto no fue suficiente para identificar la especie del Clado B, puesto que muchos caracteres tanto de las descripciones como los de la clave pueden ser considerados subjetivos y sesgar la identificación. Los mosquitos del Clado B tampoco pudieron ser identificados molecularmente, puesto que ninguna secuencia se alineó con las secuencias de este clado en nuestra filogenia global de *Toxorhynchites* (Figura 9). Todos los mosquitos de este clado fueron encontrados en la localidad de Fortuna (Chiriquí) a 1,200 m de altura. Un mayor esfuerzo de muestreo en esta zona será necesario para poder identificar la especie. Adicionalmente, un mayor esfuerzo de muestreo en otras zonas de tierras altas de Panamá será necesario para aclarar la distribución de esta especie en el país.

Durante la etapa de identificación morfológica, observamos que los colores iridiscentes de las escamas de *Toxorhynchites* pueden ser engañosos; especialmente en escamas blancas o plateadas, que fácilmente pueden reflejar un tono dorado dependiendo de la posición de la muestra y la luz incidente sobre estas. Las tonalidades turquesas de los mosquitos también pueden ser engañosas y en algunas instancias, la clave sugiere distinciones entre tonos “mayormente verde en vez de azul” y lo contrario también ocurre. Estos caracteres pueden ser considerados subjetivos y resultar en una identificación errónea o sesgada.

Toxorhynchites presenta dimorfismo sexual. El hecho de que la clave de Dyar, (1928) requiere de tener machos y hembras de la misma especie es una carencia de la clave. Esto se complica si estamos intentando identificar más de una especie, ya que, aunque tengamos machos y hembras, no tenemos como saber cuál macho y hembra pertenece a cada especie. De esta manera, la clave trabaja bien en conjunto con técnicas moleculares que respalden las asignaciones iniciales; separando los mosquitos

en clados molecularmente discretos. Una vez cada unidad evolutiva es separada, podemos saber que especímenes hembras y machos deben ser utilizados juntos en la clave. Otro factor que nos ayudó a pasar especímenes por la clave, previo a la secuenciación de su ADN, fue el hecho de que las especies de las muestras de Panamá tienen separación geográfica y ecológica. Aunque al momento de la identificación morfológica inicial no lo sabíamos, esta separación permitió una identificación más efectiva.

El Clado A fue identificado morfológicamente como *Toxorhynchites moctezuma* y molecularmente tiene una distancia genética que apenas supera el 2% con varias secuencias del Clado formado por especímenes de esta misma especie de México. Gran parte de las secuencias en el clado de *Toxorhynchites moctezuma* de México tenían una diferencia genética menor al 2%, con uno de los subclados apenas superando esta métrica. Esto sugiere que probablemente son la misma especie, a pesar de que hay secuencias identificadas como *Toxorhynchites theobaldi* y *Toxorhynchites rutilus*, junto a secuencias de *Toxorhynchites moctezuma*. En el caso de *Toxorhynchites theobaldi*, esto es probablemente el error taxonómico descrito por Zavortink & Chaverri, (2009), en el que muchos especímenes de *Toxorhynchites moctezuma* de Centro América han sido erróneamente identificados como *Toxorhynchites theobaldi*. Algunas secuencias de *Toxorhynchites rutilus* y *Toxorhynchites moctezuma* de este grupo, están en un subclado que apenas supera el 2% de divergencia genética, por lo que pudiese ser un caso de especiación reciente, o simplemente el resultado de aislamiento geográfico. La divergencia genética con las muestras de Panamá también es posiblemente el resultado de aislamiento y distancia geográfica entre las poblaciones. Estos resultados y demuestran una nomenclatura y taxonomía inconsistente para este grupo y sugieren la necesidad de revisión para mejorarla.

Los especímenes del Clado C (Figura 4) fueron identificadas morfológicamente como *Toxorhynchites hypoptes* y se alinearon con la única secuencia de esta especie disponible en GeneBank. Adicionalmente se alinearon con una secuencia identificada como *Toxorhynchites moctezuma* pero nuestros resultados sugieren que esto es un error de identificación.

Nuestras identificaciones morfológicas de *Toxorhynchites moctezuma* y *Toxorhynchites hypoptes* en Panamá, de los clados A y C, respectivamente (Figura 4), concuerdan con los resultados basados en los caracteres morfológicos de estas especies, descritos por Zavortink & Chaverri (2009). Zavortink & Chaverri (2009) mencionan que estas especies son comunes en Centro América, lo que concuerdan con nuestro resultado donde estas fueron las especies más comunes en nuestro muestreo. Los mosquitos de los Clados A y C fueron todos capturados en ovitrampas, pero están separados geográficamente (Figura 3) y ecológicamente. Los mosquitos de los clados A y C nunca fueron capturados en una misma locación durante nuestro muestreo con excepción de la muestra PLSTO002, que alineó consistentemente con los miembros del Clado C, pero fue capturada en Tonosí (Los Santos), donde el resto de las muestras pertenecen al Clado A y fueron identificadas como *Toxorhynchites moctezuma*. Sin embargo, la muestra PLSTO002 es morfológicamente distinta a los mosquitos de ambos Clados (A y C). En resumen, la muestra PLSTO002 es genéticamente la misma especie que el resto de los miembros del Clado C, pero fue la única muestra de este clado en compartir el mismo hábitat con el Clado A, y adicionalmente, es morfológicamente distinto al resto de los miembros de ambos clados; haciéndola un verdadero caso atípico. Nuevamente, por ser un solo espécimen, no teníamos especímenes del sexo opuesto; por lo que no pudo ser identificado.

Nuestras observaciones sugieren una separación ecológica para los mosquitos *Toxorhynchites* de los clados A y C. Los mosquitos del Clado C fueron encontradas en áreas más boscosas y menos

perturbadas; mientras que aquellos del clado A fueron colectados en áreas con un mayor grado de desarrollo antropogénico. Desde una perspectiva de control biológico, esto sugiere que la especie del Clado A, está más adaptada a vivir en poblaciones humanas junto con mosquitos como *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. Esto indica que pudiese ser un candidato para el control biológico de estos vectores de enfermedades. Futuros estudios dedicados a aclarar los patrones de separación ecológica y las variedades entre los ambientes que estas especies habitan serán clave para avanzar en una dirección de control biológico.

Los *Toxorhynchites* del Clado D (Figura 4) fueron identificados morfológicamente como *Toxorhynchites haemorrhoidalis superbus* con la clave de Dyar, (1928); pero con problemas comunes encontrados en claves dicotómicas. Por ejemplo; la falta de muestras de los especímenes de la clave puede dificultar la identificación en casos en que es necesario ver los caracteres de ambas especies para avanzar. Esto es evidente en el caso de *Toxorhynchites superbus* y *Toxorhynchites haemorrhoidalis*, en el que es necesario poder observar el carácter en ambas especies. La clave describe los penachos rojos en el ápice del abdomen de *Toxorhynchites superbus* como “menos desarrollados” que aquellos de *Toxorhynchites haemorrhoidalis*. Por ser un grupo poco trabajado, no hay herramientas, como imágenes, suficientes para determinar esto con certeza. Nuestro análisis filogenético colocó nuestras muestras en un subclado, junto con varios otros subclados de mosquitos identificados como *Toxorhynchites haemorrhoidalis*, *Toxorhynchites haemorrhoidalis haemorrhoidalis*, y *Toxorhynchites haemorrhoidalis superbus* (Figura 9). Los resultados demuestran por lo menos 5 especies distintas en este grupo, y sugieren la necesidad de revisar la taxonomía de este grupo donde la cantidad de especies ha sido potencialmente subestimada.

Los mosquitos del clado D fueron capturados exclusivamente en bromelias en La Mesa del Valle de Antón (Coclé). Es importante mencionar que, por logística, solo tuvimos acceso a muestrear

bromelias en Fortuna (Chiriquí) y La Mesa del valle de Antón; donde las bromelias crecían a alturas accesibles. Sin embargo, es muy probable que esta especie de *Toxorhynchites* ocurre en bromelias en distintas áreas del país, como indican las identificaciones de Heinemann & Belkin, (1978). Para soportar con evidencia molecular los resultados de Heinemann & Belkin, (1978) y mejorar los nuestros, es necesario un muestreo más robusto de bromelias y otras epífitas con reservorios naturales de agua.

Nuestra filogenia global de *Toxorhynchites* (Figura 9) demuestra una clara separación entre las especies del nuevo y viejo mundo. Las relaciones filogenéticas destacan patrones geográficos claros, con muestras de las Américas formando clados distintos, lo que sugiere diversificación regional. Las especies de Asia y Oceanía son agrupadas por separado en nuestra filogenia, lo que concuerda con las barreras geográficas y divergencia evolutiva por la separación de continentes. Las secuencias de *Toxorhynchites* recolectadas en Panamá se mantuvieron agrupadas en subclados estrechamente relacionados en comparación a las secuencias identificadas como conespecíficas con las que se alinearon; lo cual sugiere aislamiento regional de poblaciones y diversificación reciente en la región.

Como fue mencionado anteriormente, nuestra filogenia global de *Toxorhynchites* demuestra la necesidad de un mayor esfuerzo taxonómico dedicado a el Género *Toxorhynchites* en las Américas; debido a las inconsistencias en la nomenclatura de las especies. Esto es evidente en los clados con las especies del grupo que contiene a *Toxorhynchites haemorrhoidalis* y los que contienen a *Toxorhynchites moctezuma*, *Toxorhynchites rutilus* y *Toxorhynchites theobaldi*. Mayores esfuerzos de muestreo en el continente, seguido de esfuerzos de taxonomía integrativa y revisión de los grupos serán claves en resolver la taxonomía de este Género.

Nuestra filogenia (Figura 9) demuestra resultados más claros para las especies del viejo mundo y sugiere una taxonomía más estable en esta región para *Toxorhynchites*. Sin embargo, la diversidad

de secuencias disponibles no es representativa de la diversidad del Género. Nuestro análisis contó con secuencias representativas de solo siete especies del subgénero *Toxorhynchites* del viejo mundo; un subgénero que cuenta con aproximadamente 51 especies (Donald et al., 2020). Para las muestras del nuevo mundo, contábamos con secuencias representativas de por lo menos 9 especies identificadas, aunque nuestros resultados indican una necesidad de revisar la nomenclatura en este grupo. Todas las secuencias del nuevo mundo pertenecen al subgénero *Lynchiella*, de las Américas, el cual incluye aproximadamente 16 especies descritas (Donald et al., 2020). No hay secuencias disponibles para miembros de los subgéneros *Afrorhynchus*, exclusivo del continente africano, y *Ankylorhynchus* de América. La secuenciación de más especies descritas del viejo mundo es necesaria para soportar con evidencia molecular la taxonomía de *Toxorhynchites* y elucidar su origen. Nuestros resultados colocan a las especies asiáticas basales en nuestra filogenia de *Toxorhynchites*, pero para realmente aclarar esto, es necesario contar con una mayor diversidad de secuencias y secuencias del continente africano.

Nuestros resultados con relación a la posición de *Toxorhynchites* dentro de la filogenia de Culicidae fueron inconsistentes. Generamos varias filogenias que mantenían a *Toxorhynchites* como un grupo monofilético bien soportado, pero su posición dentro de Culicidae tenía bajo soporte estadístico. Utilizar *Anopheles* como el outgroup de nuestra filogenia resultó en cladogramas que posicionaban a *Toxorhynchites* dentro de la subfamilia *Culicinae* y cercano a la tribu *Sabethini*. Estos resultados son similares a los de Mitchell et al., (2002) y Lorenz et al., (2021) quienes colocan con mayor soporte a *Toxorhynchites* dentro de la subfamilia *Culicinae* y cerca de la tribu *Sabethini*. Al utilizar una especie del Género *Dixella* (Dixidae), nuestros resultados colocaron a *Toxorhynchites* fuera de la subfamilia *Culicinae* y basal al resto de los grupos de Culicidae; nuevamente con soporte pobre para estas relaciones.

El gen Citocromo Oxidasa Uno (COI) demostró ser una buena herramienta en delimitar especies y elucidar las relaciones filogenéticas entre los mosquitos *Toxorhynchites* de Panamá. La distancia genética entre especies y los altos valores bootstrap en los clados de nuestra filogenia de *Toxorhynchites* de Panamá, respaldan nuestras identificaciones morfológicas. Para mejorar estos resultados es necesario mayor esfuerzo de muestreo, especialmente en bromelias y otras plantas con reservorios de agua a lo largo de Panamá. También es necesario mayor esfuerzo de muestreo en el área de Fortuna (Chiriquí), donde es necesario un mayor número de especímenes adultos y de ambos sexos para poder identificar la especie del Clado B (Figura 4) morfológicamente. Esta especie posiblemente ocurre en otras zonas de tierras altas del país.

El gen COI ha demostrado ser un marcador molecular eficaz para resolver las relaciones filogenéticas dentro del Género *Toxorhynchites*. Las distancias genéticas y los altos valores de bootstrap en la mayoría de los clados de nuestra filogenia global de *Toxorhynchites*, proporcionan una diferenciación confiable entre especies y respaldan las relaciones evolutivas inferidas; pero además demuestran la necesidad de revisar la taxonomía de varios grupos; como lo son las especies del clado de *Toxorhynchites haemorrhoidalis* y el clado con secuencias identificadas como *Toxorhynchites moctezuma*, *Toxorhynchites theobaldi* y *Toxorhynchites rutilus*.

Los resultados inconsistentes de nuestros análisis a nivel de familia, al buscar elucidar la posición de *Toxorhynchites* dentro de Culicidae, sugieren que el gen COI por sí solo no posee la resolución molecular suficiente para lograr este objetivo; es decir, que posiblemente no tiene suficiente información genética para darle a un análisis filogenético lo necesario para abarcar la diversidad genética de Culicidae. Los valores bootstrap bajos en las ramas de nuestras filogenias indican un soporte limitado para las relaciones evolutivas, lo cual sugiere la necesidad de reevaluar los datos de secuencia y los métodos de alineación utilizados. Para reforzar la confianza en las relaciones

evolutivas inferidas, será necesario considerar análisis complementarios utilizando diferentes métodos filogenéticos y posiblemente una mayor cantidad de marcadores moleculares.

CONCLUSIONES

Nuestro estudio de los miembros del Género *Toxorhynchites* de Panamá es el primero dedicado exclusivamente a este Género en el país, y uno de los primeros en integrar técnicas tradicionales de identificación morfológica y molecular. Esto fue crítico para el estudio, puesto que las pocas herramientas de identificación para las especies de Centro América están desactualizadas y presentan complicaciones como la necesidad de utilizar hembras y machos de la misma especie para poder identificarlas.

Este estudio logro identificar la presencia de por lo menos cuatro especies de *Toxorhynchites* en Panamá, de las cuales tres pudieron ser identificadas morfológica y corroboradas molecularmente como unidades evolutivas independientes. Nuestros resultados sugieren la necesidad de revisar la taxonomía y nomenclatura de algunas de estas especies, ya que encontramos inconsistencias entre los clados, bien soportados por nuestro análisis, que formaban estas secuencias; y las identificaciones de los especímenes. En el caso del clado de secuencias de *Toxorhynchites moctezuma*, *Toxorhynchites theobaldi* y *Toxorhynchites rutilus*; la distancia genética entre las secuencias sugiere que pudiese haber sobre estimación del número real de especies y/o identificaciones erróneas. En el caso del clado de *Toxorhynchites haemorrhoidalis*, la distancia genética sugiere la presencia de más especies de lo que la nomenclatura del grupo puede clasificar.

Las muestras de Panamá demuestran separación geográfica y ecológica, lo cual puede tener implicaciones practicas relacionadas al control biológico. La especie identificada como *Toxorhynchites moctezuma* en nuestra filogenia de Panamá (Figura 4, clado A) parece estar más adaptada a ambientes perturbados por los seres humanos. En esta perspectiva, esta especie tiene el mayor potencial para ser estudiada y utilizada en esfuerzos de producción y posteriores estudios de control biológico, o selección artificial que refuerce su adaptación a ambientes perturbados.

El gen COI demostró ser efectivo en delimitar las especies de *Toxorhynchites* de Panamá y en elucidar las relaciones entre las especies dentro del género. Sin embargo, parece no proveer suficiente poder estadístico por su cuenta en análisis que abarcan una diversidad a nivel de familia. Futuros estudios pudiesen mejorar con la inclusión de más marcadores moleculares.

Este estudio proporciona una base sólida para futuras investigaciones sobre la taxonomía y ecología de *Toxorhynchites* en Panamá y otras regiones. Estudiar al Género *Toxorhynchites* por su biología y ecología única entre otros miembros de Culicidae puede aportar al conocimiento sobre ecología evolutiva en general; y para esto es necesario lograr una taxonomía robusta para el grupo. Esta base es necesaria para poder trabajar la ecología de especies individuales y estipular su potencial para el control biológico; lo que nos puede acercar a un manejo de mosquitos vectores más saludable tanto para los seres humanos, como para nuestro ecosistema.

RECOMENDACIONES

1. Este estudio encontró la presencia de 4 grupos de *Toxorhynchites* en Panamá que son unidades evolutivas independientes. Estas demuestran aislamiento en su distribución; sin embargo, es necesario aclarar si este aislamiento es geográfico o ecológico. Para esto será necesario un muestreo sistemático en áreas ecológicamente similares al norte y sur de la cordillera central de Panamá.
2. La especie denominada “*Toxorhynchites sp. B*” en este estudio no está reportada para Panamá. No pudo ser identificada morfológicamente por sus caracteres morfológicos, debido a limitaciones de las herramientas de identificación; y molecularmente no se alineó con ninguna secuencia minada. Un muestreo más intensivo en Fortuna (Chiriquí) será necesario para coleccionar más especímenes de ambos sexos y de esta manera lograr su identificación. Además, será necesario un muestreo en otras tierras altas de Panamá para elucidar si esta ocurre en otras zonas del país.
3. Futuros esfuerzos de muestreo, enfocados en bromelias y otras plantas que almacenen agua naturalmente serán necesarios para aclarar la distribución de “*Toxorhynchites haemorrhoidalis superbis*” en Panamá. Estos esfuerzos no solo ayudarán a elucidar la distribución del grupo, sino también a entender si hay otras especies de *Toxorhynchites* que ovipositan en bromelias.
4. Resaltamos la necesidad de seguir aportando a repositorios de secuencias de ADN, pero con la diligencia y responsabilidad de registrar solo secuencias de especímenes debidamente identificados. Esto será crítico para aclarar la taxonomía de grupos con miembros crípticos, como *Toxorhynchites*.

5. Finalmente, recomendamos revisar la taxonomía y nomenclatura de varios grupos de *Toxorhynchites*. Nuestros hallazgos demuestran inconsistencias en la nomenclatura de varios grupos donde parece ser común la identificación errónea de especies, como es el caso de *Toxorhynchites moctezuma*. En otros grupos parece haber una subestimación de especies, resultado de un enfoque en caracteres morfológicos llamativos, como es el caso de los “*Toxorhynchites haemorrhoidalis*”.

REFERENCIAS

- Abeyasuriya, K. G. T. N., Nugapola, N. W. N. P., Perera, M. D. B., Karunaratne, W. A. I. P., & Karunaratne, S. H. P. P. (2017). Effect of dengue mosquito control insecticide thermal fogging on non-target insects. *International Journal of Tropical Insect Science*, 37(1), 11–18. <https://doi.org/10.1017/S1742758416000254>
- Bennette, J., Millado, H., & Sumalde, A. C. (2018). *Voracity and prey preference of Philippine population of Toxorhynchites splendens Wiedemann (Diptera: Culicidae) among Aedes spp (Diptera: Culicidae) and Culex quinquefasciatus Say (Diptera: Culicidae)*.
- Collins, L. E., & Blackwell, A. (2000). The biology of *Toxorhynchites* mosquitoes and their potential as biocontrol agents. In *Biocontrol News and Information* (Vol. 21, Issue 4).
- Collins, L. E., & Blackwell, A. (2002). Olfactory cues for oviposition behavior in *Toxorhynchites moctezuma* and *Toxorhynchites amboinensis* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 39(1), 121–126. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-39.1.121>
- da Silva, A. F., Machado, L. C., de Paula, M. B., da Silva Pessoa Vieira, C. J., de Moraes Bronzoni, R. V., de Melo Santos, M. A. V., & Wallau, G. L. (2020). Culicidae evolutionary history focusing on the Culicinae subfamily based on mitochondrial phylogenomics. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74883-3>
- Delrieu, M., Martinet, J. P., O'Connor, O., Viennet, E., Menkes, C., Burtet-Sarramegna, V., D. Frentiu, F., & Dupont-Rouzeyrol, M. (2023). Temperature and transmission of chikungunya, dengue, and Zika viruses: A systematic review of experimental studies on *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. In *Current Research in Parasitology and Vector-Borne Diseases* (Vol. 4). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.crpvbd.2023.100139>
- Donald, C. L., Siriyaatien, P., & Kohl, A. (2020). *Toxorhynchites* species: A review of current knowledge. *Insects*, 11(11), 1–17. <https://doi.org/10.3390/insects11110747>
- Dyar, H. G. (1928). *The Mosquitoes of the Americas*.
- Focks, D. A. (2007). *Toxorhynchites* as biocontrol agents. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 23(2 SUPPL.), 118–127. [https://doi.org/10.2987/8756-971x\(2007\)23\[118:taba\]2.0.co;2](https://doi.org/10.2987/8756-971x(2007)23[118:taba]2.0.co;2)
- Focks, D. A., Sackett, S. R., & Bailey, D. L. (1982). Field experiments on the control of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* by *Toxorhynchites rutilus rutilus* (Diptera: Culicidae). In *J. Med. Entomol* (Vol. 19, Issue 3).
- Focks, D. A., Sackett, S. R., Dame, D. A., & Bailey, D. L. (1983). *Toxorhynchites rutilus rutilus* (diptera: culicidae): field studies on dispersal and oviposition in the context of the biocontrol of urban container-breeding mosquitoes. *J. Med. Entomol*, 20(4), 383–390. <http://jme.oxfordjournals.org/>
- Hancock, R. G., Boyd, T., MacFadden, S., Sowders, A., Foster, W. A., & Lounibos, L. P. (2022). Mosquitoes Eating Mosquitoes: How *Toxorhynchites amboinensis*, *Psorophora ciliata*, and

- Sabethes cyaneus* (Diptera: Culicidae) Capture Prey. *Annals of the Entomological Society of America*, 115(6), 461–471. <https://doi.org/10.1093/aesa/saac017>
- Heinemann, S. J., & Belkin, J. N. (1978). Collection Records of the Project “Mosquitoes of Middle America.” *Mosquito Systematics*, 10(2).
- Hoel, D. F., Obenauer, P. J., Clark, M., Smith, R., Hughes, T. H., Larson, R. T., Diclaro, J. W., & Allan, S. A. (2011). Efficacy of ovitrap colors and patterns for attracting *Aedes albopictus* at suburban field sites in North-Central Florida 1. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 27(3), 245–251. <https://doi.org/10.2987/11-6121.1>
- Karna, A. K., Azar, S. R., Plante, J. A., Yun, R., Vasilakis, N., Weaver, S. C., Hansen, I. A., & Hanley, K. A. (2018). Colonized *Sabethes cyaneus*, a sylvatic new world mosquito species, shows a low vector competence for zika virus relative to *aedes aegypti*. *Viruses*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/v10080434>
- Knab, F. (1907). A New Species of Megarhinus. *The Canadian Entomologist*, 50–51.
- Loaiza, J. R., Scott, M. E., Bermingham, E., Sanjur, O. I., Rovira, J. R., Dutari, L. C., Linton, Y. M., Bickersmith, S., & Conn, J. E. (2013). Novel genetic diversity within *Anopheles punctimacula* s.l.: Phylogenetic discrepancy between the Barcode cytochrome c oxidase I (COI) gene and the rDNA second internal transcribed spacer (ITS2). *Acta Tropica*, 128(1), 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.06.012>
- Lorenz, C., Alves, J. M. P., Foster, P. G., Suesdek, L., & Sallum, M. A. M. (2021). Phylogeny and temporal diversification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) with an emphasis on the Neotropical fauna. *Systematic Entomology*, 46(4), 798–811. <https://doi.org/10.1111/syen.12489>
- Malla, R. K., Mandal, K. K., Burman, S., Das, S., Ghosh, A., & Chandra, G. (2023). Numerical analysis of predatory potentiality of *Toxorhynchites splendens* against larval *Aedes albopictus* in laboratory and semi-field conditions. *Scientific Reports*, 13(1), 7403. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-34651-5>
- Maquart, P. O., Fontenille, D., Rahola, N., Yean, S., & Boyer, S. (2021). Checklist of the mosquito fauna (Diptera, Culicidae) of Cambodia. *Parasite*, 28. <https://doi.org/10.1051/parasite/2021056>
- Mitchell, A., Sperling, F. A. H., & Hickey, D. A. (2002). Higher-level phylogeny of mosquitoes (Diptera: Culicidae): mtDNA data support a derived placement for *Toxorhynchites*. <http://www.herbaria.harvard.edu/treebase/>
- Mohamad, N., & Zuharah, W. F. (2014). Influence of container design on predation rate of potential biocontrol agent, *Toxorhynchites splendens* (Diptera: Culicidae) against dengue vector. In *Tropical Biomedicine* (Vol. 31, Issue 1).
- Niemi, G. J., Hershey, A. E., Shannon, L., Hanowski, J. M., Lima, A., Axler, R. P., & Regal, R. R. (1999). Ecological effects of mosquito control on zooplankton, insects, and birds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(3), 549–559. <https://doi.org/10.1002/etc.5620180325>

- Nyamah, M. A., Sulaiman, S., & Omar. (2011). Field observation on the efficacy of *Toxorhynchites splendens* (Wiedemann) as a biocontrol agent against *Aedes albopictus* (Skuse) larvae in a cemetery. In *Tropical Biomedicine* (Vol. 28, Issue 2).
- Reidenbach, K. R., Cook, S., Bertone, M. A., Harbach, R. E., Wiegmann, B. M., & Besansky, N. J. (2009). Phylogenetic analysis and temporal diversification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) based on nuclear genes and morphology. *BMC Evolutionary Biology*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-298>
- Ribeiro, H. (2005). Systematics and Identification of Afrotropical Toxorhynchitinae (Diptera: Culicidae). In *EVOLUTION J. Med. Entomol* (Vol. 42, Issue 6). <https://academic.oup.com/jme/article/42/6/953/886736>
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors (DNA polymerase/nucleotide sequences/bacteriophage 4X174)* (Vol. 74, Issue 12). <https://www.pnas.org>
- Shepard, D. S., Undurraga, E. A., Halasa, Y. A., & Stanaway, J. D. (2016). The global economic burden of dengue: a systematic analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(8), 935–941. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00146-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00146-8)
- Shepard, J. J., Andreadis, T. G., & Vossbrinck, C. R. (2006). Molecular Phylogeny and Evolutionary Relationships Among Mosquitoes (Diptera: Culicidae) from the Northeastern United States Based on Small Subunit Ribosomal DNA (18S rDNA) Sequences. In *EVOLUTION J. Med. Entomol* (Vol. 43, Issue 3). <https://academic.oup.com/jme/article/43/3/443/879051>
- Sherratt, T. N., & Church, S. C. (1994). Ovipositional preferences and larval cannibalism in the Neotropical mosquito *Trichoprosopon digitatum* (Diptera: Culicidae). *Animal Behaviour*, 48(3), 645–652.
- Steffan, W. A., Evenhuis, N. L., & Museum, B. P. B. (1981). Biology of *Toxorhynchites*. www.annualreviews.org
- Steffan, W. A., Stoaks, R. D., & Evenhuis, N. L. (1980). Biological Observations of *Toxorhynchites Amboinensis* (Diptera: Culicidae) in the Laboratory1. *Journal of Medical Entomology*, 17(6), 515–518. <https://doi.org/10.1093/jmedent/17.6.515>
- Surendran, S. N., Jude, P. J., Thavaranjit, A. C., Eswaramohan, T., Vinobaba, M., & Ramasamy, R. (2013). Predatory efficacy of *Culex (Lutzia) fuscans* on mosquito vectors of human diseases in Sri Lanka. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 29(2), 168–170. <https://doi.org/10.2987/12-6321R.1>
- Theobald, F. V. (1903). *A Monograph of the Culicidae or Mosquitoes* (Vol. 3). British Museum (Naturat History),.
- Toohy, M. K., Goettel, M. S., Takagi, M., Ram, R. C., Prakash, G., & Pillai, J. S. (1985). Field studies on the introduction of the mosquito predator *Toxorhynchites amboinensis* (Diptera: Culicidae) into Fiji. *J. Med. Entomol*, 22(1), 102–110.

- Tyagi, B. K., Munirathinam, A., Krishnamoorthy, R., Baskaran, G., Govindarajan, R., Krishnamoorthi, R., Mariappan, T., Dhananjeyan, K. J., & Venkatesh, A. (2015). A revision of genus *Toxorhynchites* Theobald, 1901, in the South-East Asian countries, with description of a new species *Toxorhynchites* (*Toxorhynchites*) darjeelingensis from West Bengal, India (Diptera, Culicidae). *HALTERES*, 6, 13–32.
- Vontas, J., Kioulos, E., Pavlidi, N., Morou, E., della Torre, A., & Ranson, H. (2012). Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 104(2), 126–131. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.05.008>
- Yap, H. H., & Foo, A. E. S. (1984). Laboratory Studies on the Oviposition Site Preference of *Toxorhynchites splendens* (Diptera: Culicidae). In *J. Med. Entomol* (Vol. 21, Issue 2). <http://jme.oxfordjournals.org/>
- Yeates, D. K. (2017). *Phylogeny of Diptera*. <https://www.researchgate.net/publication/322220478>
- Zavortink, T. J., & Chaverri, L. G. (2009). Resurrection of the names *Toxorhynchites moctezuma* (Dyar and Knab) and *Toxorhynchites hypoptes* (Knab) from synonymy with *Toxorhynchites theobaldi* (Dyar and Knab) (Diptera: Culicidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 111(4), 890–897. <https://doi.org/10.4289/0013-8797-111.4.890>
- Zhou, X., Rinker, D. C., Pitts, R. J., Rokas, A., & Zwiebel, L. J. (2014). Divergent and conserved elements comprise the chemoreceptive repertoire of the nonblood-feeding mosquito *Toxorhynchites amboinensis*. *Genome Biology and Evolution*, 6(10), 2883–2896. <https://doi.org/10.1093/gbe/evu231>