



Universidad Nacional del Nordeste
Facultad de Ciencias Exactas, Naturales y
Agrimensura



Licenciatura en Ciencias Biológicas

Trabajo Final de Graduación

*Identificación Molecular de Mosquitos del
Género Sabethes (Diptera: Culicidae)
Colectados en el Nordeste Argentino.*

Autor: Juan Manuel Filipponi

Directora: Dra. Marina Stein

Co-directora: Dra. Griselda Inés Oria

Área de Entomología

Instituto de Medicina Regional

2024

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Facultad de Ciencias Exactas, Naturales y Agrimensura de la Universidad Nacional del Nordeste y a todos los docentes que forman parte de esta institución. A lo largo de mi vida como estudiante, tuve la fortuna de aprender de profesores de gran calidad, cada uno de los cuales dejó su huella en mi formación, contribuyendo a que hoy sea quien soy.

Al Instituto de Medicina Regional (IMR) por brindarme el espacio para realizar la totalidad del TFG.

A Marina por su guía, paciencia y dedicación a lo largo de este trabajo. Su compromiso y conocimiento fueron fundamentales para mi formación, brindándome las herramientas necesarias para desarrollar esta investigación.

A Grise, por haber sido mi puerta de entrada al mundo de los mosquitos y por enseñarme con paciencia a lo largo de estos años. Gracias por incluirme en cada proyecto y por abrirme la mirada a nuevos horizontes, ampliando mi conocimiento y pasión por esta disciplina.

A todos los investigadores del Área de Entomología del IMR: Javi, Jani, Carla, Debo, Aiara, por su amabilidad, buena disposición y compañerismo a lo largo de estos años en el laboratorio. Gracias por cada enseñanza, por el apoyo en los momentos de desafío y por hacer de este espacio un lugar de aprendizaje y crecimiento.

A mi familia, por estar siempre a mi lado y apoyarme en cada paso de este camino. En especial, a mi madre y mi abuela, cuyo amor, sacrificio y esfuerzo hicieron posible que hoy esté aquí. Su incondicionalidad y confianza en mí han sido mi mayor motor.

A mi novia, Melisa, por su amor, paciencia y apoyo incondicional. Gracias por estar a mi lado en cada momento, por alentarme en los días difíciles y celebrar conmigo cada logro.

A los amigos que me dio la facu: Felipe, Gime, Gonzalo, Giuli, Tiago, Cami O., Cami B., Cele, Tiago, Nahuel, Juli, Mechi, Nilson, Yoel, Luciano, y todos aquellos con los que alguna vez compartí algún momento, que hicieron que la cursada sea más divertida, sin duda, me llevo grandes amigos y los mejores recuerdos de cada uno.

ÍNDICE

RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	4
Origen y fundamento de la investigación.....	4
Antecedentes del tema	5
OBJETIVOS GENERALES Y PARTICULARES	7
Objetivo General	7
Objetivos Particulares	8
HIPÓTESIS DEL TRABAJO	8
MATERIALES Y MÉTODOS	8
Material biológico y Características del área de estudio	8
Descripción del trabajo de campo y laboratorio previo, que permitió obtener el material biológico con el que se trabajó en el presente estudio	10
a) Colecta de ejemplares en campo.....	10
b) Cría de inmaduros	11
c) Determinación morfológica de especies del género <i>Sabethes</i>	11
d) Registro fotográfico de mosquitos del género <i>Sabethes</i>	12
e) Análisis molecular de los especímenes	12
f) Secuenciación genómica y edición post secuenciación.....	13
g) Búsqueda de secuencias obtenidas en el NCBI y cálculo de distancias genéticas	13
h) Incorporación de las secuencias obtenidas al GenBank y BOLDSystems	13
RESULTADOS	13
Identificación taxonómica	13
Registro fotográfico	14
Identificación molecular de especies del género <i>Sabethes</i>	14
Incorporación de las secuencias obtenidas al GenBank y BOLDSystems	17
CONCLUSIÓN	19
BIBLIOGRAFÍA	28
MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	37

RESUMEN

Los estudios taxonómicos son la base de las investigaciones vinculadas a problemáticas sanitarias, ya que es indispensable la identificación inequívoca de las especies que podrían actuar como vectores de virus. El género *Sabethes* (Diptera: Culicidae) en Argentina está representado por 13 especies distribuidas en cinco subgéneros, varias de las cuales participan en la transmisión de patógenos que afectan al hombre. Las claves taxonómicas dicotómicas disponibles para las hembras, se basan fundamentalmente en la coloración de escamas y cerdas, pudiendo resultar subjetiva al momento de la identificación de las especies. De allí que herramientas moleculares como la secuenciación del gen Citocromo C Oxidasa Subunidad I (COI), conocido como código de barras de ADN (DNA barcode), contribuya a la identificación inequívoca de las especies. En Argentina, actualmente existen registros de código de barras para 29 especies de mosquitos pertenecientes a ocho géneros, siendo *Sabethes* uno de los menos representados. Este estudio tuvo como objetivos identificar especies del género *Sabethes* del nordeste argentino mediante taxonomía clásica y molecular, complementar el análisis taxonómico con registros fotográficos de los ejemplares y ampliar el listado de especies de mosquitos de Argentina que cuenten con códigos de barras. Se identificaron taxonómicamente 34 ejemplares pertenecientes a cuatro especies correspondientes a dos subgéneros: *Sabethes* (*Peytonolus*) *aurescens* (n=2), *Sabethes* (*Sabethoides*) *glaucodaemon* (n=7), *Sabethes* (*Peytonolus*) *identicus* (n=3) y *Sabethes* (*Peytonolus*) *undosus* (n=18). Cuatro ejemplares fueron identificados sólo a nivel genérico debido a que sus estructuras taxonómicas se encontraban deterioradas y fueron registrados como *Sabethes* sp. 1. A cada ejemplar se les tomó fotografías, incluyendo, cuando fue posible, detalles de la genitalia masculina y del estadio larval IV, con las cuales se elaboraron láminas pictóricas. Se identificaron mediante secuencias del gen COI nueve ejemplares de las especies *Sa. undosus* (n=8) y *Sa. glaucodaemon* (n=1), siendo *Sa. identicus* la única especie que no contaba con código de barras en los servidores consultados. Este trabajo permitió incrementar de 53 a 56 (21,72% a 22,95%) el número de especies pertenecientes a Culicidae con secuencias de código de barras para Argentina, del total de 244 especies de mosquitos registradas para nuestro país.

INTRODUCCIÓN

Origen y fundamento de la investigación

La fiebre amarilla (FA) es causante de hasta 60000 muertes anuales en América del Sur y África y es la arbovirosis más grave transmitida por mosquitos en los trópicos (OPS, 2023). A pesar de la existencia de una vacuna efectiva desde 1937, se estima que más de 400 millones de personas no vacunadas viven en áreas con riesgo de infección (OPS, 2023). En América, la transmisión del virus de la FA se produce principalmente a través del ciclo selvático, en el que los primates no humanos se infectan a partir de la picadura de mosquitos infectados de los géneros *Haemagogus* Williston y *Sabethes* Robineau-Desvoidy que habitan en áreas silvestres y crían en fitotelmata (Hanley et al., 2013).

La fiebre amarilla se sigue reportando periódicamente en las áreas silvestres de los países vecinos (OPS, 2023). En Brasil, se registraron brotes de grandes proporciones entre finales del 2016 y hasta el 2020, con 2256 casos confirmados que afectaron principalmente los estados de la región sudoeste (São Paulo, Minas Gerais, Río de Janeiro y Espírito Santo) (OPS, 2023). El brote de 2017-2018 reportó unos 2000 casos aproximadamente, con una tasa de letalidad próxima al 80% (OPS, 2023). En 2022, tres países de la región confirmaron casos de fiebre amarilla: Bolivia (cinco casos confirmados), Brasil (durante el periodo 2021 - 2022 notificaron cinco casos, incluyendo cuatro defunciones) y Perú (siete casos confirmados, incluyendo cinco defunciones) (OPS, 2023). Algunos hallazgos de mosquitos del género *Sabethes* naturalmente infectados con el virus de la FA han sido registrados en Brasil y Argentina (Roberts et al., 1981; Dégallier et al., 1992; Vasconcelos et al., 1997; Goenaga et al., 2012). En el último y mayor brote de fiebre amarilla selvática ocurrido en el año 2019 en el estado de Río de Janeiro, sureste de Brasil, 5 especies correspondientes a los géneros *Haemagogus* (S=2), *Aedes* Meigen (S=2) y *Sabethes* (S=1) se hallaron naturalmente infectadas, siendo *Sabethes (Sabethoides) chloropterus* von Humboldt la única especie del género positiva para el virus (Abreu et al., 2019).

Los estudios taxonómicos son la base de las investigaciones ecológicas y epidemiológicas relacionadas con culícidos, en particular las vinculadas a problemáticas sanitarias, requieren de la identificación inequívoca de las especies que podrían participar como vectores de virus, en virtud de poder realizar las adecuadas acciones de control de las mismas. La taxonomía molecular es una herramienta muy útil que permite la identificación de especímenes dañados, especies crípticas y taxones que carecen de suficientes estudios taxonómicos (Hendrich et al., 2010; Sikes et al., 2017). Desde hace varios años la taxonomía molecular, a partir de la secuenciación del gen mitocondrial Citocromo C Oxidasa Subunidad I (COI) es utilizada para identificar especies de mosquitos de Canadá (Cywinska et al., 2006), India (Kumar et al., 2007) y China (Wang et al., 2012). También ha permitido revelar complejos de especies dentro del género *Nyssorhynchus* Blanchard de la subfamilia Anophelinae de la Región Neotropical (Ruiz-López et al., 2012; Bourke et al., 2013; Foster et al., 2013). A partir de secuencias parciales del gen COI se ha podido identificar complejos de especies dentro de la Forma A de la especie *Anopheles barbirostris* Wulp (Saeung et al., 2008).

Dentro de la familia Culicidae Meigen existen taxones con complejos de especies crípticas cuya diferenciación morfológica es poco evidente. Entre ellos se encuentran los géneros *Anopheles* Meigen, *Culex* Linneo y *Sabethes* (Harbach & Howard, 2007). El género *Sabethes* presenta 42 especies válidas

clasificadas en cinco subgéneros: *Sabethes* Robineau-Desvoidy (18 especies), *Sabethoides* Theobald, (cuatro especies), *Sabethinus* Lutz, (seis especies), *Peytonulus* Harbach (13 especies) y *Davisomyia* Lane & Cerqueira (una especie) (Neves et al., 2024).

En Argentina se registran en la actualidad 244 especies de la familia Culicidae de las cuales 13 corresponden al género *Sabethes* (Cano et al., 2021), que incluye especies de reconocida importancia sanitaria, tales como *Sabethes (Sabethes) albiprivus* Theobald, *Sabethes (Sabethes) belisarioi* Neiva, *Sabethes (Sabethoides) chloropterus*, *Sabethes (Peytonulus) identicus* Dyar & Knab y *Sabethes (Peytonulus) soperi* Lane & Cerqueira (de Rodaniche & Galindo, 1957; Causey et al., 1964; Goenaga et al., 2012; Stanzani et al., 2022).

Mosquito Barcoding Initiative, es una de las campañas del proyecto global Barcode of Life, que tiene la finalidad de utilizar un fragmento corto y estandarizado de ADN (fragmento de ~684 pares de bases del gen COI), para la identificación de especies y para acelerar el descubrimiento de la biodiversidad que aún se desconoce, además de descubrir complejos de especies. Asimismo, el sitio <http://connect.barcodeoflife.net/group/mosquitobarcoding> se ha creado para facilitar la comunicación entre investigadores a nivel mundial interesados en el estudio de códigos de barras de mosquitos (Laurito et al., 2022).

El objetivo del presente estudio es identificar especies del género *Sabethes* registradas en el nordeste argentino, mediante el uso de herramientas moleculares, para lograr una identificación inequívoca, como así también, contribuir al conocimiento de la biodiversidad incorporando dicha información al Barcode of Life Data Systems (BOLDSystems, <https://boldsystems.org>) y al National Center for Biotechnology Information (NCBI, Genbank, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Esto reviste además de interés sanitario dado que ciertas especies participan en la transmisión de patógenos que afectan tanto al hombre como a los animales.

Antecedentes del tema

A partir del descubrimiento de la participación de los mosquitos en la transmisión de la malaria y la fiebre amarilla, hacia finales del siglo XIX, comenzaron a realizarse un gran número de descripciones y clasificaciones de especies. Para la primera década del siglo XX, ya se habían nominado y descrito, brevemente y sin basarse en todos los estados del desarrollo, más de 200 especies de mosquitos a nivel mundial (Edwards, 1932). A partir de la obra de Edwards de 1932 "Diptera, Culicidae" se presenta una clara diagnosis para todos los géneros, subgéneros y grupos de especies de la familia y se proporciona un listado completo de referencias y sinonimias de los nombres que han sido asignados a mosquitos tanto a nivel genérico como específico, clasificación que todavía hoy se usa en sistemática de mosquitos. Además, el autor planteó que para alcanzar un sistema de clasificación natural deben ser considerados todos los estados de desarrollo. A pesar de su importancia médica y siglos de estudio, la taxonomía de los mosquitos no está completa y el actual sistema de clasificación no es del todo natural (Belkin, 1962; Judd, 1996; Harbach & Kitching, 1998; Reinert et al., 2004). La familia Culicidae abarca más de 3700 especies reconocidas formalmente, aunque debido a la existencia de complejos de especies muy similares, el número puede elevarse unas tres o cinco veces más. La clasificación de Culicidae antes del final del siglo XX incluyó dos subfamilias (Anophelinae y Culicinae), 11 tribus y 38 géneros (Harbach, 2013). Hasta la

revisión de Belkin (1962), las clasificaciones eran agrupaciones fenéticas resultado de la interpretación subjetiva de caracteres anatómicos. La subfamilia Culicinae incluye 3052 especies (Harbach, 2013) distribuidas en 11 tribus: Aedeomyiini Theobald, Aedini Neveu-Lemaire, Culicini Meigen, Culisetini Belkin, Ficalbiini Belkin, Hodgesiini Belkin, Mansoniini Belkin, Orthopodomyiini Belkin & Heinemann, Sabethini Blanchard, Toxorhynchitini Lahille & Uranotaeniini Lahille. Sólo Culicini y Sabethini son monofiléticas (Harbach & Kitching, 1998).

Actualmente en Argentina se registran 244 especies pertenecientes a Culicidae (Rossi, 2015; Stein et al., 2018) de las cuales 35 especies pertenecen a Anophelinae y 209 pertenecen a Culicinae. La tribu Sabethini incluye 47 especies pertenecientes a ocho géneros: *Onirion* Harbach & Peyton, *Runchomyia* Theobald, *Sabethes*, *Shannoniana* Lane & Cerqueira, *Trichoprosopon* Theobald, *Wyeomyia* Theobald, *Isostomyia* Coquillett y *Limatus* Theobald. Con respecto a sus estados inmaduros, algunas especies incluidas en los géneros *Sabethes* (S=2), *Trichoprosopon* (S=3) y *Wyeomyia* (S=4), aún no cuentan con descripciones de larvas y pupas, estando las hembras y/o larvas de algunas de ellas inadecuadamente descritas (Darsie 1985). Sabethini es una tribu de difícil caracterización debido a la variabilidad de los grupos que incluye. La mayoría de los estudios realizados sobre la tribu en cuestión en nuestro país refieren a la distribución geográfica (Brèthes, 1910, 1912; Petrocchi, 1929; Shannon & Del Ponte, 1928; Shannon, 1930; Duret, 1949, 1950, 1951; Prosen et al., 1960; García & Casal, 1965; Campos & Maciá, 1998; Ronderos et al., 1992; Marti et al., 2007; Visintin et al., 2010; Stein et al., 2012) y unos pocos sobre sistemática (García, 1959; Campos & Zavortink, 2010; Stein et al., 2020).

Las claves taxonómicas publicadas por Darsie (1985), para mosquitos de Argentina, han servido como herramienta esencial para la labor de generaciones de taxónomos, ecólogos y epidemiólogos. El valor de estas claves, que además de haber sido publicadas en inglés y español, presentan información morfológica de la hembra y larva de estadio IV de ambas subfamilias, datos de la distribución por provincias y bibliografía, debe ser explícitamente reconocido ya que no ha habido obra de tal magnitud y envergadura comparable. Sin embargo, es necesario actualizarlas y/o elaborar nuevas claves para Argentina que incluyan los registros posteriores, así como los estados de desarrollos descriptos y re-descriptos hasta la fecha.

El género *Sabethes* en Argentina está representado por 13 especies distribuidas en cinco subgéneros (Tabla S1). Ha habido escasos aportes recientes en relación a su taxonomía, los cuales serían útiles, dado que las claves dicotómicas disponibles para las hembras, se basan en la coloración de escamas y cerdas, pudiendo resultar subjetiva al momento de la identificación de las especies. *Sabethes* (*Sabethoides*) *glaucodaemon* Dyar y Shannon, no se encuentra en la clave de Darsie (1985). Tanto adulto hembra como larva fueron registrados por primera vez para Argentina con posterioridad, a la vez que re-descriptos y descritos sus estados de desarrollo (Stein et al., 2018, 2020). Esta especie es muy similar en su morfología externa a *Sabethes* (*Sabethoides*) *chloropterus* por lo que su no presencia en la clave de Darsie puede traer confusiones a los taxónomos no entrenados. Un aporte reciente y muy valioso para la taxonomía del grupo que fuera publicado mientras se redactaba el presente proyecto, es la clave ilustrada de hembras del género *Sabethes* elaborada por Santos Neves et al. (2024) con información sobre bionomía, distribución geográfica e importancia taxonómica de 35 especies.

Las larvas de *Sabethes (Peytonolus) purpureus* Theobald y *Sabethes (Sabethes) cyaneus* Fabricius no pueden diferenciarse siguiendo la clave de Darsie (1985), y desafortunadamente Forattini (2002) no desarrolló clave para los estados inmaduros del género. Argumentando que la larva de *Sabethes (Sabethes) albiprivus* permanecía desconocida para la ciencia hasta el momento de la edición de la clave de Darsie (1985) no fue incluida, aunque ya había sido descrita por Forattini et al. (1965). Por último, la larva de *Sabethes (Sabethes) belisarioi* tampoco se incluye ya que permanece desconocida.

Un obstáculo sustancial de los estudios sistemáticos es que gran parte de los mismos se basan en ejemplares únicos presentes en colecciones entomológicas, y que los mosquitos conservados en museos de alguna forma dificultan los análisis moleculares convencionales. En Argentina existen pocas colecciones de referencia de Culicidae, por lo que hay una necesidad urgente de nuevas colecciones en particular de regiones de alta biodiversidad como es el norte argentino, como así también su correcta criopreservación o preservación que permita estudios moleculares.

Los códigos de barras de ADN (DNA barcode) son herramientas eficaces para identificar especies de mosquitos, conocer la variabilidad genética y establecer relaciones filogenéticas. En Argentina, fragmentos de código de barras de 80 ejemplares de mosquitos de 28 especies registradas en el país de los géneros *Aedeomyia* Theobald, *Anopheles*, *Coquillettidia* Dyar, *Culex*, *Haemagogus*, *Mansonia* Blanchard, *Nyssorhynchus*, *Ochlerotatus* Lynch Arribálzaga, *Psorophora* Robineau-Desvoidy y *Uranotaenia* Lynch Arribálzaga fueron secuenciados. Veinte de las 28 especies secuenciadas representan nuevos códigos de barras para Argentina, siendo 11 de ellos los primeros registros para la ciencia. Esto aumentó de 31 a 52 (12,7 a 21,31%) y de seis a diez (28,57 a 47,62%) el número de especies y géneros, respectivamente, con secuencias de código de barras del total de 244 especies de mosquitos distribuidas en 21 géneros registrados para Argentina (Laurito et al., 2022). Recientemente Ayala et al., (2024) aumentan el registro con la secuencia de la especie *Haemagogus leucocelaenus* (Dyar & Shannon) de ejemplares colectados en las provincias de Corrientes y Misiones. Hasta el momento son escasos los códigos de barras obtenidos de ejemplares de mosquitos del género *Sabethes* colectados en Argentina, de allí uno de los objetivos del presente estudio.

La importancia de realizar la taxonomía molecular de mosquitos de la tribu Sabethini (Culicidae), en particular del género *Sabethes* de Argentina que incluya registros pictóricos de esas especies, contribuirá con la inequívoca identificación de las mismas, en un grupo taxonómico que reviste importancia médico-veterinaria con hembras de algunas especies que han sido halladas naturalmente infectadas con diferentes arbovirus y se ha demostrado su competencia vectorial.

OBJETIVOS GENERALES Y PARTICULARES

Objetivo General

Contribuir al conocimiento de la sistemática y diversidad del género *Sabethes* (Diptera: Culicidae) del nordeste argentino.

Objetivos Particulares

1. Identificar morfológica y molecularmente especies del género *Sabethes* colectadas en el nordeste argentino, que se encuentran crioconservados en el Laboratorio de Entomología del Instituto de Medicina Regional.
2. Registrar fotográficamente dichos ejemplares del género *Sabethes* y asociar esos registros a su identificación morfológica y molecular.
3. Ampliar el listado de especies de mosquitos de Argentina que puedan ser integrados al GenBank y BOLDSystems.

HIPÓTESIS DEL TRABAJO

El uso de la taxonomía molecular permitirá confirmar las determinaciones morfológicas de las especies del género *Sabethes* analizadas en el presente estudio, y cuyas secuencias se encuentren registradas en las bibliotecas de códigos de barras. Por otra parte, proporcionará nuevas secuencias de estas especies que no se encuentran aún registradas en las bibliotecas mencionadas, como así también, identificar nuevas especies ampliando el número de las especies del género *Sabethes* citadas hasta el momento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico y Características del área de estudio

Se trabajó con ejemplares del género *Sabethes* de colectas realizadas en la ciudad de Eldorado, provincia de Misiones en el marco del Proyecto PIL002/18 Secretaría de Ciencia y Técnica de la UNNE. Parte del material estaba crioconservado en el Laboratorio de Entomología del Instituto de Medicina Regional (UNNE), y parte en la colección entomológica de la misma institución.

La ciudad de Eldorado, provincia de Misiones, nordeste de Argentina (26° 24' 0" S, 54° 38' 0" O) (Figura 1), se encuentra ubicada dentro de la región Neotropical, provincia biogeográfica Paranaense, donde el tipo de vegetación predominante es la selva, con presencia de bosque de albardón, de Bambúseas, y en galería, sabana, pastizal alto y matorral de leguminosas, siendo la provincia fitogeográfica de mayor riqueza de especies vegetales del país (Oyarzabal et al., 2018). Su clima es subtropical sin estación seca, las lluvias oscilan desde 1600 mm en el sur de la provincia a 1900–2017 mm en el noreste, el otoño corresponde a la estación más lluviosa (563 mm). La temperatura media anual es de 22 °C, con máxima absoluta de 38,5 °C y mínima absoluta de -5,4 °C, registrándose entre uno a cuatro heladas anuales (Eibl et al., 1999; Ligier, 2000; Chebez, 2005; Manso Hernández et al., 2010).

Para ampliar el número de especies estudiadas se recurrió a material de colectas realizadas en Puerto Iguazú y Piñalito, provincia de Misiones y San Cayetano, provincia de Corrientes que fueron obtenidas como parte de las colaboraciones que realiza el grupo de investigación con otros investigadores del país.

La localidad de Puerto Iguazú (25° 35' 52" S, 54° 34' 55" O) se encuentra ubicada en el extremo noreste de la provincia de Misiones (Figura 1). En esta ciudad se encuentran el Parque Nacional Iguazú

(25° 31' 05" S, 54° 08' 00" O) y las Cataratas del Iguazú. Puerto Iguazú se encuentra en la triple frontera con Argentina, Brasil (Cataratas del Iguazú) al norte y Paraguay al este (Ciudad del Este); los tres países están divididos naturalmente por los ríos Paraná e Iguazú. La ciudad presenta un gradiente ambiental de paisajes urbanos a rurales con parches remanentes de bosque natural. Debido a su proximidad a las Cataratas del Iguazú, la ciudad es una de las zonas turísticas más importantes de Argentina; es visitada por más de un millón de personas por año y tiene 98673 habitantes, siendo la tercera ciudad más grande de la provincia (INDEC, 2022). El área pertenece a la ecorregión de la selva paranaense. El clima es subtropical húmedo con veranos calurosos y sin estaciones secas (Peel et al., 2007). Los meses más fríos son junio y julio, con una temperatura mínima promedio de 12 °C y 11 °C, respectivamente, mientras que el mes más cálido es enero, con una temperatura máxima promedio de 32 °C. Las precipitaciones son abundantes durante todo el año, con valores medios anuales de 1960 mm. Julio y agosto son los meses más secos con precipitaciones acumuladas de 107 y 83,7 mm, respectivamente (valores climatológicos promedio 1991-2020; Servicio Meteorológico Nacional; <https://www.smn.gob.ar/>).

El Parque provincial Piñalito (26° 30' S, 53° 50' O) se encuentra en el Departamento de San Pedro al nordeste de la provincia de Misiones (Figura 1). Es un área estrictamente protegida de 3796 ha localizada en la porción del Bosque Atlántico de Misiones y se encuentra muy cerca del límite fluvial entre Argentina y el extremo occidental del estado de Santa Catarina, Brasil (Sá, 2023). Ubicado a 750 m s.n.m., posee una vegetación mixta con predominio de elementos típicos de la porción sur del Bosque Atlántico como la araucaria (*Araucaria angustifolia* (Berto Ioni) Otto Kuntze) (Brown & Zunino, 1990). El clima es subtropical húmedo, con una temperatura media anual de 19,5 °C, y presenta estacionalidad en la temperatura y la duración de los días (Crespo, 1982; Agostini, 2009). La estación fría se caracteriza por una temperatura media de 15,15 °C, y la estación cálida por una temperatura media de 22,2 °C (Agostini, 2009). La precipitación anual es de 1800-2000 mm (Crespo, 1982). Este parque provincial se encuentra ubicado dentro del Corredor Verde, un área de conservación y uso sustentable (de una extensión de 1108000 ha.) cuya finalidad es la protección del Bosque Atlántico de la provincia de Misiones, así como las nacientes y las altas cuencas de los principales ríos y arroyos (Holzmann, 2012). Debido a la incesante explotación maderera y al uso que se le ha dado a esta región de la provincia (modificada mayormente por agricultura a pequeña escala) (De Angelo, 2009), una gran porción de la vegetación original del Corredor Verde ha sido reemplazada por monocultivos de especies comerciales exóticas y nativas (Holzmann, 2012). El bosque nativo ocupa la mayor parte de la superficie restante del parque y una vegetación casi prístina puede apreciarse, sobre todo en las grandes quebradas de los valles de los arroyos, donde la extracción de madera no fue posible por la inclinación del terreno (Holzmann, 2012).

La localidad de San Cayetano (27° 34' 15" S, 58° 41' 41" O) está ubicada al noreste de la provincia de Corrientes (Figura 1). El clima es subtropical o mesotermal (Carnevali, 2003), con un gradiente de temperatura media anual que oscila de norte a sur entre los 21° C y 19,5 °C, siendo enero el mes más cálido (media anual, 27 °C) y julio el más frío (media anual, 14 °C). Las temperaturas máximas absolutas del verano se ubican entre 42 °C y 46 °C, siendo las mínimas en invierno entre -1 °C y -5,5 °C. Las lluvias, por su parte, son abundantes, frecuentes e irregulares a lo largo de todo el año, presentando su nivel mínimo en el invierno (Bruniard, 1975; Carnevali, 2003), con precipitaciones medias anuales superiores a 1500 mm en el noreste de la provincia.

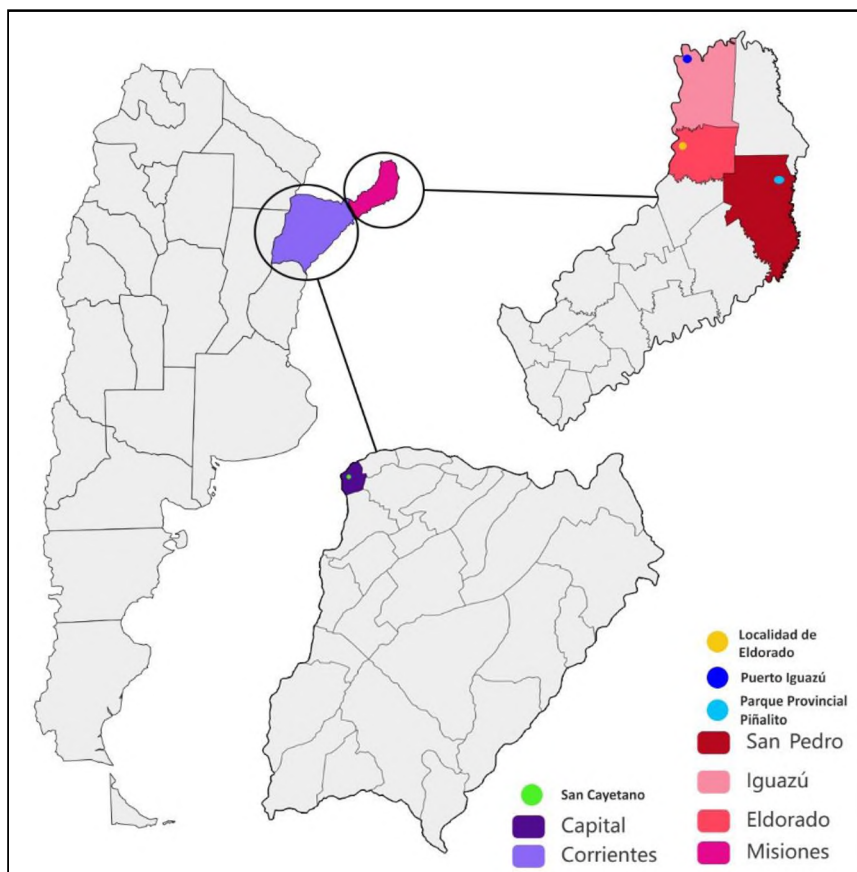


Figura 1. Mapa de Argentina. Provincias de Corrientes (morado) y Misiones (rosado) señalando las localidades de estudio.

Descripción del trabajo de campo y laboratorio previo, que permitió obtener el material biológico con el que se trabajó en el presente estudio

a) Colecta de ejemplares en campo

Los ejemplares corresponden a colectas de larvas y/o pupas de Culicidae que habitan en el agua contenida en tocones de tacuara situados dentro del predio del Parque Natural Adolfo Schwelm, ubicado en el límite oeste de la ciudad de Eldorado, Misiones. Se extrajo toda el agua contenida en cada planta utilizando un frasco aspirador (Figura 2). El material recolectado fue transferido a envases, los que fueron tapados y rotulados con los correspondientes datos de colección (fecha de colecta, tipo de fitotelmata). Las larvas y pupas extraídas fueron trasladadas al laboratorio para cría y determinación específica.



Figura 2. Colecta de Culicidae de *Guadua chacoensis* en San Cayetano, Corrientes.

b) Cría de inmaduros

Las larvas recolectadas de los primeros estadios (I, II y III) fueron colocadas en vasos de plástico de 70 ml con una mezcla de agua del propio hábitat y agua declorinada (agua corriente de red con previo descanso de dos-tres días). Se criaron en grupos de hasta 20 individuos (siempre que fueran provenientes de la misma fitotelmata) hasta alcanzar el estadio IV, siendo alimentadas con hígado en polvo. Las larvas de estadio IV fueron criadas individualmente en vasos de plástico hasta la emergencia del adulto. Una vez transformada en pupa se retiró la exuvia del estadio IV y se conservó en alcohol 80%, lo mismo se hizo con la exuvia de la pupa al emerger el adulto, conservada en el mismo frasco. Una vez emergidos los adultos, estos fueron extraídos mediante un aspirador manual y traspasados a un vaso plástico cubierto con una tela de tul, dónde fueron alimentados con agua azucarada al 10% embebida en trozos de algodón. Los adultos se sacrificaron luego de 48 horas de emergidos, tiempo suficiente para que endurezca el tegumento y rote la genitalia de los machos, características éstas de importancia taxonómica. Los adultos identificados al igual que las exuvias de larva y pupa fueron crioconservados en freezer a -20 °C hasta su determinación morfológica y molecular.

c) Determinación morfológica de especies del género *Sabethes*

Los especímenes adultos hembra fueron identificados con el uso de microscopio estereoscópico y utilizando las claves taxonómicas de Darsie (1985), Lane (1953), y descripciones originales.

Además, en el caso de los adultos macho, especialistas realizaron el montaje de la genitalia según los procedimientos empleados en el “Center for Disease Control and Prevention” (CDC, United States) y el “Núcleo de Pesquisa Taxonômica e Sistemática em Emtomologia Médica” (Universidade de São Paulo, Brasil), para realizar su identificación. Las exuvias de larva IV, correspondientes a las crías en el estado adulto tanto macho como hembra, se identificaron morfológicamente utilizando las mismas claves mencionadas en párrafos anteriores y descripciones originales.

La determinación morfológica de los ejemplares se documentó en una base de datos elaborada en Excel, donde se registró la clasificación asignada a cada uno de ellos, asegurando un registro claro y organizado.

La terminología morfológica utilizada es la establecida por Harbach & Knight (1980).

d) Registro fotográfico de mosquitos del género *Sabethes*

Dado que los ejemplares adultos macho o hembra utilizados para identificación molecular son macerados, perdiendo así caracteres de importancia taxonómica, los mismos fueron fotografiados antes de dicho procesamiento. A los individuos adultos resultado de las crías y crioconservados se les tomó fotografías con enfoque a diferentes estructuras morfológicas de interés taxonómico y una de vista general, previo a la conservación en alcohol 99%, para los posteriores análisis moleculares. Además, se fotografiaron las exuvias de larva de estadio IV de las correspondientes crías. La genitalia del adulto macho fue montada posteriormente a la obtención de la fotografía del espécimen completo y luego del montaje fotografiada. Las fotografías del estado adulto hembra o macho, exuvias de larva IV y genitalia fueron utilizados para la elaboración de láminas pictóricas que destacan las características morfológicas de las especies estudiadas. Para fotografiar los estados adultos se utilizó un estereomicroscopio binocular Leica EZ4, y una cámara digital Canon Eos Rebel T6i 24.2 mp Full Hd Kit 18-55mm. En el caso de las exuvias del estadio larval IV y genitalia masculina se utilizó un microscopio óptico Olympus. A cada fotografía se le asignó un código único correspondiente al ejemplar fotografiado, garantizando su coincidencia con el código del material posteriormente procesado.

Dicho registro fotográfico se cargó en la misma base de datos del punto c).

e) Análisis molecular de los especímenes

Para el procesamiento molecular de cada ejemplar se utilizaron patas o el adulto entero. Para el procesamiento de adultos enteros se quitaron antenas y alas, conservando una o dos patas que sirvieron como “backup” de la muestra para repetir la extracción cuando fue necesario. La extracción de ADN genómico total se realizó utilizando un kit comercial (Wizard (R) Genomic DNA Purification Kit-PROMEGA) (Figura S1). Se evaluó cuantitativamente el peso molecular del ADN extraído con una corrida electroforética en gel de agarosa al 1%, y se midió la absorbancia y pureza del ADN obtenido mediante un equipo Nanodrop. La amplificación del segmento de 648 pb del gen mitocondrial citocromo C oxidasa subunidad I (COI), se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR convencional) utilizando los siguientes cebadores: LepFoIF y LepFoIR (Hebert et al., 2004); S1718 y AS2442 (Normark & Lanteri, 1998); LCO1490 y HCO2198 (Folmer et al., 1994). Las condiciones de amplificación fueron las descritas por Rodríguez et

al., (2010) y Laurito et al., (2022). Los productos de PCR se visualizaron utilizando geles de agarosa al 2% suplementados con Gel Red (GenBiotech), bajo luz UV con un transiluminador (uvipro Bronze).

f) Secuenciación genómica y edición post secuenciación

Los fragmentos amplificados con mejor calidad de bandas fueron enviados a secuenciar a Macrogen, Inc., Corea del Sur, para confirmar su identidad específica. Las secuencias fueron editadas utilizando el software Bioedit v. 7.2 (Hall, 1999), donde se establecieron secuencias consensos para cada ejemplar. Dichas secuencias se alinearon por nucleótidos utilizando el algoritmo Muscle (Edgar, 2004) y se removieron los primers en el software Mega11 v. 11 (Tamura et al., 2021).

g) Búsqueda de secuencias obtenidas en el NCBI y cálculo de distancias genéticas

Se comparó las secuencias obtenidas con la base de datos del NCBI utilizando la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Asimismo, se calculó los valores de divergencia entre las secuencias de nucleótidos por pares y se estimó la distancia intraespecífica e interespecífica utilizando el método dos parámetros de Kimura (K2P) (Kimura, 1980) en el software Mega11 v.11 (Tamura et al., 2021).

h) Incorporación de las secuencias obtenidas al GenBank y BOLDSystems

Se utilizaron las herramientas proporcionadas por el GenBank ([Submissions to Genbank](#)) y BOLDSystems ([Submissions to BOLD](#)).

RESULTADOS

Identificación taxonómica

Se trabajó con 34 ejemplares pertenecientes al género *Sabethes* (Tabla 1), cuya identificación taxonómica correspondió a 4 de las 13 especies registradas en Argentina, pertenecientes a los subgéneros *Peytonulus* Harbach y *Sabethoides* Theobald: *Sabethes (Peytonulus) aurescens* Lutz (n=2), *Sabethes (Sabethoides) glaucodaemon* (n=7), *Sabethes (Peytonulus) identicus* (n=3) y *Sabethes (Peytonulus) undosus* Coquillett (n=18). Las identificaciones taxonómicas de estas especies se confirmaron examinando las exuvias de larvas de estadio IV, con los estados adultos asociados y los genitales de los machos adultos cuando se encontraban disponibles, derivados de estados inmaduros (Tabla 1).

Cuatro ejemplares pudieron identificarse sólo a nivel genérico debido a que sus estructuras taxonómicas se encontraban deterioradas y fueron registrados como *Sabethes* sp. 1.

Tabla 1. Lista de especies identificadas taxonómicamente en este trabajo, colectadas en Eldorado, Parque Nacional Iguazú y Piñalito, provincia de Misiones y San Cayetano, provincia de Corrientes, Argentina.

Especie	Muestra	Sitio de Colecta	Hábitat Larval	Sexo	Material de identificación morfológica			Figura
					Larva IV	Exuvia larval	Genitalia Masculina	
<i>Sabethes aurescens</i>	A52	Piñalito	Tacuara	Hembra	X	X		2S
	A50	Piñalito	Tacuara	Hembra	X	X		3

<i>Sabethes glaucodaemon</i>	A4	Eldorado	Tacuara	Macho	X	X		3S
	A47	Eldorado	Tacuara	Macho			X	4S
	A48	Eldorado	Tacuara	Macho			X	5S
	A49	Eldorado	Tacuara	Macho	X	X	X	4
	A15	Eldorado	Tacuara	Macho	X	X		6S
	A43	Eldorado	Tacuara	Macho				7S
	A45	Eldorado	Tacuara	Macho	X	X	X	8S
<i>Sabethes identicus</i>	A9	San Cayetano	Tacuara	Hembra				9S
	A31	Pto. Iguazú	Tacuara	Macho				10S
	A51	Pto. Iguazú	Tacuara	Macho	X	X	X	5
<i>Sabethes</i> sp. 1	A27	San Cayetano	Tacuara	Macho				11S
	A30	San Cayetano	Tacuara	Macho				12S
	A42	Pto. Iguazú	Bromelia	Macho				13S
	A44	Eldorado	Tacuara	Macho	X	X		14S
<i>Sabethes undosus</i>	A1	Eldorado	Tacuara	Hembra				15S
	A2	Eldorado	Tacuara	Macho	X	X	X	16S
	A3	Eldorado	Tacuara	Macho			X	17S
	A7	Eldorado	Tacuara	Macho	X	X	X	18S
	A8	Eldorado	Tacuara	Macho			X	19S
	A10	Eldorado	Tacuara	Hembra				20S
	A11	Eldorado	Tacuara	Macho			X	21S
	A12	Eldorado	Tacuara	Macho	X	X		22S
	A13	Eldorado	Tacuara	Macho			X	23S
	A14	Eldorado	Tacuara	Macho	X	X	X	24S
	A16	Eldorado	Tacuara	Macho	X	X	X	25S
	A17	Eldorado	Tacuara	Hembra				26S
	A18	Eldorado	Tacuara	Macho	X	X		27S
	A20	Eldorado	Tacuara	Hembra	X	X		28S
	A22	Eldorado	Tacuara	Hembra	X	X		29S
	A32	Pto. Iguazú	Tacuara	Macho				30S
	A34	Eldorado	Tacuara	Macho	X	X	X	6
	A37	Eldorado	Tacuara	Hembra			X	31S

S: Material suplementario.

Registro fotográfico

Se obtuvieron registros fotográficos de los 34 ejemplares adultos del género *Sabethes*, enfocados en estructuras clave para su identificación taxonómica (Figuras 3 a 6 y 2S a 31S). En los casos posibles, también se documentó el estadio larval IV y la genitalia de los machos. A partir de estas imágenes, se elaboraron láminas pictóricas que resaltan las características diagnósticas del adulto hembra, adulto macho (incluyendo su genitalia) y el estadio larval IV de las especies identificadas.

Identificación molecular de especies del género *Sabethes*

Todos los ejemplares de mosquitos adultos del género *Sabethes* fueron procesados para la detección del gen COI. Se obtuvieron un total de 24 resultados positivos. Los resultados negativos pueden deberse al uso de sustancias en la preservación de los ejemplares de la colección entomológica que

podieron haber deteriorado el ADN (Simmons, 2005; Márquez-Luna et al., 2022). La disponibilidad de recursos económicos no posibilitó el envío de todas las muestras positivas para su secuenciación, por lo que se seleccionaron los amplificados con mejor resolución de banda y, dentro de ellos, que estuvieran representadas las cuatro especies identificadas morfológicamente. Catorce de los 24 resultados positivos fueron secuenciados (Figura 32S) correspondiendo a las siguientes especies: *Sabethes aurescens* (n=1), *Sabethes glaucodaemon* (n=2), *Sabethes identicus* (n=3) y *Sabethes undosus* (n=8) (Tabla 2), siendo la muestra *Sa. glaucodaemon* (A15) descartada por falta de claridad en la secuencia obtenida (Figura 33S) y la muestra correspondiente a *Sa. aurescens* (A50) no fue recuperada de los envíos a MacroGen Inc.

Nueve de los 12 ejemplares del género *Sabethes* contaban con su respectiva secuencia de código de barras COI en los dos servidores consultados, lo que confirmó la identificación molecular de las especies: *Sabethes undosus* (n=8) y *Sabethes glaucodaemon* (n=1) (Tabla 2). Dicha identificación fue coincidente con la determinación morfológica.

Sabethes glaucodaemon cuenta con dos registros asociados en GenBank (NC_037500 y MF957173), ambos de Brasil, aunque ninguno de ellos se corresponde con la secuencia específica del gen COI. Sin embargo, al tratarse de secuencias del genoma completo mitocondrial de la especie, se logró obtener la secuencia del gen en cada una de ellas. La obtención de la secuencia específica del gen COI conseguida en este estudio (PQ605758) (Tabla 4) representa el primer registro de código de barras de esta especie para nuestro país.

Sabethes undosus dispone de cinco secuencias del gen COI registradas en el servidor GenBank, todas provenientes de Guyana Francesa (MF172373 a MF172377), por tanto, las secuencias obtenidas en el presente estudio (PQ593923 a PQ593930) (Tabla 4) representan los primeros registros de esta especie para Argentina.

Tabla 2. Lista de especies del género *Sabethes* identificadas taxonómica y molecularmente.

Muestra	Identificación Morfológica	GenBank			BOLDSystem		
		Resultado	Código de acceso	Similitud (%)	Resultado	Código de acceso	Similitud (%)
A4	<i>Sabethes glaucodaemon</i>	<i>Sabethes glaucodaemon</i>	NC_037500.1	97,7	<i>Sabethes glaucodaemon</i>	GBMNA994-9-19	97,7
A51	<i>Sabethes identicus</i>	<i>Sabethes chloropterus</i>	MT999310.1	94	n/a	n/a	n/a
A9	<i>Sabethes identicus</i>	<i>Sabethes chloropterus</i>	MT999310.1	94	n/a	n/a	n/a
A31	<i>Sabethes identicus</i>	<i>Sabethes chloropterus</i>	MT999310.1	94	n/a	n/a	n/a
A2	<i>Sabethes undosus</i>	<i>Sabethes undosus</i>	MF172373.1	97	<i>Sabethes undosus</i>	FGMOS339-16	97,0
A7	<i>Sabethes undosus</i>	<i>Sabethes undosus</i>	MF172373.1	97,1	<i>Sabethes undosus</i>	FGMOS339-16	97,0
A8	<i>Sabethes undosus</i>	<i>Sabethes undosus</i>	MF172373.1	97	<i>Sabethes undosus</i>	FGMOS339-16	97
A12	<i>Sabethes undosus</i>	<i>Sabethes undosus</i>	MF172373.1	97	<i>Sabethes undosus</i>	FGMOS339-16	97
A13	<i>Sabethes undosus</i>	<i>Sabethes undosus</i>	MF172373.1	97	<i>Sabethes undosus</i>	FGMOS339-16	97

A18	<i>Sabethes undosus</i>	<i>Sabethes undosus</i>	MF172373.1	97	<i>Sabethes undosus</i>	FGMOS339-16	97
A34	<i>Sabethes undosus</i>	<i>Sabethes undosus</i>	MF172373.1	97	<i>Sabethes undosus</i>	FGMOS339-16	97
A37	<i>Sabethes undosus</i>	<i>Sabethes undosus</i>	MF172373.1	97	<i>Sabethes undosus</i>	FGMOS339-16	97

n/a: not available (no disponible).

La búsqueda de la secuencia del gen COI correspondiente a la especie *Sabethes identicus* arrojó resultados coincidentes con *Sa. (Sabethoides) chloropterus* (Tabla 2), pero la identificación taxonómica de la larva de estadio IV y genitalia del macho de los ejemplares analizados no dejan duda de su determinación. Estas discrepancias se explican por la ausencia de registros de códigos de barras para esta especie en los servidores consultados. En este sentido, las secuencias obtenidas en el presente estudio (PQ612425, PQ612426 y PQ612427) (Tabla 4) representan los primeros registros de códigos de barras de la especie *Sa. identicus* para la ciencia y para Argentina.

Cálculo de distancias genéticas

La distancia genética intraespecífica de las especies *Sa. glaucodaemon*, *Sa. identicus* y *Sa. undosus* mostraron valores relativamente bajos, 0-2,3%, 0,5-1,2% y 0-3,3%, respectivamente (Tabla 3). No obstante, si se compara únicamente las secuencias obtenidas en este estudio, la distancia genética disminuye. Para *Sa. undosus*, los valores resultantes fueron más bajos (0-0,6%).

Las distancias genéticas interespecíficas entre *Sa. glaucodaemon*, *Sa. identicus* y *Sa. undosus*, variaron entre 9,4 y 11,6%, y al comparar sólo las secuencias de las especies obtenidas en este estudio dicha distancia se mantuvo (9,6 a 11,5%) (Tabla 3).

Tabla 3. Estimación de la distancia por pares (K2P) de secuencias del gen COI.

<i>Sa. glaucodaemon</i>			<i>Sa. identicus</i>						<i>Sa. undosus</i>									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1																		
2	2,3042																	
3	0,0000	2,3042																
4	10,5868	10,5890	10,5868															
5	10,3638	10,1697	10,3638	0,5119														
6	10,5868	10,5890	10,5868	1,2177	0,5119													
7	10,7704	10,9572	10,7704	10,3130	10,1746	9,9646												
8	10,7704	10,9572	10,7704	10,4882	10,1746	10,1385	0,1506											
9	10,3358	10,3359	10,3358	10,5482	9,9482	10,1474	0,1727	0,1727										
10	10,7704	10,9572	10,7704	10,4882	10,1746	10,1385	0,1506	0,0000	0,1727									
11	10,1854	9,9834	10,1854	10,4010	9,7887	9,9920	0,3540	0,3540	0,1767	0,3540								
12	10,7704	10,9572	10,7704	10,1385	9,9785	9,7913	0,4532	0,6052	0,3460	0,6052	0,1767							
13	10,5835	10,7699	10,5835	9,9968	9,7832	9,6496	0,3026	0,4545	0,1727	0,4545	0,0000	0,1511						
14	11,1176	11,5249	11,1176	10,9697	11,1264	10,7803	0,1621	0,3247	0,3766	0,3247	0,5803	0,6515	0,4894					
15	11,0169	11,5859	11,0169	10,0756	9,4449	9,7259	3,1158	2,9555	3,0154	2,9555	3,0866	3,1158	2,9555	3,3451				
16	11,0169	11,5859	11,0169	10,0756	9,4449	9,7259	3,1158	2,9555	3,0154	2,9555	3,0866	3,1158	2,9555	3,3451	0,0000			
17	11,0169	11,5859	11,0169	10,0756	9,4449	9,7259	3,1158	2,9555	3,0154	2,9555	3,0866	3,1158	2,9555	3,3451	0,0000	0,0000		
18	11,0169	11,5859	11,0169	10,0756	9,4449	9,7259	3,1158	2,9555	3,0154	2,9555	3,0866	3,1158	2,9555	3,3451	0,0000	0,0000	0,0000	
19	11,0169	11,5859	11,0169	10,0756	9,4449	9,7259	3,1158	2,9555	3,0154	2,9555	3,0866	3,1158	2,9555	3,3451	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Sabethes glaucodaemon [1-NC_037500; 2-PQ605758; 3-MF957173], *Sabethes identicus* [4-PQ612427; 5-PQ612426; 6-PQ612425], *Sabethes undosus* [7-PQ593930; 8-PQ593929; 9-PQ593928; 10-PQ593927; 11-PQ593926; 12-PQ593925; 13-PQ593924; 14-PQ593923; 15-MF172377; 16-MF172376; 17-MF172375; 18-MF172374; 19-MF172373].

En azul las secuencias y distancias genéticas intra e interespecíficas obtenidas en este estudio.

Incorporación de las secuencias obtenidas al GenBank y BOLDSystems

Las secuencias del gen COI fueron incorporadas al Genbank y BOLDSystems siguiendo los protocolos proporcionados por los mismos. Cada secuencia cuenta con su propio código de acceso en ambos servidores (Tabla 4), los cuales se mantendrán en estado privado hasta su publicación formal.

Tabla 4. Lista de especies y códigos de acceso proporcionados por los servidores GenBank y BOLDSystems.

Muestra	Especie	Código de Acceso	
		GenBank	BOLDSystems
A4	<i>Sabethes glaucodaemon</i>	PQ605758	SABET001-24
A9	<i>Sabethes identicus</i>	PQ612425	SABET002-24
A31	<i>Sabethes identicus</i>	PQ612426	SABET003-24
A51	<i>Sabethes identicus</i>	PQ612427	SABET004-24
A2	<i>Sabethes undosus</i>	PQ593923	SABET005-24
A7	<i>Sabethes undosus</i>	PQ593924	SABET006-24
A8	<i>Sabethes. undosus</i>	PQ593925	SABET007-24
A12	<i>Sabethes undosus</i>	PQ593926	SABET008-24
A13	<i>Sabethes undosus</i>	PQ593927	SABET009-24
A18	<i>Sabethes undosus</i>	PQ593928	SABET010-24
A34	<i>Sabethes undosus</i>	PQ593929	SABET011-24
A37	<i>Sabethes undosus</i>	PQ593930	SABET012-24

DISCUSIÓN

El marcador COI ha sido ampliamente utilizado en mosquitos como un código de barras genético para diversos fines como la identificación de especies (Wang et al., 2012; Laurito et al., 2013, 2022; Ayala et al., 2024; Telles-de-Deus et al., 2024), describir la diversidad de ciertas áreas (Bourke et al., 2018), establecer relaciones filogenéticas (Fang et al., 2017; Wang et al., 2017), identificar complejos de especies (Saeung et al., 2008; Ruiz-López et al., 2012; Bourke et al., 2013; Foster et al., 2013; Wang et al., 2017) y análisis filogeográficos (Rathnayake et al., 2023). Diferentes autores han reportado una variación entre 82 a 98% en la congruencia entre las identificaciones taxonómicas y las basadas en códigos de barras (Wang et al., 2012, Chan et al., 2014, Bourke et al., 2018, Delgado-Serra et al., 2020; Adeniran et al., 2021) y explican las inconsistencias por errores en la identificación morfológica a priori (Delgado-Serra et al., 2020). En el presente estudio, la congruencia reportada entre la morfología y las identificaciones basadas en códigos de barras fue de 75% (9/12). La disparidad no necesariamente obedece a errores de identificación, aspecto que en este estudio se descarta, ya que disponemos de la exuvia larval y la genitalia masculina, según el caso, de los ejemplares secuenciados, que nos permitieron confirmar la identificación. La discrepancia, en general, podría explicarse por la existencia de sinonimias, la presencia de complejos de especies, algún grado de hibridación o una clasificación incompleta de los linajes entre especies (Laurito et al., 2022). En este estudio la discrepancia se debió a la ausencia de la secuencia del gen COI de *Sa. identicus* en el servidor GenBank, ocasionando que al momento de comparar dicha secuencia en BLAST, este arroje *Sa. chloropterus* como el resultado con mayor similitud (94%).

La divergencia genética intra e interespecífica de especies congéneras está correlacionada con la escala geográfica del muestreo (Bergsten et al., 2012). En consecuencia, se esperaría una mayor variación genética en muestras tomadas de extensas regiones geográficas (Bergsten et al., 2012). Por esta razón, en el presente estudio, la distancia intraespecífica obtenida al comprar únicamente secuencias de ejemplares de Argentina fue menor en comparación con aquellas que incluyeron secuencias provenientes de Brasil (NC_037500 y MF957173) y Guyana Francesa (MF172373 a MF172377).

Los adultos del subgénero *Peytonulus* del género *Sabethes* se reconocen fácilmente por la combinación de ciertos caracteres, entre ellos, la presencia de escamas blancas llamativas en la superficie ventral del tarsómero posterior 5 (Darsie, 1985). Las larvas de este grupo poseen un rasgo muy distintivo en relación a las de los otros subgéneros que consiste en la modificación de manera singular de la cerda I del segmento abdominal VII a modo de gancho (Darsie, 1985). Las hembras adultas del subgénero *Sabethoides* presentan similitudes con aquellas del subgénero *Peytonolus*, aunque pueden diferenciarse por la presencia de abundantes escamas blancas en la cara interna de los tarsómeros medios las cuales están ausentes en *Peytonolus* (Darsie, 1985). Asimismo, en la clave dicotómica de adultos hembra del género *Sabethes* para mosquitos de Argentina de Darsie (1985) la presencia o no de escamas blancas en el tarsómero posterior 5 y la coloración de las escamas del escuto nos permite diferenciar *Sa. aurescens* de *Sa. identicus*. Dos cuestiones se presentan y pueden llevar a errores en su identificación cuando nos basamos en la taxonomía clásica. Por un lado, la manipulación del material biológico puede llevar a la pérdida de estas estructuras y al no contar con material resultado de crías individuales, su determinación puede no ser certera. Por otro lado, el patrón de coloración de las escamas del escuto es muy similar y ello también puede dificultar la identificación precisa. En este sentido los códigos de barras de ADN se convierten en indispensables.

Sin embargo, otra dificultad se presenta cuando esas secuencias no se encuentran registradas en la biblioteca de código de barras, por lo que la obtención de nuevas secuencias de más especies contribuirá no sólo al conocimiento de la biodiversidad del taxón en cuestión sino también permitirá una inequívoca identificación.

Asimismo, según Huang & Rueda (2014) la adición de fotografías en color en las claves facilita la identificación y reduce las determinaciones erróneas. Si bien la elaboración de una clave no fue objetivo del presente estudio, los registros fotográficos realizados representan un potencial aporte para el catálogo BIODAR (<https://biodar.unlp.edu.ar/culicidae/es/about.html>) de mosquitos de Argentina y Uruguay, que año tras año se actualiza con nuevas referencias bibliográficas y registros fotográficos de las especies.

Los resultados de este estudio aportan secuencias de nucleótidos nuevas a las bibliotecas nacionales e internacionales de códigos de barras. Esto contribuye significativamente al conocimiento sobre la taxonomía y diversidad del género *Sabethes*, del cual escasean los códigos de barras en los distintos repositorios y cuya relevancia se relaciona con la existencia de especies de importancia sanitaria.

Debido a que los códigos de barras de mosquitos de Argentina son actualmente escasos, consideramos necesario ampliar la biblioteca de secuencias disponibles, lo que permitirá representar de mejor manera la diversidad genética de los culícidos y complementar las técnicas morfológicas.

CONCLUSIÓN

Los códigos de barras de ADN son una herramienta eficiente en la determinación de especies del género *Sabethes*, identificando con éxito las secuencias analizadas en este trabajo.

Los registros fotográficos son una herramienta complementaria muy útil de las claves taxonómicas en particular para aquellos taxones que presentan dificultades en la identificación de ciertos estados de desarrollo como es el caso del género *Sabethes*.

Los resultados obtenidos en el presente estudio permitieron aumentar de 53 a 56 (21,72% a 22,95%) el número de especies pertenecientes a Culicidae con secuencias de código de barras para Argentina, del total de 244 especies de mosquitos registradas para nuestro país.

A continuación, incluimos información relacionada con la distribución, bionomía, caracteres diagnósticos e importancia sanitaria de cada especie del género *Sabethes* identificada en el presente estudio.

***Bionomía del género Sabethes* (Robineau-Desvoidy, 1827)**

Los mosquitos del género *Sabethes* se distribuyen exclusivamente en el Nuevo Mundo, desde el centro de México hasta el norte de Argentina (Wilkerson et al., 2021). Todas las especies están ecológicamente especializadas en hábitats selváticos (Forattini, 1965). Son de hábitos diurnos con un pico de actividad durante la tarde (Roberts et al., 1985). Los adultos muestran una estratificación vertical, es decir, preferencia por diferentes alturas dentro de la vegetación, teniendo una marcada afinidad por las copas de los árboles (especies denominadas “acrodendrófilas”) (Roberts et al., 1981). Los estados inmaduros se desarrollan en fitotelmata, principalmente en entrenudos de bambú y huecos de árboles (Campos & Gleiser, 2016). Se han encontrado hembras de este género infectadas de forma natural con varios arbovirus, tales como, el virus de la fiebre amarilla, encefalitis de San Luis, Ilhéus y Xiburema (de Rodaniche & Galindo, 1957; Causey et al., 1964; Goenaga et al., 2012; Wanzeller et al., 2014; de Olivera 2023). Tienen especial predilección por hospedadores humanos y aviares (Gomez et al., 2010), posándose generalmente en partes altas del cuerpo para alimentarse (Dégallier et al., 1992). Recientemente, Gravina et al. (2019) detectaron la presencia de flavivirus *Sabethes* (sbFV), un nuevo flavivirus específico de insectos, cuya patogenicidad por el momento es incierta.

Los adultos de la mayoría de las especies de *Sabethes* presentan una notable cobertura de escamas de color metálico, cuya variación cromática y matices se utilizan para identificar algunas especies (Neves et al., 2024). Las características diagnósticas que destacan al adulto hembra este género son: cerdas prealares ausentes, escudo cubierto de escamas planas de color metálico con destellos iridiscentes y generalmente patas medias con expansiones formadas por escamas largas (Darsie, 1985). Por otro lado, el estadio larval IV se caracteriza por presentar proceso maxilar inmóvil, no articulado con el cuerpo de la maxila, palpo maxilar corto y proyectado en aspecto lateral (Darsie, 1985).

***Sabethes (Peytonolus) aurescens* (Lutz, 1905) (Figuras 3 y 2S)**

Distribución

Sabethes aurescens se distribuye en Argentina, Brasil, Panamá y Venezuela (Lane, 1953). En Argentina se lo registra en las provincias de Corrientes y Misiones (Cano et. al., 2021).

Biología

En el noreste argentino se han encontrado larvas de la especie habitando entrenudos del bambú *Guadua chacoensis* Londoño y Peterson, y *Merostachys claussoni* Munro en Misiones (Campos et al., 2011) y *Guadua* sp. en Corrientes (Campos, 2015). Los estados inmaduros se distribuyen verticalmente a lo largo de los entrenudos del bambú en un amplio rango de estratos (Müller 2008), presentando mayor abundancia en entrenudos ubicados a 1 metro de altura del suelo (Zequi & Lopes, 2001). La proporción de sexos es 1:1 (Müller, 2008). Los entrenudos ubicados entre 0,8 y 1 metro de altura presentan mayor

abundancia de hembras, en cambio, los encontrados entre 2 y 2,6 metros mayor abundancia de machos (Müller, 2008).

Caracteres diagnósticos

Las características diagnósticas más notables del adulto hembra de *Sa. aurescens* son: la presencia de escamas blancas en la superficie ventral del quinto tarsómero del tercer par de patas y la probóscide con una línea de escamas pálidas ventrales (Neves et al., 2024). Por otro lado, el estadio larval IV se caracteriza por presentar la cerda 2 del segmento X con 4 ramificaciones, y las cerdas 1 y 4 del mismo segmento únicas (sin ramificaciones) (Darsie, 1985).

Importancia sanitaria

Esta especie no registra importancia sanitaria.

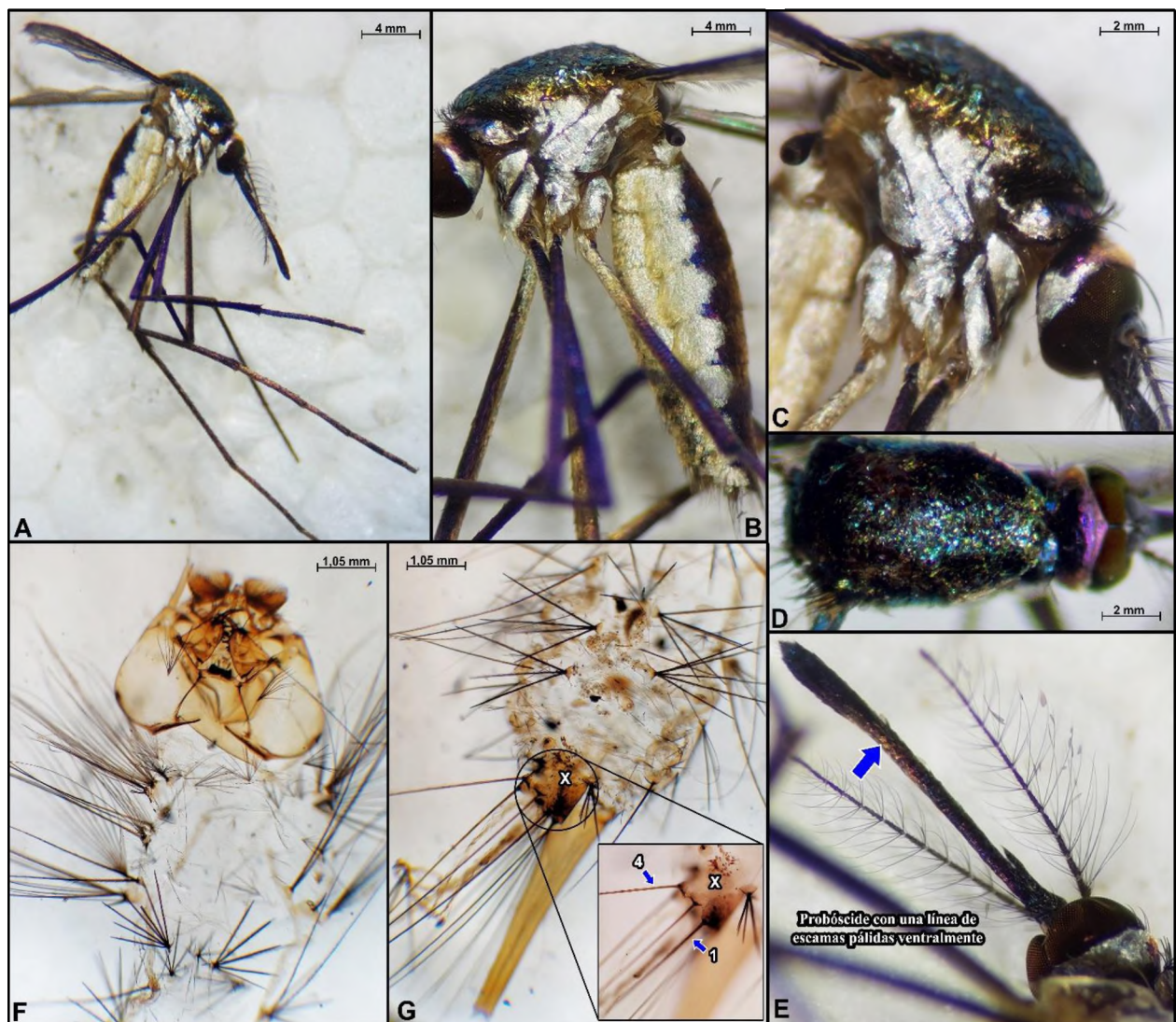


Figura 3. *Sabethes aurescens*. (A) Aspecto general del adulto hembra; (B) Tórax y abdomen, vista lateral; (C) Tórax, vista lateral; (D) Escuto y antepronoto, vista dorsal; (E) Probóscide, vista ventral. *Larva estadio IV*: (F) Cabeza, vista dorsal; (G) Sifón y segmento X, vista dorsal, insertado: mayor definición de cerdas del segmento X.

***Sabethes (Sabethoides) glaucodaemon* (Dyar & Shannon, 1925) (Figuras 4 y 3S a 8S)**

Distribución

Sabethes glaucodaemon es una especie restringida a la región Neotropical, su distribución geográfica incluye Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Guyana y Surinam (Lane, 1953; Molina et al., 2000; Rozo-López & Mengual, 2015; Wilkerson et al., 2021). En Argentina se la ha registrado recientemente en la provincia de Misiones (Stein et al., 2018).

Biología

Los adultos se desplazan por las copas de los árboles entre los 16 y 30 metros de altura (Pinto et al., 2009). Todos los estados de esta especie, exceptuando el huevo, están bien descritos por Stein et al. (2020).

Caracteres diagnósticos

Las características diagnósticas que destacan al adulto hembra de *Sa. glaucodaemon* son: la presencia de escamas verdosas en la parte dorsal del antepronoto y cerdas mesepimerales superiores largas y alcanzando la zona media del mesopostnoto (Neves et al., 2024). Por otro lado, el estadio larval IV se caracteriza por presentar entre 17-22 espinas en el peine del segmento abdominal VIII, la cerda 2 del segmento X tiene tres ramificaciones y el índice sifonal se encuentra entre 3,34-4,83 (Stein et al., 2020).

Importancia sanitaria

Esta especie no registra importancia sanitaria.

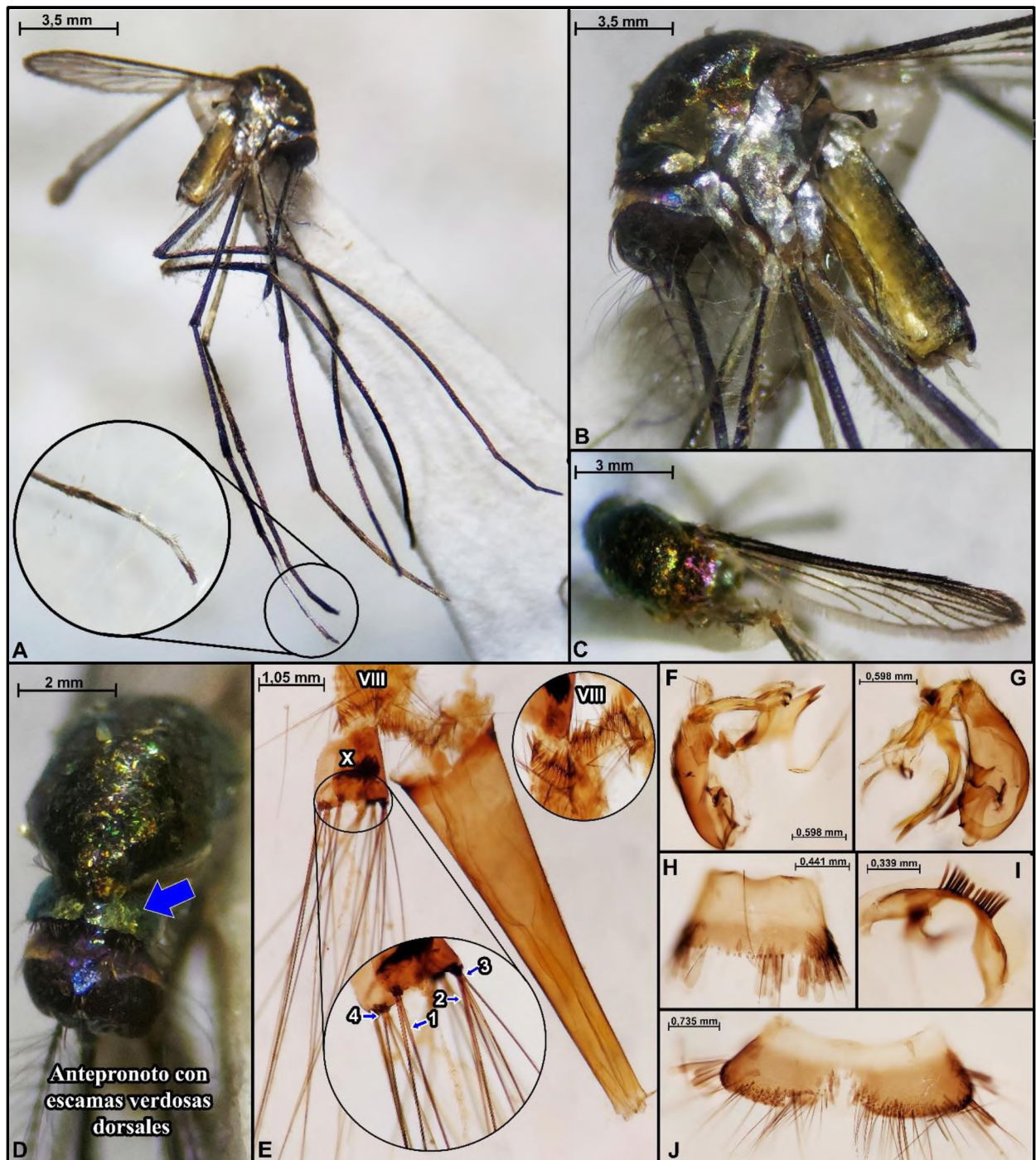


Figura 4. *Sabethes glaucodaemon*. (A) Aspecto general del adulto macho, insertado: mayor aumento de los tarsómeros medios; (B) Tórax y abdomen, vista lateral; (C) Ala, vista dorsal; (D) Escuto y antepronoto, vista dorsal. *Larva estadio IV*: (E) Sifón y segmento X, vista dorsal, insertado: mayor aumento de los segmentos X y VIII. *Genitalia masculina*: (F-G) Gonocoxito y gonostilo; (H) Esterno VIII; (I) Esterno IX; (J) Tergo VIII.

***Sabethes (Peytonulus) identicus* (Dyar & Knab, 1907) (Figura 5 y 9S a 10S)**

Distribución

Sabethes identicus es una especie que se distribuye por Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Guayana Francesa y Panamá (Wilkerson et al., 2021). En Argentina, se lo ha citado en las provincias de Corrientes, Misiones y Salta (Cano et. al., 2021, Apumaita et al., 2023).

Biología

Los estados inmaduros de esta especie se hallaron habitando el bambú *Guadua chacoensis* (Campos et al., 2011). *Sabethes identicus* tiende a volar a la altura del suelo y rara vez se lo encuentra en las copas de los árboles (Guimarães, 1985). El ciclo de vida de este mosquito se desarrolla en 30 días a 25-26 °C, 2-4, 17-19, 8-9 días, respectivamente, para huevo, larvas y pupa (Bersot, 2014). Las hembras colocan una media de 88 huevos a lo largo de su vida y son más longevas que los machos, alcanzando los 71 días de vida bajo condiciones de laboratorio (Bersot, 2014). Las larvas presentan un comportamiento caníbal (Bersot, 2014). Se ha descrito la asociación ecológica entre gorgojos (*Rhinastus sternicornis* Germar) y *Sa. identicus*, donde la oviposición de este último depende de que el gorgojo realice un agujero en la pared de bambú para colocar huevos (Bersot, 2023).

Caracteres diagnósticos

El adulto hembra de *Sa. identicus* se caracteriza por presentar el quinto tarsómero del tercer par de patas (TIII5) completamente cubierto por escamas oscuras (Neves et al., 2024). Por otro lado, el estadio larval IV se diferencia por la presencia de cerdas a modo de “ganchos” en el segmento VII con 2 dientes. El índice sifonal = 4 (Darsie, 1985).

Importancia sanitaria

Esta especie ha sido encontrada naturalmente infectada con el virus de la fiebre amarilla (Stanzani et al., 2022).

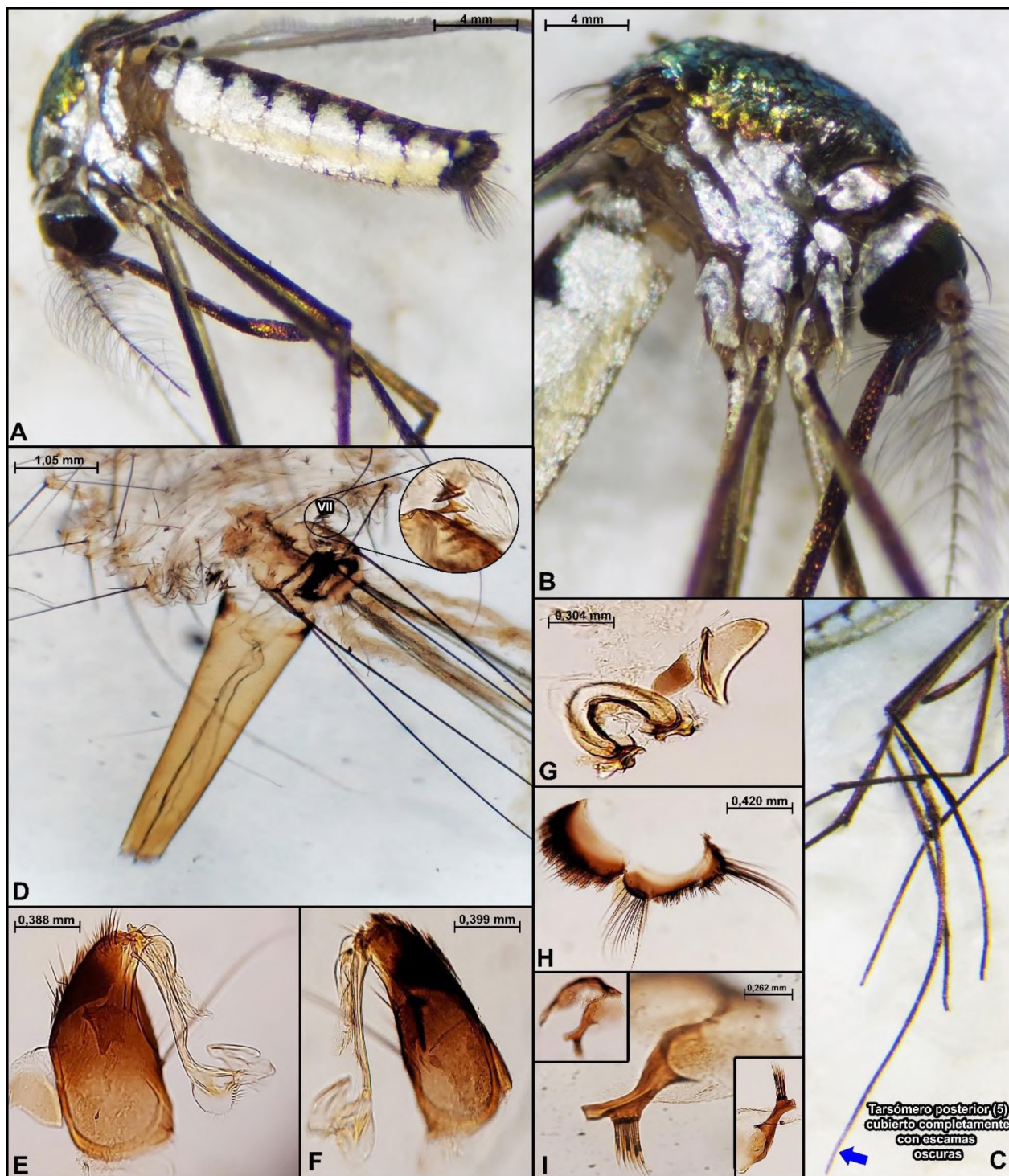


Figura 5. *Sabethes identicus*. (A) Aspecto general del adulto macho; (B) Tórax, vista lateral; (C) Patas, vista lateral. *Larva estadio IV*: (D) Sifón y segmento VII, vista dorsal, insertado: mayor aumento del segmento VII. *Genitalia masculina*: (E-F) Gonocoxito y gonostilo; (G) Adeago; (H) Tergo VIII y Esterno VIII y Tergo VIII; (I) Tergo IX.

***Sabethes (Peytonulus) undosus* (Coquillett, 1906) (Figuras 6 y 15S a 31S)**

Distribución

Sabethes undosus presenta distribución geográfica que incluye Argentina, Belize, Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Ecuador, Guyana, Guyana Francesa, Honduras, Nicaragua, Panamá, Paraguay, Perú, Trinidad y Tobago y Venezuela (Lane, 1953; Chadee, 1986; Barajas et al., 2013; Huaman Quispe, 2022; Suárez et al., 1994; Pecor et al., 2002; Wilkerson et al., 2021). En Argentina esta especie fue citada para las provincias de Chaco, Corrientes y Misiones (Cano et. al., 2021; Stein et al., 2012, 2018).

Biología

Se han registrado estados inmaduros criando en entrenudos del bambú *Guadua* sp. en las provincias de Corrientes (Campos, 2015) y Misiones (Campos et al., 2011) y *Gaudua chacoensis* en Corrientes (Alvarez, 2021). Asimismo, un estudio realizado en Perú halló larvas de *Sa. undosus* habitando contenedores artificiales (neumáticos y contenedores plásticos) (Huaman Quispe, 2022). Larvas de esta especie se observaron alimentándose de larvas de *Aedes aegypti* Linnaeus bajo condiciones de laboratorio (Arnett, 1950). Los adultos se desplazan a la altura del suelo y rara vez se los encuentra en las copas de los árboles (Guimarães, 1985; Dias, 2023).

Caracteres diagnósticos

Los principales caracteres diagnósticos del adulto hembra de *Sa. undosus* son: la presencia de escamas violáceas dorsales en el antepronoto y el tarsómero posterior 5 (Tall5) con escamas blancas ventrales (Neves et al., 2024). Por otro lado, el estadio larval IV se caracteriza por presentar las cerdas 1, 2, 4 del segmento X, triples (Darsie, 1985).

Importancia sanitaria

Esta especie no registra importancia sanitaria.

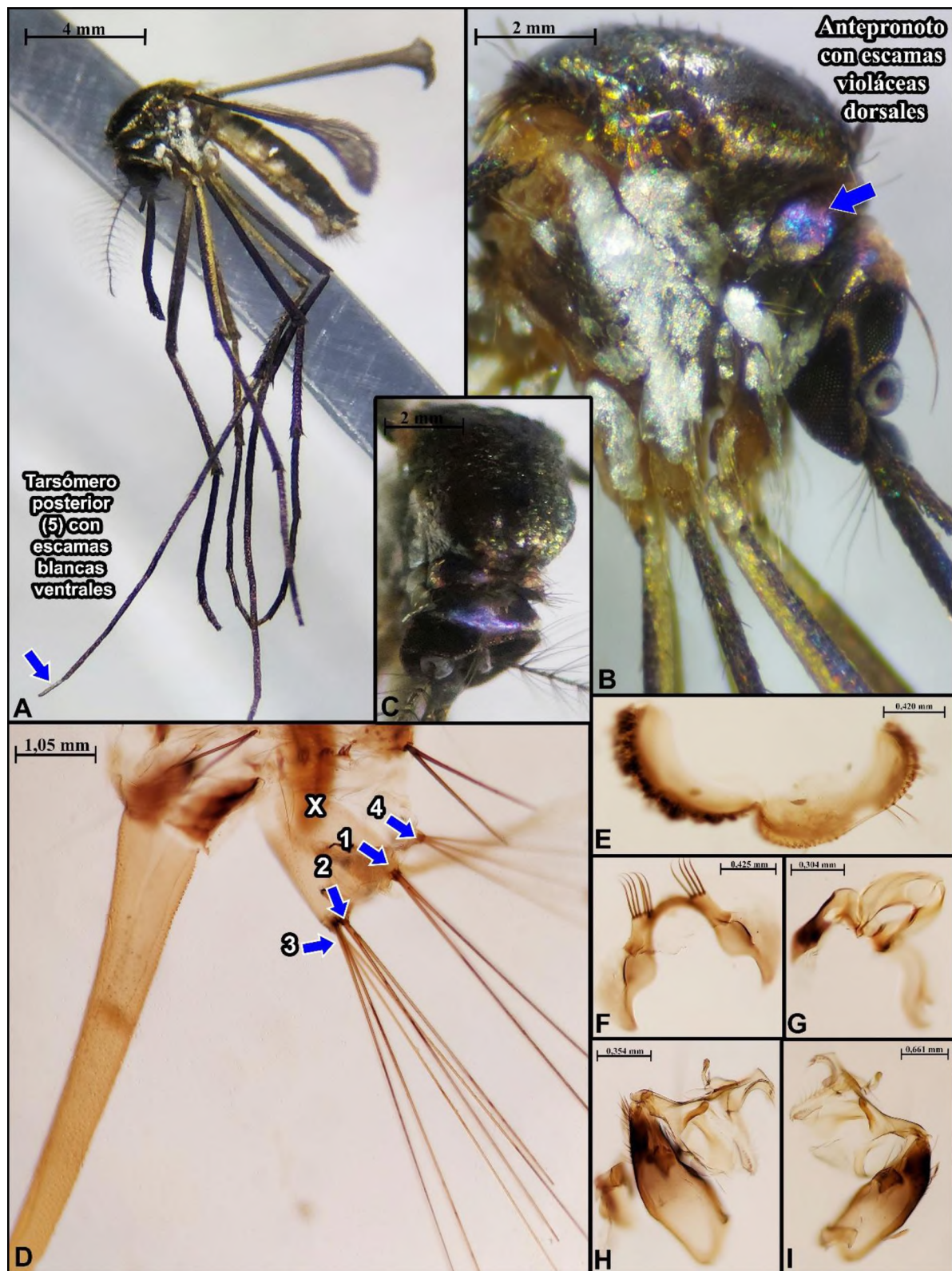


Figura 6. *Sabethes undosus*. (A) Aspecto general del adulto macho; (B) Tórax, vista lateral; (C) Escuto y antepronoto, vista dorsal. *Larva estadio IV*: (D) Sifón y segmento X, vista dorsal. *Genitalia masculina*: (E) Esterno VIII y Tergo VIII; (F) Tergo IX; (G) Aedeago; (H-I) Gonocoxito y gonostilo.

BIBLIOGRAFÍA

- Abreu, F. V. S., de Ribeiro, I. P., Ferreira-de-Brito, A., Santos, A. A. C., Miranda, R. M., Souza, I. B., ... & Lourenço-de-Oliveira, R. (2019). *Haemagogus leucocelaenus* and *Haemagogus janthinomys* are the primary vectors in the major yellow fever outbreak in Brazil, 2016-2018. *Emerging Microbes & Infections*, 8, 218-231. <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1568180>.
- Adeniran, A. A., Hernández-Triana, L. M., Ortega-Morales, A. I., Garza-Hernández, J. A., de la Cruz-Ramos, J., Chan-Chable, R. J., ... & Rodríguez-Pérez, M. A. (2021). Identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) from Mexico State, Mexico using morphology and COI DNA barcoding. *Acta tropica*, 213, 105730.
- Agostini, I. 2009. Ecology and Behavior of two howler monkeys species (*Alouatta guariba clamitans* and *Alouatta caraya*) living in sympatry in northeastern Argentina. Tesis doctoral. Università degli studi di Roma La "Sapienza", Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali, Dipartimento di Biologia Animale e dell'Uomo, Dipartimento di Biologia Vegetale. Italia. Pp. 202. <https://doi.org/10.1007/s10329-008-0106-1>.
- Alvarez, C. N. (2021). Estudios ecológicos y taxonómicos de los mosquitos (Diptera: culicidae) que crían en fitotelmata del nordeste argentino.
- Apumaita, J. M. D. R., Linares, M. A., Molina, G. A., Visintin, A. M., Rossi, G. C., Stein, M., ... & Almiron, W. R. (2023). Update of the geographical distribution and new records of the fauna of Culicidae (Diptera) of northwestern Argentina.
- Arnett, R. H. (1950). Notes on the distribution, habits, and habitats of some panama culicines (Diptera: Culicidae). *Journal of the New York Entomological Society*, 58(2), 99-115.
- Ayala, M. M., Muttis, E., Lizuain, A., Marti, G. A., Poklepovich, T., Campos, J., ... & Micieli, M. V. (2024). Barcoding of mosquito species considered potential vectors of Yellow fever virus in epidemiological risk areas of northeastern Argentina: Código de barras de especies de mosquitos consideradas potenciales vectores del virus de la fiebre amarilla en zonas de riesgo epidemiológico del noreste argentino. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 83(2), 94-99.
- Barajas, J., Suaza, J. D., Torres, C., Leon Rua, G., Uribe-Soto, S., & Porter, C. H. (2013). Mosquitos (Diptera: Culicidae) asociados a guadua en los municipios de Anserma, Hispania y Jardín, Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*, 39(1), 132-140.
- Belkin, J. N. (1962). The mosquitoes of the South Pacific (Diptera: Culicidae). Vol. 1 y 2. University of California Press. Berkeley and Los Angeles.
- Bergsten, J., Bilton, D.T., Fujisawa, T., Elliott, M., Monaghan, M.T., Balke, M., Hendrich, L., Geijer, J., Herrmann, J., Foster, N. G., Ribera, I., Nilsson, A. N., Barraclough, T. G., & Vogler, A.P. (2012). The effect of geographical scale of sampling on DNA barcoding. *Systematic Biology*, 61(5), 851-869.
- Bersot, M. I. L. (2014). Aspectos bionômicos de *Sabethes (Peytonulus) identicus* Dyar & Knab, 1907 (Diptera: Culicidae) em laboratório.

- Bersot, M. I. L., Vieira, G., De Moraes, J. R., Rocha Pereira, G., Albuquerque Motta, M., & Lourenço-De-Oliveira, R. (2023). Biological and behavioral features and colonization of the sylvatic mosquito *Sabethes identicus* (Diptera: Culicidae). *Plos one*, 18(12), e0296289.
- Bourke, B. P., J. E. Conn, T. M. P. de Oliveira, L. S. M. Chaves, E. S. Bergo, G. Z. Laporta, & Sallum, M. A. M. (2018). Exploring malaria vector diversity on the Amazon Frontier. *Malar. J.* 17: 342.
- Bourke, B. P., Oliveira, T. P., Suesdek, L., Bergo, E. S. & Sallum, M. A. (2013). A multi-locus approach to barcoding in the *Anopheles strodei* subgroup (Diptera: Culicidae). *Parasites Vectors* 6, 111.
- Brèthes, J. (1910). Dípteros nuevos ó poco conocidos de Sud-América. *Anales del Museo Nacional de Buenos Aires*, 20, 469–484.
- Brèthes, J. (1912). Los mosquitos de la República Argentina. *Boletín del Instituto Entomológico y de Patología Vegetal*, 1, 5–49.
- Brown, A. D. & Zunino, G. E. (1990). Dietary variability in *Cebus apella* in extreme habitats: evidence for adaptability. *Folia Primatologica*, 54:187-195.
- Bruniard E. D. (1975). El gran Chaco argentino. Un ensayo de interpretación geográfica. *Geografía*, Vol 4. Instituto de Geografía, Facultad de Humanidades, Universidad Nacional del Nordeste, Resistencia, 259 pp.
- Campos R. E. (2015). Phytotelmata colonization in bamboo (*Guadua* sp.) culms in northeast Argentina. *J Nat Hist*. DOI:10.1080/ 00222933. 2015.1091096.
- Campos R. E., Spinelli, G., Mogi, M. (2011). Culicidae and Ceratopogonidae (Diptera: Nematocera) inhabiting phytotelmata in Iguazú National Park, Misiones province, subtropical Argentina. *Rev Soc Entomol Argent*. 70: 111-118.
- Campos, R. E. & Maciá, A. (1998). Culicidae. In: Morrone, J. J. & Coscaron, S. (Eds), *Biodiversidad de Artrópodos Argentinos*. Ediciones SUR, La Plata, Argentina, pp. 291–303.
- Campos, R. E. & Zavortink, T. J. (2010). Description of the larva and pupa and redescription of the adults of *Isostomyia paranensis* (Brèthes) (Diptera: Culicidae). *Zootaxa*, 2689, 27–36.
- Campos, R. E., & Gleiser, R. M. (2016). Mosquitos que crían en microambientes acuáticos naturales.
- Cano, M. E., Marti, G. A., Balsalobre, A., Muttis, E., Bruno, E. A., Rossi, G., & Micieli, M. V. (2021). Database of *Sabethes* and *Haemagogus* (Diptera: Culicidae) in Argentina: sylvatic vectors of the yellow fever virus. *Journal of Medical Entomology*, 58(4), 1762-1770.
- Carnevali R. (2003). El Iberá y su entorno fitogeográfico. *EUDENE*, Corrientes, p. 112. Carpenter SR. 1982. Stem flow chemistry: effects on population dynamics of detritivorous mosquitoes in tree-hole ecosystems. *Oecologia*, 53:1–6.
- Causey, O. R., Shope, R. E. & Theiler, M. (1964). Isolation of St. Louis encephalitis virus from arthropods in Pará, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*, 13, 449.

- Chadee, D. D. (1986). Mosquitoes of Gaspar Grande Island, Trinidad, WI.
- Chan, A., L. P. Chiang, H. C. Hapuarachchi, C. H. Tan, S. C. Pang, R. Lee, K. S. Lee, L. C. Ng, & S. G. Lam-Phua. (2014). DNA barcoding: complementing morphological identification of mosquito species in Singapore. *Parasit. Vectors*. 7: 569.
- Chebez, J. C. (2005). Guía de las Reservas Naturales de la Argentina. Vol. 3. Editorial Albatros.
- Crespo, J. A. (1982). Ecología de la comunidad de mamíferos del Parque Nacional Iguazú, Misiones. *Revista Museo Argentino Ciencias Naturales, Ecología*, III 2:1 172.
- Cywinska, A., Hunter, F. F., Hebert, P. D. N. (2006). Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. *Med Vet Entomol*. 20, 413-424.
- Darsie, R. F. Jr. (1985). The mosquitoes of Argentina. Part I, keys for identification of adult females and fourth stage larvae in English and Spanish (Diptera, Culicidae). *Mosq Syst*. 17, 153-253.
- De Angelo, C. D. (2009). El Paisaje del Bosque Atlántico del Alto Paraná y sus efectos sobre la distribución y estructura poblacional del Jaguar (*Panthera onca*) y el Puma (*Puma concolor*). Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires.
- de Oliveira, C. H., Andrade, M. S., Campos, F. S., da C. Cardoso, J., Gonçalves-dos-Santos, M. E., Oliveira, R. S., ... & de Abreu, F. V. S. (2023). Yellow fever virus maintained by *Sabethes* mosquitoes during the dry season in Cerrado, a semiarid region of Brazil, in 2021. *Viruses*, 15(3), 757.
- de Rodaniche E. & Galindo, P. (1957). Isolation of Ilheus virus from *Sabethes chloropterus* captured in Guatemala in 1956, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 6 (4) (1957 Jul.) 686–687.
- Dégallier, N., Travassos da Rosa, A. P. A., Vasconcelos, P. F. C., Travassos da Rosa, E. S., Rodrigues, S. G., Sá Filho, G. C. & Travassos da Rosa, J. F. S. (1992). New entomological and virological data on the vectors of sylvatic yellow fever in Brazil. *Brazil. Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science*, 44, 136–142.
- Delgado-Serra, S., M. Viader, I. Ruiz-Arrondo, M. A. Miranda, C. Barceló, R. Bueno-Marí, L. M. Hernández-Triana, M. Miquel, K. Lester, J. A. Jurado-Rivera. (2020). Molecular characterization of mosquito diversity in the Balearic Islands. *J. Med. Entomol*. 58: 608–615.
- Dias, D. D. (2023). Fauna de Culicidae (Diptera: Culicomorpha) de um Fragmento Florestal no Município de Belém, Pará, Brasil.
- Duret, J. P. (1949). Lista de los mosquitos del Gran Buenos Aires. *Revista de Sanidad Militar de Argentina*, 48, 122–124.
- Duret, J. P. (1950). Lista de los mosquitos de La República Argentina (Diptera: Culicidae). *Revista Soc. Entomológ. Arg. (XIV)*, 297-318.
- Duret, J. P. (1951). Contribución al conocimiento de la distribución geográfica de los culicidos argentinos (Diptera: Culicidae). *Rev. San Mil. Arg. Parte IV. Tribu Sabethini*. 50(3), 372-388.

- Edgar, R. C. (2004). muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32, 1792–1797.
- Edwards, F. W. (1932). *Genera Insectorum. Diptera. Fam. Culicidae, Fascicle 194*, Bruselas, Bélgica. Ed. Desmet-Verteneuil, 258 pp
- Eibl, B., Montagnini, F., Fernandez, R., Kozarik, J.C., Nozzi, D., & Luppi, A. (1999). Sistemas agroforestales con *Ilex paraguariensis* (yerba mate) y árboles maderables nativos en pequeñas propiedades en Misiones Argentina. In: *Primeras Jornadas de Trabajo Sobre Ecología de Especies Nativas de la Selva Subtropical Misionera*: Montagnini, F. Universidad Nacional de Misiones 27–32.
- Fang, Y., Shi, W. Q., & Zhang, Y. (2017). Molecular phylogeny of *Anopheles hyrcanus* group (Diptera: Culicidae) based on mtDNA COI. *Infectious Diseases of Poverty*, 6, 1-10.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3, 294–299.
- Forattini O. P. (1965). *Entomologia Médica*, vol. 3, Universidade de Sao Paulo: Sao Paulo
- Forattini, O. P. (2002). *Culicidologia Médica*. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo Press.
- Forattini, O. P., Leon, P. M., Rabello, E. X. (1965). Notas sobre Culicidae (Diptera). 9 - A respeito de algumas espécies de *Sabethes*. *Studia Ent.* 8, 449-467.
- Foster, P. G., Bergo, E. S., Bourke, B. P., Oliveira, T. M., Nagaki, S. S., Sant'Ana, D. C., & Sallum, M. A. M. (2013). Phylogenetic analysis and DNA-based species confirmation in *Anopheles* (*Nyssorhynchus*). *PLoS One*, 8(2), e54063.
- García, M. & Casal, H. (1965). Culicidae (Diptera) del Delta del Parana. II. Apuntes sistemáticos y biológicos. *Delta del Paraná*, 5(8), 5-16, illus.
- García, M. (1959). Sobre la anatomía faríngea de algunos Sabethini (Dipt. Culic.). *Primeras Jornadas Entomoepidemiológicas Argentinas. Tercera Sesión Científica*. 455-457.
- Goenaga, S., Fabri, C., Duenas, J. C. R., Gardenal, C. N., Rossi, G. C., Calderon, G., Morales, M. A., Garcia, J. B., Enria, D. A. & Levis, S. (2012). Isolation of yellow fever virus from mosquitoes in Misiones province, Argentina. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 12, 986–993. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0730>
- Gomez, A. D. C., Torres, M. A. N., Paula, M. B. D., Fernandes, A., Marassá, A. M., Consales, C. A., & Fonseca, D. F. (2010). Ecologia de *Haemagogus* e *Sabethes* (Diptera: Culicidae) em áreas epizooticas do vírus da febre amarela, Rio Grande do Sul, Brasil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 19(2), 101-113.
- Gravina, H. D., Suzukawa, A. A., Zanluca, C., Segovia, F. M. C., Tschá, M. K., da Silva, A. M., ... & Dos Santos, C. N. D. (2019). Identification of insect-specific flaviviruses in areas of Brazil and Paraguay experiencing endemic arbovirus transmission and the description of a novel flavivirus infecting *Sabethes belisarioi*. *Virology*, 527, 98-106.

- Guimarães, A. E., Arlé, M., & Machado, R. N. M. (1985). Mosquitos no Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Estado do Rio de Janeiro, Brasil: II. Distribuição vertical. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 80, 171-185.
- Hall, R. A., Scherret, J. H., Sedlak, P., Poidinger, M., Mackenzie, J. S. (1999). Isolation of homologous arbovirus cultures from heterologous mixtures using limit dilution and virus-specific enzyme immunoassays. *J. Virol. Methods* 83(1–2), 189–92
- Hanley, K. A., Monath, T. P., Weaver, S. C., Rossi, S. L., Richman, R. L., & Vasilakis, N. (2013). Fever versus fever: the role of host and vector susceptibility and interspecific competition in shaping the current and future distributions of the sylvatic cycles of dengue virus and yellow fever virus. *Infection, Genetics and Evolution*, 19, 292-311.
- Harbach, R. E. & Howard, T. M. (2007). Corrections in the status and rank of names used to denote varietal forms of mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Zootaxa*. 1542, 35–48.
- Harbach, R. E. & Kitching, I. J. (1998). Phylogeny and classification of the Culicidae (Diptera). *Syst Entomol.* 23: 327-370
- Harbach, R. E. & Knight, K. L. (1980) Taxonomists glossary of mosquito anatomy. Plexus Publishing, Inc., Marlton, New Jersey, xi + 413 pp.
- Harbach, R. E. (2013). Mosquito Taxonomic Inventory. URL: mosquitotaxonomic-inventory.info.
- Hebert, P. D., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H. & Hallwachs, W. (2004). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 14812–14817.
- Hendrich, L., Pons, J., Ribera, I. & Balke, M. (2010). Mitochondrial cox1 sequence data reliably uncover patterns of insect diversity but suffer from high lineage-idiosyncratic error rates. *Plos One*. 5, e14448.
- Holzmann, I. (2012). Distribución geográfica potencial y comportamiento vocal de dos especies de mono aullador (*Alouatta guariba clamitans* y *Alouatta caraya*) (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).
- Huaman Quispe, E. J. (2022). Caracterización ambiental de los criaderos larvales y entomofauna culícida (Insecta: Diptera) de importancia médica. Canayre (Huanta-Ayacucho), 2020.
- Huang, Y. M., & Rueda, L. M. (2014). A pictorial key to the species of *Aedes* (*Ochlerotatus* and *Coetzeomyia*) in the Afrotropical Region (Diptera: Culicidae). *Zootaxa*, 3754(5), 592-600.
- INDEC. (2022). National Census of Population, Homes and Housing 2022. National Nomenclator of Circulation Roads.
- Judd, D. D. (1996). Review of the systematics and phylogenetics relationships of the Sabethini (Diptera: Culicidae). *Syst. Entomol.* 21, 129-150.

- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(2), 111–120. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>
- Kumar, N. P., Rajavel, R. A., Natarajan, R., Jambulingam, P. (2007). DNA Barcodes Can Distinguish Species of Indian Mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 44 (1), 01–07. Doi: <https://doi.org/10.1093/jmedent/41.5.01>
- Lane, J. (1953). Neotropical Culicidae. Vol. I, II. Universidade de São Paulo, Brasil. 1112 pp.
- Laurito, M., Ayala, A. M., Arias Builes, D. L., Almirón, W. R. (2022). Improving the DNA Barcode Library of Mosquito Species with New Identifications and Discoveries in North-Central Argentina; Entomological Society of America; *Journal of Medical Entomology*; 59, 1, 18-10-2021, 173-183
- Laurito, M., Oliveira, T. M. D., Almiron, W. R., & Sallum, M. A. M. (2013). COI barcode versus morphological identification of *Culex* (*Culex*) (Diptera: Culicidae) species: a case study using samples from Argentina and Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(suppl 1), 110-122.
- Ligier, H. D. (2000). Caracterización geomorfológica y edáfica de la provincia de Misiones. Fundación Vida Silvestre Argentina, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Corrientes, Argentina.
- Manso Hernández, N., Casertano, S. A., Garibald, J. F., Barrios Caro, L. X., Herrera, Jr. & Correa, F. (2010). Plan de Manejo del Parque Provincial Puerto Península. Planificación de las Áreas Protegidas del Núcleo Norte de la Provincia de Misiones. Proyecto Araucaria XXI. AECID-APN MERNRyT de Misiones, Inédito, 186 p.
- Márquez-Luna, J., Manríquez-Morán, N. L., Castillo-Cerón, J. M., & Goyenechea, I. (2022). Colecciones entomológicas: importancia y problemática. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*, (86).
- Marti, G. A., Micieli, M. V., Maciá, A., Lounibos, L. P. & Garcia, J. J. (2007). Seasonality, abundance and autogeny of the mosquito *Isostomyia paranensis* from phytotelmata in temperate Argentina. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 23, 252–258.
- Molina, J. A., Hildebrand, P., Olano, V. A., Muñoz de Hoyos, P., Barreto, M. & Guhl, F. (2000). Fauna de insectos hematófagos del sur del Parque Natural Nacional Chiribiquete, Caquetá, Colombia. *Biomédica*, 20, 314–326. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v20i4.1075>
- Müller, G. A. (2008). Culicídeos associados a internódios de bambu, com ênfase em *Sabethes aurescens* (Diptera, Culicidae), na Mata Atlântica, Santa Catarina, Brasil.
- Navarro, J. C. & Weaver, S. C. (2004). Molecular phylogeny of the Vomerifer and Pedroi groups in the Spissipes Section of the subgenus *Culex* (*Melanoconion*). *Journal of Medical Entomology*. 41, 575 - 581.
- Nei, M., & Kumar, S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press. <https://books.google.com.mx/books?id=hcPSag2pn9IC>

- Neves, M. S. A. S., Motta, M. A., Maciel-de-Freitas, R., Xavier, A. D. S., Lourenco-de-Oliveira, R., & Silva-do-Nascimento, T. F. (2024). Illustrated identification key to females of the genus *Sabethes* Robineau-Desvoidy recorded from Brazil (Diptera: Culicidae), in dichotomous and interactive formats, including an updated list of species and new records for the states. *Zootaxa*, 5406 (2), 253-287.
- Normark, B. B. & A. A. Lanteri. (1998). Incongruence between morphological and mitochondrial DNA characters suggests hybrid origins of parthenogenetic weevil lineages (genus *Aramigus*). *Syst. Biol.* 47(3): 475-494.
- OPS. (2023). Actualización Epidemiológica Fiebre amarilla en la Región de las Américas.
- Oyarzabal, M., Clavijo, J., Oakley, L., Biganzoli, F., Tognetti, P., Barberis, I., & Oesterhel, M. (2018). Vegetation units of Argentina. *Ecología Austral* 28 (01), 040–063.
- Pecor, J. E., Harbach, R. E., Peyton, E. L., Roberts, D. R., Rejmankova, E., Manguin, S., & Palanko, J. (2002). Mosquito studies in Belize, Central America: records, taxonomic notes, and a checklist of species. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 18(4), 241-276.
- Peel, M. C., Finlayson, B. L., & McMahon, T. A. (2007). Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. *Hydrology and Earth System Sciences*, 11(5), 1633–1644. <https://doi.org/10.5194/HESS-11-1633-2007>
- Petrocchi, J. (1929). Estado actual de la sistemática de los Culicinae (mosquitos) en la República Argentina. Enumeración de especies. *Revta. Inst. Bact.*, Buenos Aires 3, 83-93.
- Pinto, C. S., Confalonieri, U. E., & Mascarenhas, B. M. (2009). Ecology of *Haemagogus* sp. and *Sabethes* sp. (Diptera: Culicidae) in relation to the microclimates of the Caxiuanã National Forest, Pará, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 592-598.
- Prosen, A. F., Martinez A. & Carcavallo, R. U. (1960). La familia Culicidae (Diptera) en la ribera fluvial de la Provincia de Buenos Aires. *Anales del Instituto de Medicina Regional (Univ. Noreste)*, 5, 101–113.
- Rathnayake, R. A. S., Wedage, W. M. M., Muthukumarana, L. S., & De Silva, B. G. D. N. K. (2023). Genetic diversity, phylogenetic and phylogeographic analysis of *Anopheles culicifacies* species complex using ITS2 and COI sequences. *Plos one*, 18(8), e0290178.
- Reinert, J. F., Harbach, R. E., Kitching, I. J. (2004). Phylogeny and classification of Aedini (Diptera: Culicidae), based on morphological characters of all life stages. *Zool. J. Linn. Soc.*, 142, 289–368.
- Roberts, D. R., Hoch, A. L., Peterson, E. M. & Pinheiro, F. P. (1981). Programa multidisciplinario de vigilancia de las enfermedades infecciosas en zonas colindantes con la carretera transamazónica en Brasil. IV. Estudio entomológico. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*, 91, 379–400.
- Roberts, D. R., Peyton, E. L., Pinheiro, F. D. P., Balderrama, F., & Vargas, R. (1985). Asociación de vectores de arbovirus con galerías arbóreas y el medio doméstico en el sureste de Bolivia. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana (OSP)*; 98 (5).

- Rodriguero, M. S., Confalonieri, V. A., Guedes, J. V. C., Lanteri, A. A. (2010). *Wolbachia* infection in the tribe Naupactini: Association between *telytokous* pathenogenesis and infection status. *Insect Molecular Biology*, 18, 599-705.
- Ronderos, R. A., Schnaci, L. A. & Macia, A. (1992). Composición y variación estacional de una taxocenosis de Culicidae del ecotono subtropical pampásico (Insecta: Diptera). *Grael/sia* 48, 3-8.
- Rossi, G. C. (2015). Annotated checklist, distribution, and taxonomic bibliography of the mosquitoes (Insecta: Diptera: Culicidae) of Argentina. *Check List*. 11, 1712.
- Rozo-López, P. & Mengual, X. (2015). Updated list of the mosquitoes of Colombia (Diptera: Culicidae). *Biodiversity Data Journal*, 3, e4567. <https://doi.org/10.3897/BDJ.3.e4567>
- Ruiz-Lopez, F., Wilkerson, R. C., Conn, J. E., McKeon, S., Levin, D. M., Quiñones, M. L., Póvoa, M. M., Linton, Y. (2012). DNA barcoding reveals both known and novel taxa in the Albitarsis Group (*Anopheles*: *Nyssorhynchus*) of Neotropical malaria vectors. *Parasit Vectors*. 5,1.
- Sá, D. N. D. (2023). Paisagens construídas: a floresta com araucárias na fronteira entre Argentina e Brasil (1895-2000).
- Saeung, A., Baimai, V., Otsuka, Y., Rattanarithikul, R., Somboon, P., Junkum, A., ... & Choochote, W. (2008). Molecular and cytogenetic evidence of three sibling species of the *Anopheles barbirostris* Form A (Diptera: Culicidae) in Thailand. *Parasitology Research*, 102, 499-507.
- Shannon, R. C. & Del Ponte, E. (1928). Los culícidos en la Argentina. *Revista del Instituto Bacteriológico*, Buenos Aires 5 (1): 29-140.
- Shannon, R. C. (1930). List of species of Argentine Culicidae. *Sexta Reunión de la Sociedad Argentina de Patología Regional del Norte*: 494-500.
- Sikes, D. S., Bowser, M., Morton, J. M., Bickford, C., Meierotto, S. & Hildebrandt, K. (2017). Building a DNA barcode library of Alaska's nonmarine arthropods. *Genome*. 60, 248–259.
- Simmons, J. E., & Muñoz-Saba, Y. (Eds.). (2005). Cuidado, manejo y conservación de las colecciones biológicas (pp. 288-288). Bogotá DC, Colombia: Univesidad Nacional de Colombia.
- Stanzani, L. M. D. A., Motta, M. D. A., Erbisti, R. S., Abreu, F. V. S. D., Nascimento-Pereira, A. C., Ferreira-de-Brito, A., ... & Lourenço-de-Oliveira, R. (2022). Back to Where It Was First Described: Vectors of Sylvatic Yellow Fever Transmission in the 2017 Outbreak in Espírito Santo, Brazil. *Viruses*, 14(12), 2805.
- Stein, M., Álvarez, C. N., Alonso, A. C., Bangher, D. N., Willener, J. A., Campos, R. E. (2018). New records of mosquitoes (Diptera: Culicidae) found in phytotelmata in Northern Argentina. *Zootaxa*. 4399 (1), 87–100
- Stein, M., Bangher, D. N., Santos Neves, M. S. A., Álvarez, C. N. (2020). Redescription of the female, male, larva and pupa of *Sabethes* (*Sabethoides*) *glaucodaemon* (Dyar & Shannon) (Diptera: Culicidae) and description of the female genitalia. *Zootaxa*. 4789 (2), 589–600.

- Stein, M., Hoyos, C. B., Oria, G. I., Bangher, D., Weinberg, D., Almirón, W. R. (2012). New records of mosquito species (Diptera: Culicidae) for the provinces of Chaco and Formosa, Argentina. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 28 (4), 307-308.
- Stein, M., Laurito, M., Rossi, G. C., Almirón, W. R. (2009). Morphological description of the pupa and fourth-stage larva and redescription of the adults of *Psorophora* (*Psorophora*) *pallescens* Edwards (Diptera: Culicidae). *Zootaxa*. 2306, 51-58.
- Stein, M., Rossi, G. C., Almirón, W. R. (2013). Morphological description of male pupa and larva of *Psorophora* (*Grabhamia*) *paulli* and redescription of female (Diptera: Culicidae). *Zootaxa*. 3686, 389-395.
- Suárez, O., Navarro, J. C., & Montañez, H. (1994). New records of mosquitoes (Diptera: Culicidae) for the state of Zulia, one of which is new for Venezuela.
- Tamura, K., Stecher G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38:3022-3027
- Telles-de-Deus, J., de Oliveira Guimarães, L., Rocha, E. C., Helfstein, V. C., Reginato, S. L., Mucci, L. F., ... & Kirchgatter, K. (2024). COI DNA barcoding to differentiate *Haemagogus janthinomys* and *Haemagogus capricornii* (Diptera: Culicidae) mosquitoes. *Acta Tropica*, 259, 107377.
- Vasconcelos, P. F., Rodrigues, S. G., Degallier, N., Moraes, M. A., da Rosa, J. F., da Rosa, E. S., Mondet, B., Barros, V. L. & da Rosa, A. P. (1997). An epidemic of sylvatic yellow fever in southeast region of Maranhão State, Brazil, 1993–1994. Epidemiological and entomological findings. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene*, 57, 132–137. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1997.57.132>
- Visintin, A. M., Laurito, M., Stein, M., Ramírez, P., Molina, G., Lorenzo, P. R., Almirón, W. R. (2010). Two new mosquito species and six new provincial records in Argentina. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 26 (1), 91-94.
- Wang, G., Li, C., Guo, X., Xing, D., Dong, Y., Wang, Z., Zhang, Y., Liu, M., Zheng, Z., Zhang, H., Zhu, X., Wu, Z., Zhao, T. (2012). Identifying the main mosquito species in China based on DNA barcoding. *Plos One*. 7, e47051.
- Wanzeller, A. L. M., Martins, L. C., Diniz Júnior, J. A. P., de Almeida Medeiros, D. B., Cardoso, J. F., da Silva, D. E., ... & Vasconcelos, P. F. (2014). Xiburema virus, a hitherto undescribed virus within the family Rhabdoviridae isolated in the Brazilian Amazon Region. *Genome announcements*, 2(3), 10-1128.
- Wilkerson, R. C., Linton, Y. M. & Strickman, D. (2021). Mosquitoes of the world. Vols. 1 & 2. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland, 1332 pp. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04848-6>
- Zequi, J. A. C., & Lopes, J. (2001). Culicidaeofauna (Diptera) encontrada em entrenós de taquara de uma mata residual na área urbana de Londrina, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 18, 429-438.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla S1. Lista de especies del género *Sabethes* registradas en Argentina, localidad tipo y distribución.

Especie	Subgénero	Localidad tipo	Localidad o Provincia
<i>Sabethes albiprivus</i> (Theobald, 1903)	<i>Sabethes</i>	São Paulo, Brasil	Formosa, Misiones, Corrientes, Jujuy y Salta.
<i>Sabethes aurescens</i> (Lutz, 1905)	<i>Peytonulus</i>	Cantareira, São Paulo, Brasil	Misiones y Corrientes.
<i>Sabethes belisarioi</i> (Neiva, 1908)	<i>Sabethes</i>	Rio do Bicudo, Corinto, Minas Gerais, Brasil	Misiones y Corrientes
<i>Sabethes chloropterus</i> (von Humboldt, 1819)	<i>Sabethoides</i>	Rio Guayas, cerca de Bordan, Ecuador	Misiones, Salta y Santa Fe.
<i>Sabethes cyaneus</i> (Fabricius, 1805)	<i>Sabethes</i>	Cayena, Guayana Francesa	Formosa y Misiones
<i>Sabethes glaucodaemon</i> (Dyar & Shannon, 1925)	<i>Sabethoides</i>	Rio Branco, cerca de su desembocadura en el río Negro, estado de Roraima, Brasil	Misiones.
<i>Sabethes identicus</i> (Dyar y Knab, 1907)	<i>Peytonulus</i>	Tabernilla, Zona del Canal, Panamá	Misiones, Corrientes y Salta.
<i>Sabethes intermedius</i> (Lutz, 1904)	<i>Sabethinus</i>	Cerca de São Paulo, São Paulo, Brasil	Misiones y Corrientes.
<i>Sabethes melanonymphe</i> (Dyar, 1924)	<i>Sabethinus</i>	Cantareira, São Paulo, Brasil	Chaco, Misiones, Jujuy y Salta.
<i>Sabethes petrocchiai</i> (Shannon y Del Ponte, 1927)	<i>Davisomyia</i>	Raco, Tucumán, Argentina	Formosa, Misiones, Salta, Jujuy y Tucuman.
<i>Sabethes purpureus</i> (Theobald, 1907)	<i>Sabethes</i>	Rio de Janeiro, Brasil	Misiones, Salta y Santa Fe.
<i>Sabethes soperi</i> (Lane y Cerqueira, 1942)	<i>Peytonulus</i>	Tinguá, Nova Iguaçu, Río de Janeiro, Brasil	Misiones.
<i>Sabethes undosus</i> (Coquillett, 1906)	<i>Peytonulus</i>	Trinidad, Trinidad y Tobago	Chaco, Misiones y Corrientes.



Figura 1S. Extracción de ADN mediante macerador de polipropileno y kit comercial.

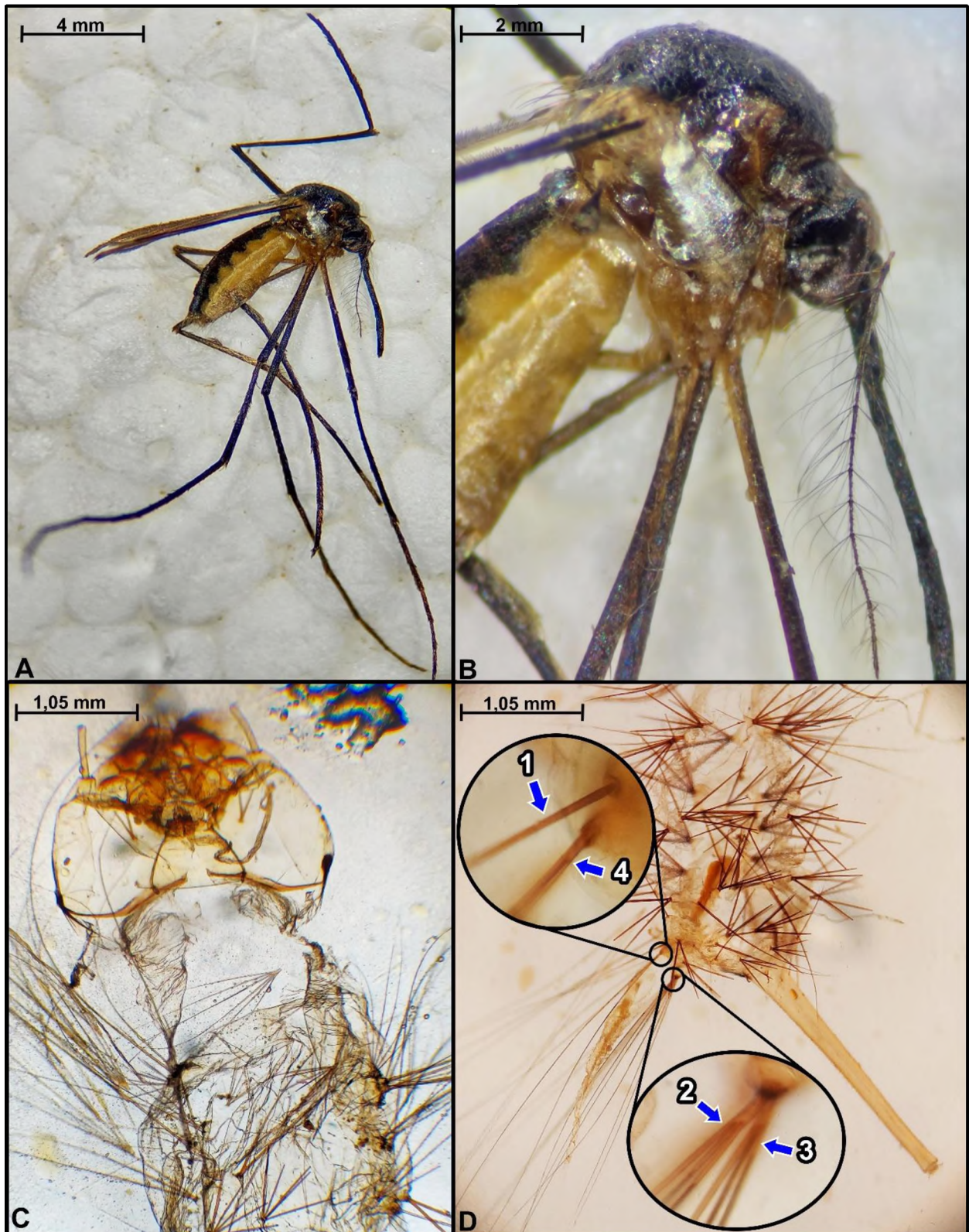


Figura 2S. *Sabethes aurescens*. (A) Aspecto general del adulto hembra; (B) Tórax, vista lateral. *Larva estadio IV*: (C) Cabeza, vista dorsal; (D) Sifón y segmento X, vista dorsal, insertado: mayor definición de cerdas del segmento X.

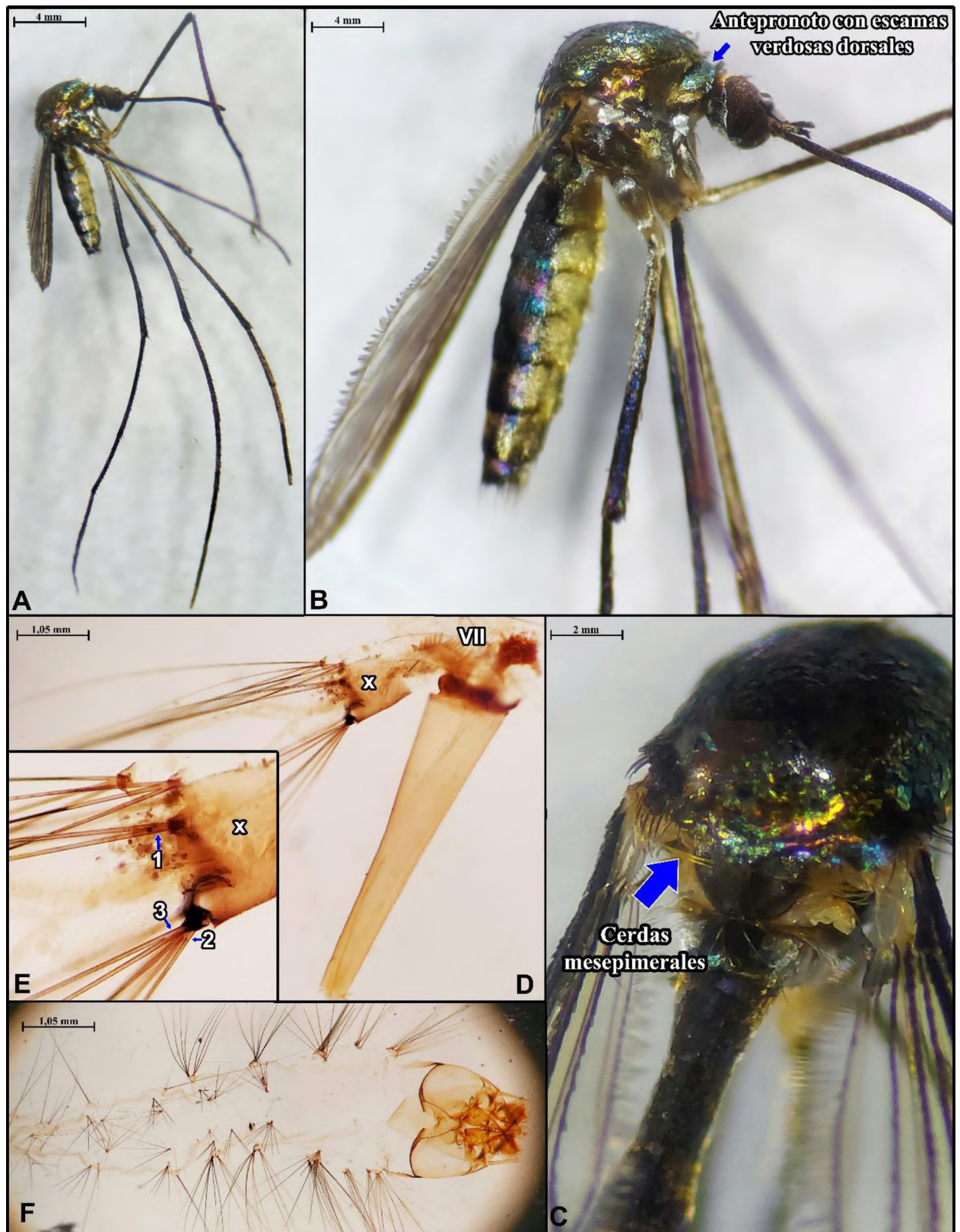


Figura 3S. *Sabethes glaucodaemon*. (A) Aspecto general del adulto macho; (B) Tórax y abdomen, vista lateral; (C) Cerdas mesepimerales superiores. *Larva estadio IV*: (D) Sifón y segmento X, vista dorsal; (E) Mayor aumento del segmento X; (F) Aspecto general de la larva, vista dorsal.

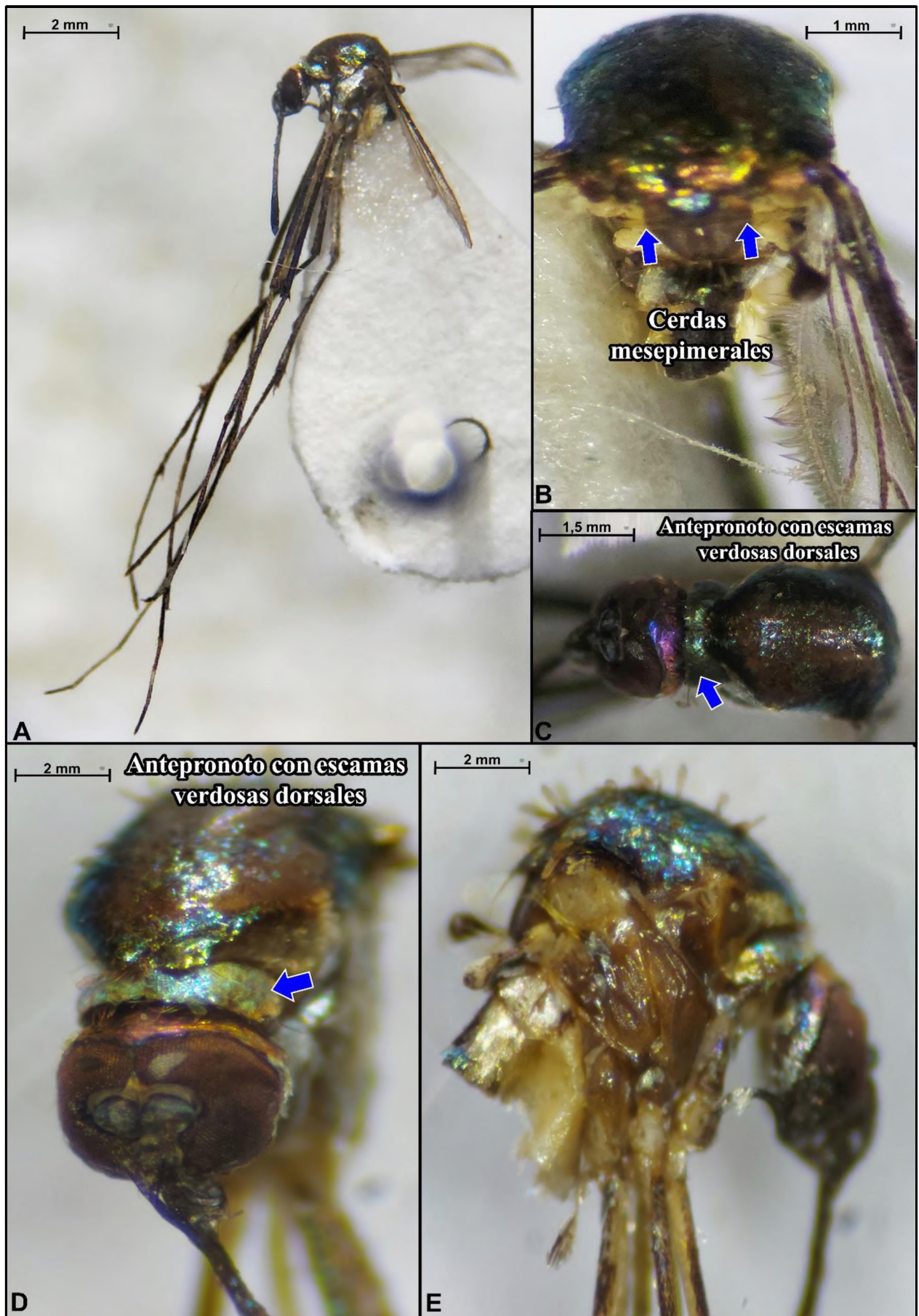


Figura 4S. *Sabethes glaucodaemon*. (A) Aspecto general del adulto macho; (B) Cerdas mesepimerales superiores; (C-D) Escuto y antepronoto, vista dorsal; (E) Tórax, vista lateral.

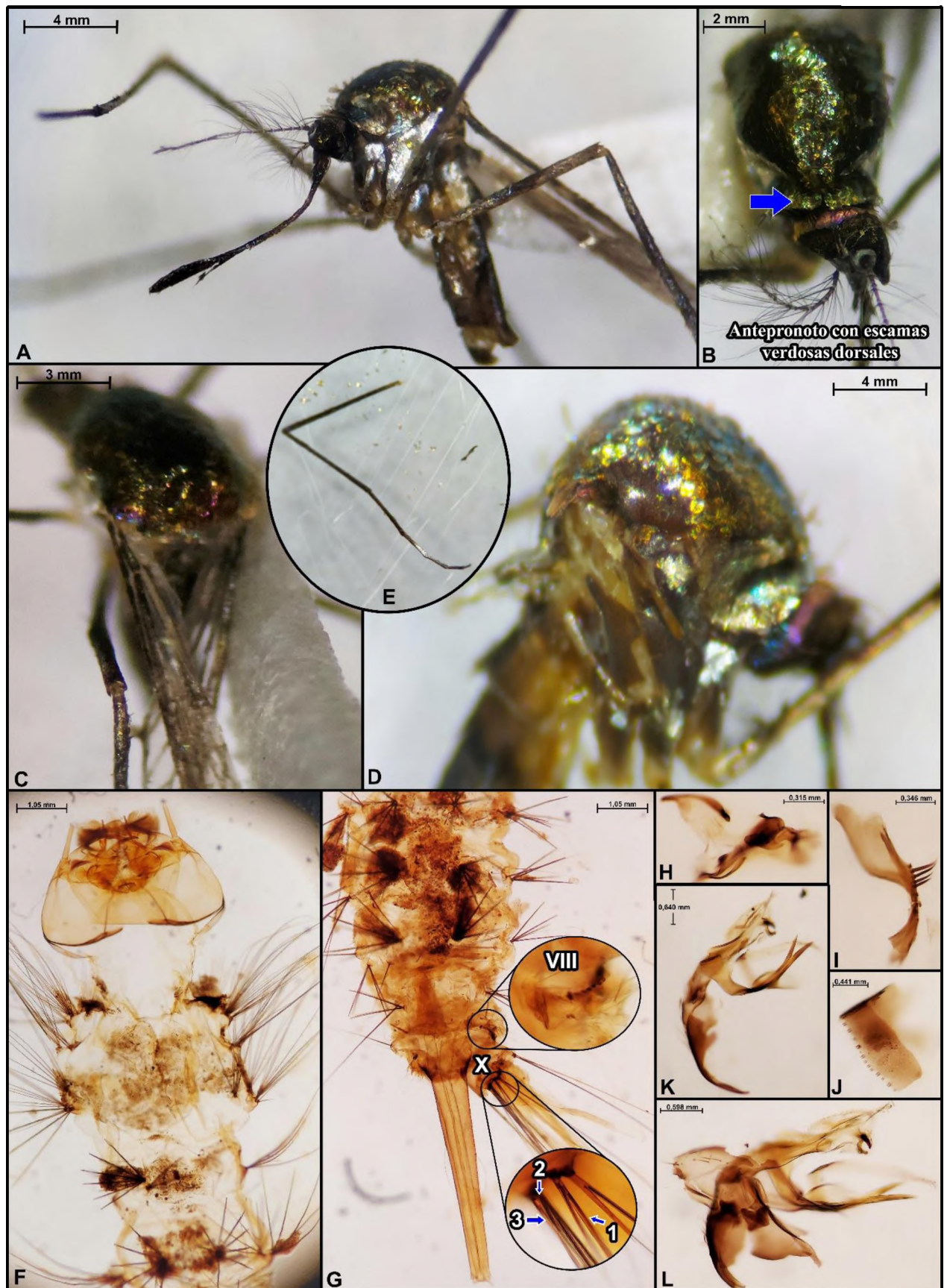


Figura 5S. *Sabethes glaucodaemon*. (A) Aspecto general del adulto macho; (B) Escuto y antepronoto, vista dorsal; (C) Escuto, vista dorso-posterior; (D) Tórax, vista lateral; (E) Pata, vista lateral. *Larva estadio IV*: (F) Cabeza, vista dorsal; (G) Sifón y segmento X, vista dorsal, insertado: mayor aumento de los segmentos X y VIII. *Genitalia masculina*: (H) Adeago; (I) Esterno IX; (J) Esterno VIII; (K-L) Gonocoxito y gonostilo.

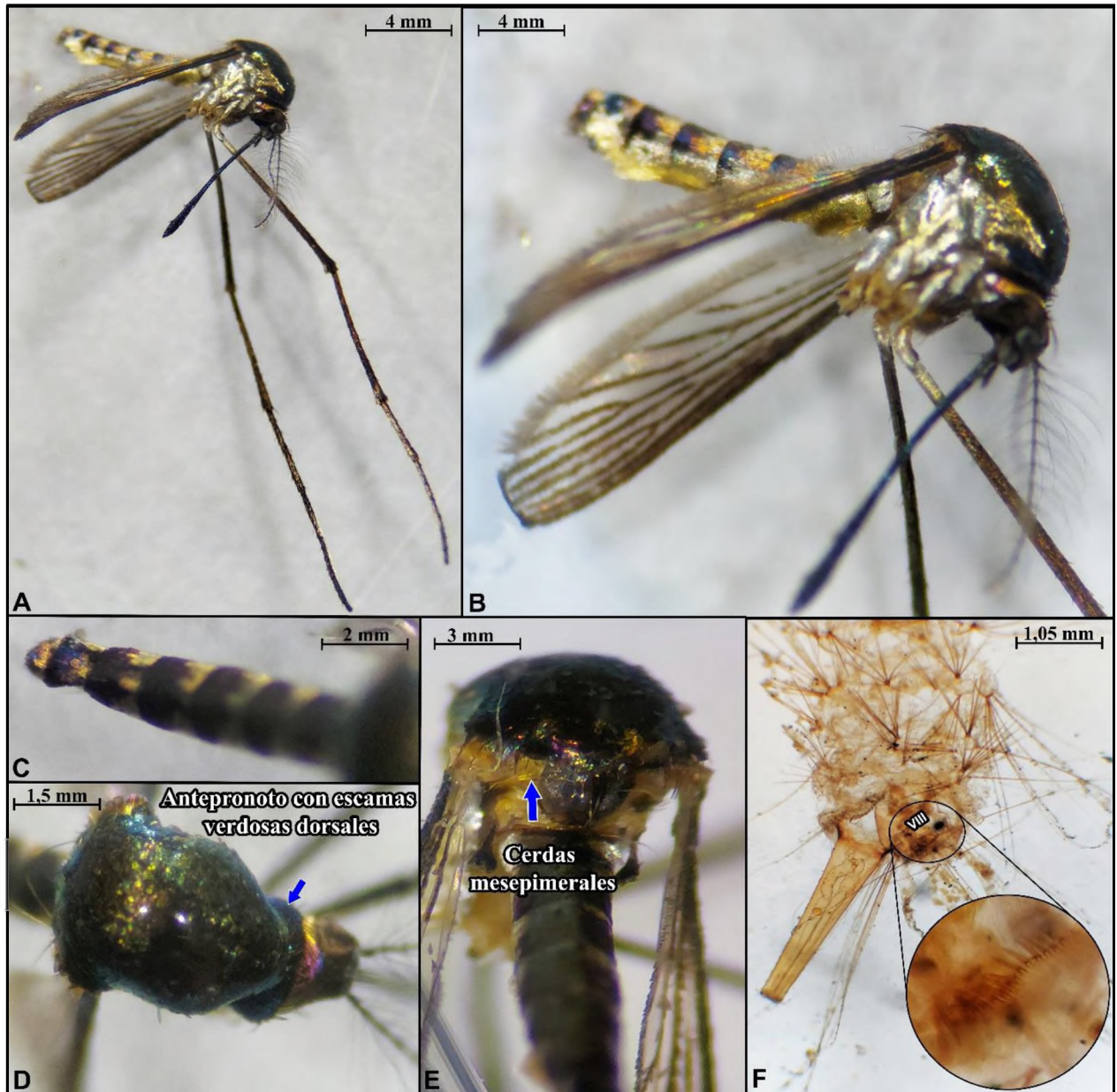


Figura 6S. *Sabethes glaucodaemon*. (A) Aspecto general del adulto macho; (B) Tórax y abdomen, vista lateral; (C) Abdomen, vista dorsal; (D) Escuto y antepronoto, vista dorsal; (E) Cerdas mesepimerales superiores. *Larva estadio IV*: (F) Sifón y segmento VIII, vista dorsal, insertado: mayor aumento del segmento VIII.



Figura 7S. *Sabethes glaucodaemon*. (A) Aspecto general del adulto macho; (B) Tórax y abdomen, vista lateral; (C-D) Escuto y antepronoto, vista dorsal; (E) Ala, vista dorsal.

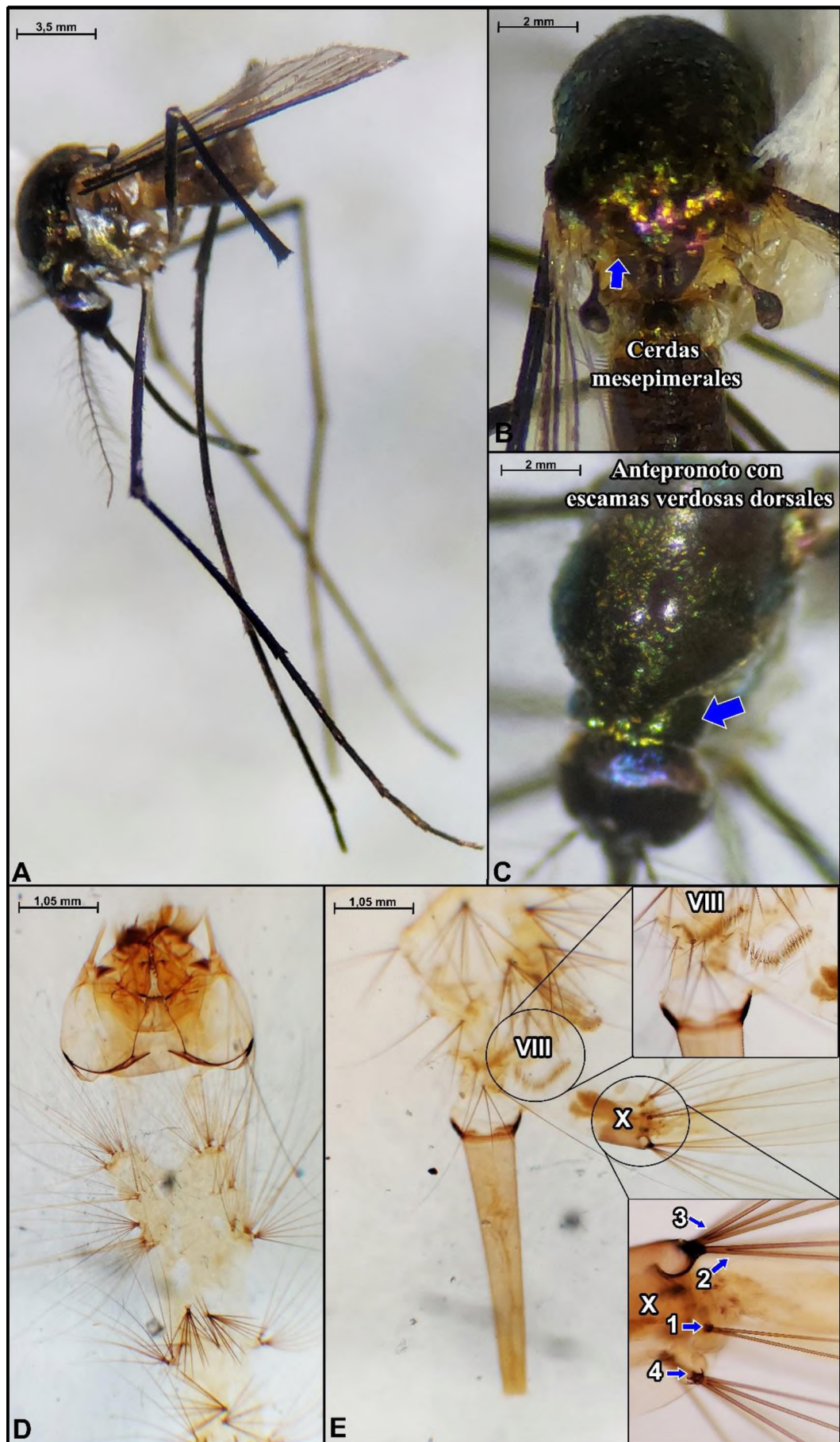


Figura 8S. *Sabethes glaucodaemon*. (A) Aspecto general del adulto macho; (B) Cerdas mesepimerales superiores; (C) Escuto y antepronoto, vista dorsal. Larva estadio IV: (D) Cabeza, vista dorsal; (E) Sifón y segmento X, vista dorsal, insertado: mayor aumento de los segmentos X y VIII.

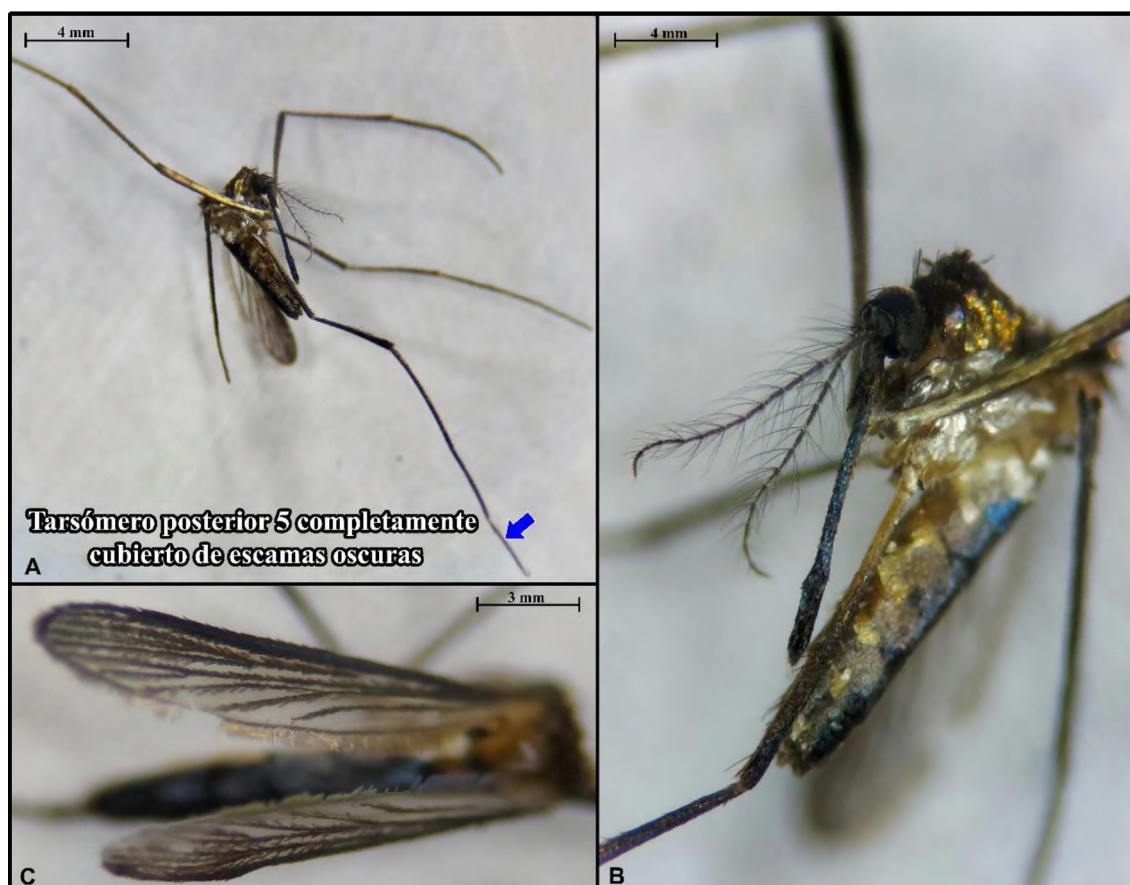


Figura 9S. *Sabethes identicus*. (A-B) Aspecto general del adulto hembra; (C) Alas, vista dorsal.

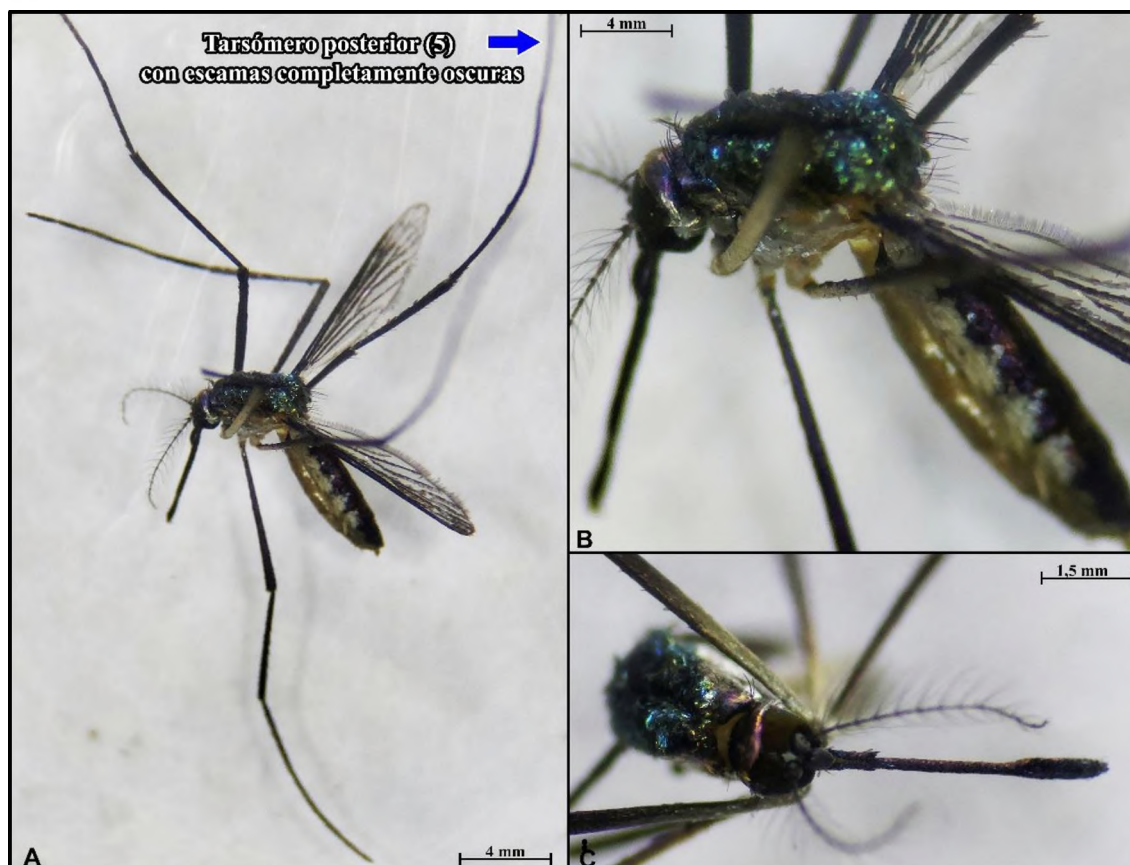


Figura 10S. *Sabethes identicus*. (A) Aspecto general del adulto macho; (B) Tórax y abdomen, vista lateral; (C) Cabeza, vista dorsal.

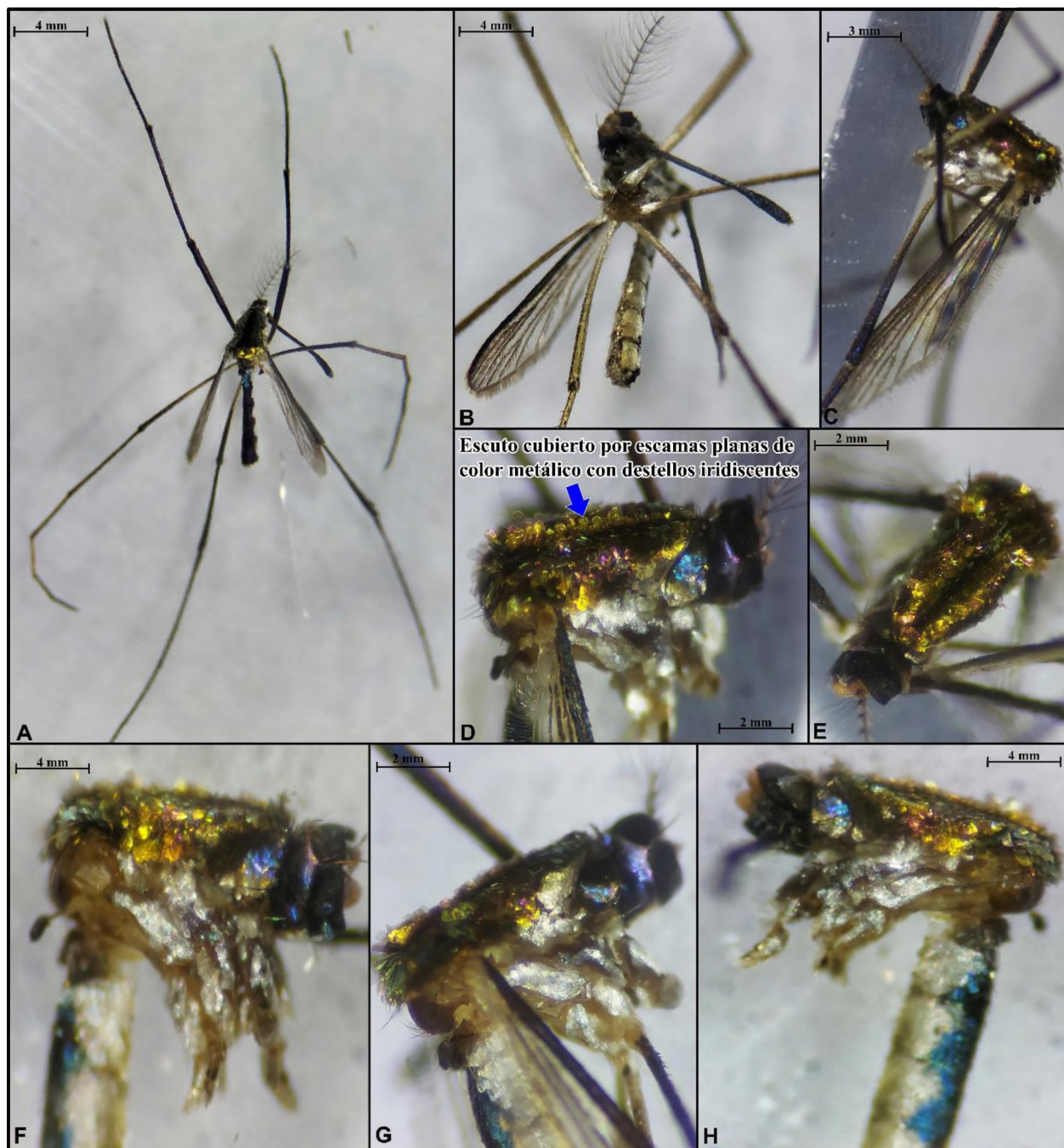


Figura 11S. *Sabethes* sp. 1 (A) Aspecto general del adulto macho; (B) Abdomen, vista ventral; (C) Tórax, vista lateral; (D) Escuto y antepronoto, vista lateral; (E) Escuto y antepronoto, vista dorsal; (F-H) Tórax, vista lateral.

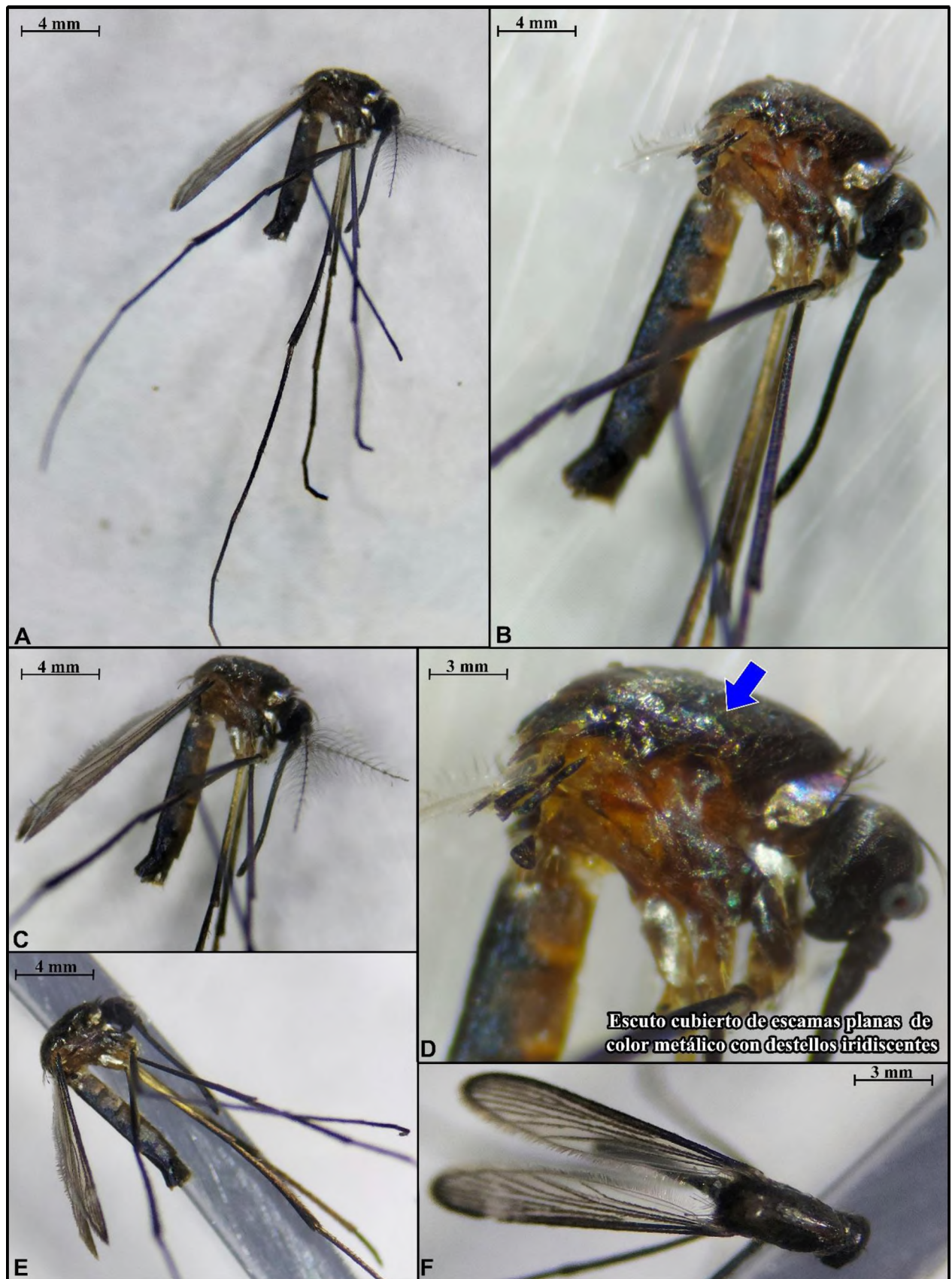


Figura 12S. *Sabethes* sp.1 (A) Aspecto general del adulto macho; (B-C, E) Tórax y abdomen, vista lateral; (D) Tórax y escuto, vista lateral; (F) Alas, vista dorsal.

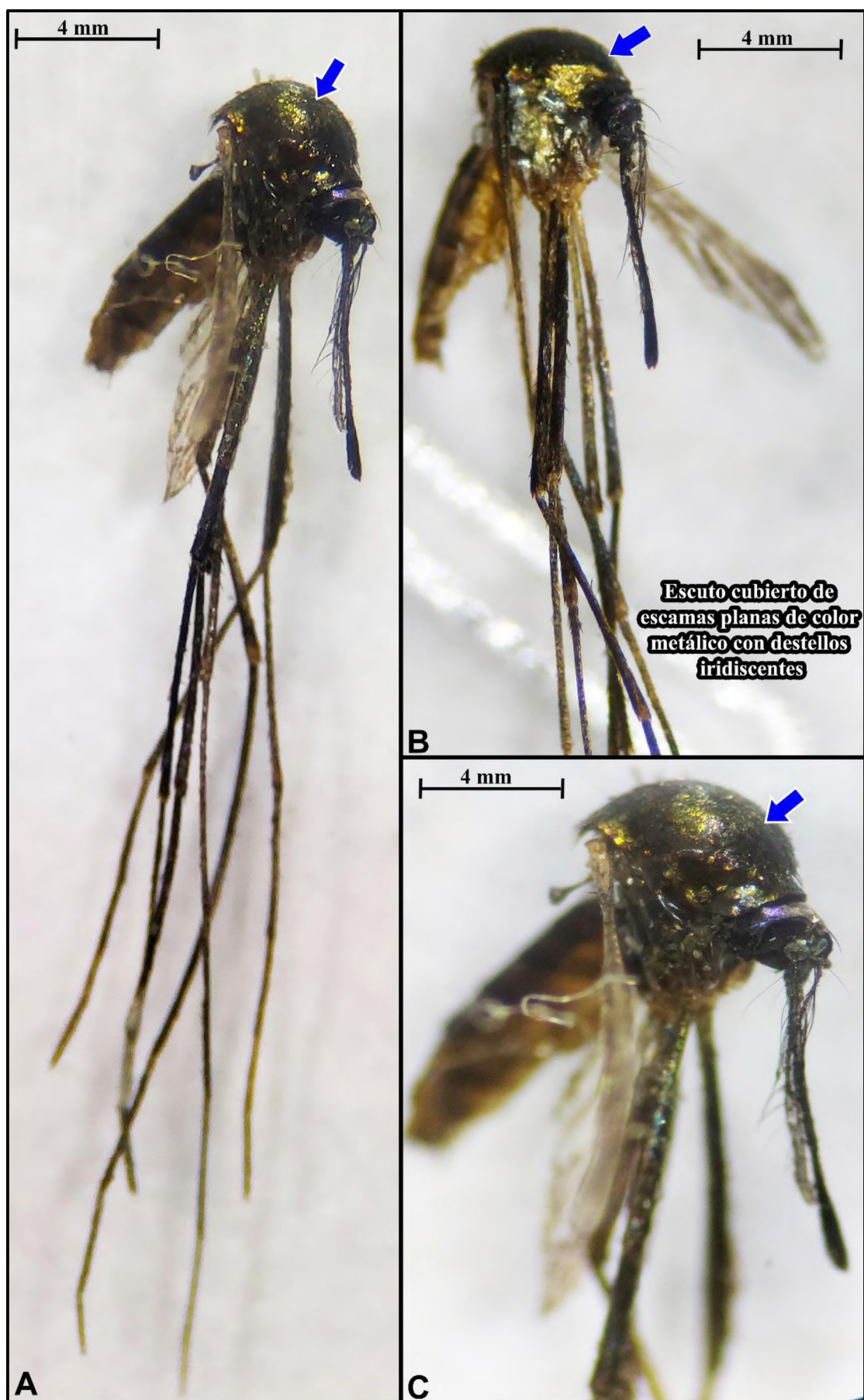


Figura 13S. *Sabethes* sp. 1 (A-B) Aspecto general del adulto macho; (C) Escuto, vista lateral.

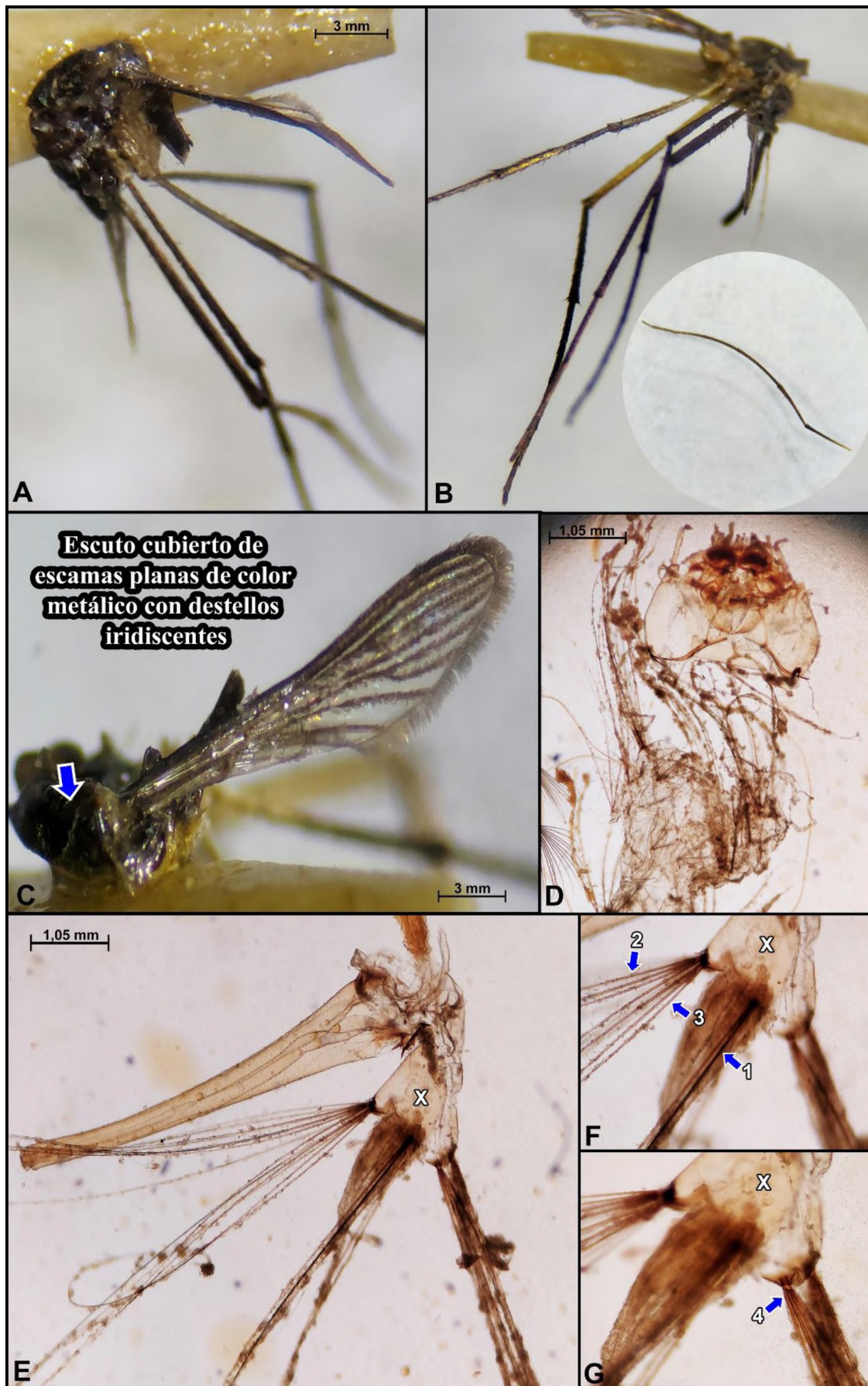


Figura 14S. *Sabethes* sp. 1 (A) Aspecto general del adulto macho; (B) Patas, vista ventral, insertado: pata completa; (C) Ala derecha, vista dorsal. Larva estadio IV: (D) Cabeza, vista dorsal; (E) Sifón y segmento X, vista dorsal; (F-G) Segmento X.



Figura 15S. *Sabethes undosus* (A) Aspecto general del adulto hembra; (B) Torax y abdomen, vista lateral; (C) Abdomen y alas, vista postero-dorsal.

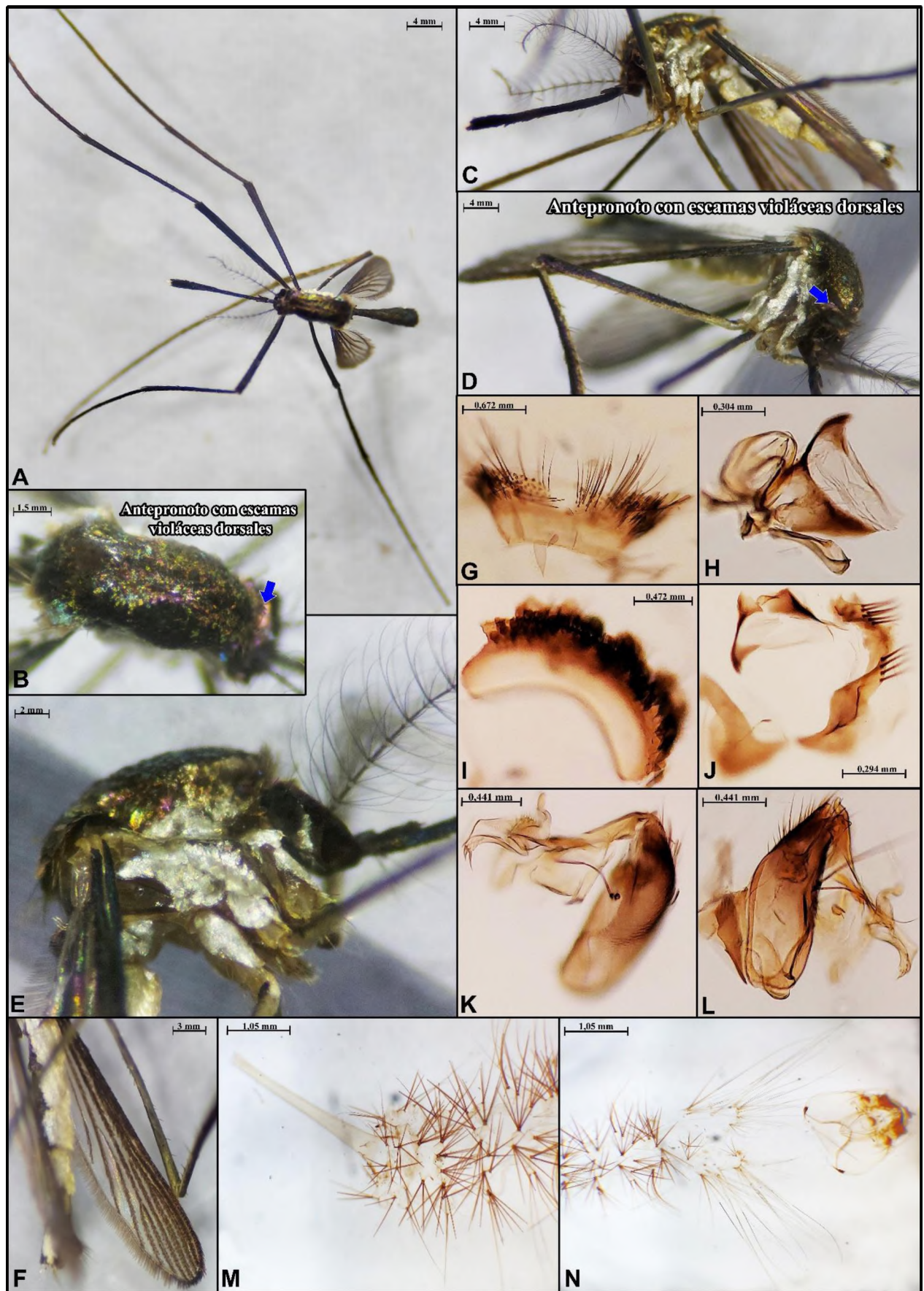


Figura 16S. *Sabethes undosus* (A) Aspecto general del adulto macho; (B) Escuto y antepronoto, vista dorsal; (C) Tórax, vista ventral; (D) Escuto, vista lateral; (E) Tórax, vista lateral; (F) Ala izquierda, vista ventral. Larva estadio IV: (M-N) vista dorsal. Genitalia masculina: (G) Tergo VIII; (H) Adeago; (I) Esterno VIII; (J) Tergo IX; (K-L) Gonocoxito y gonostilo.

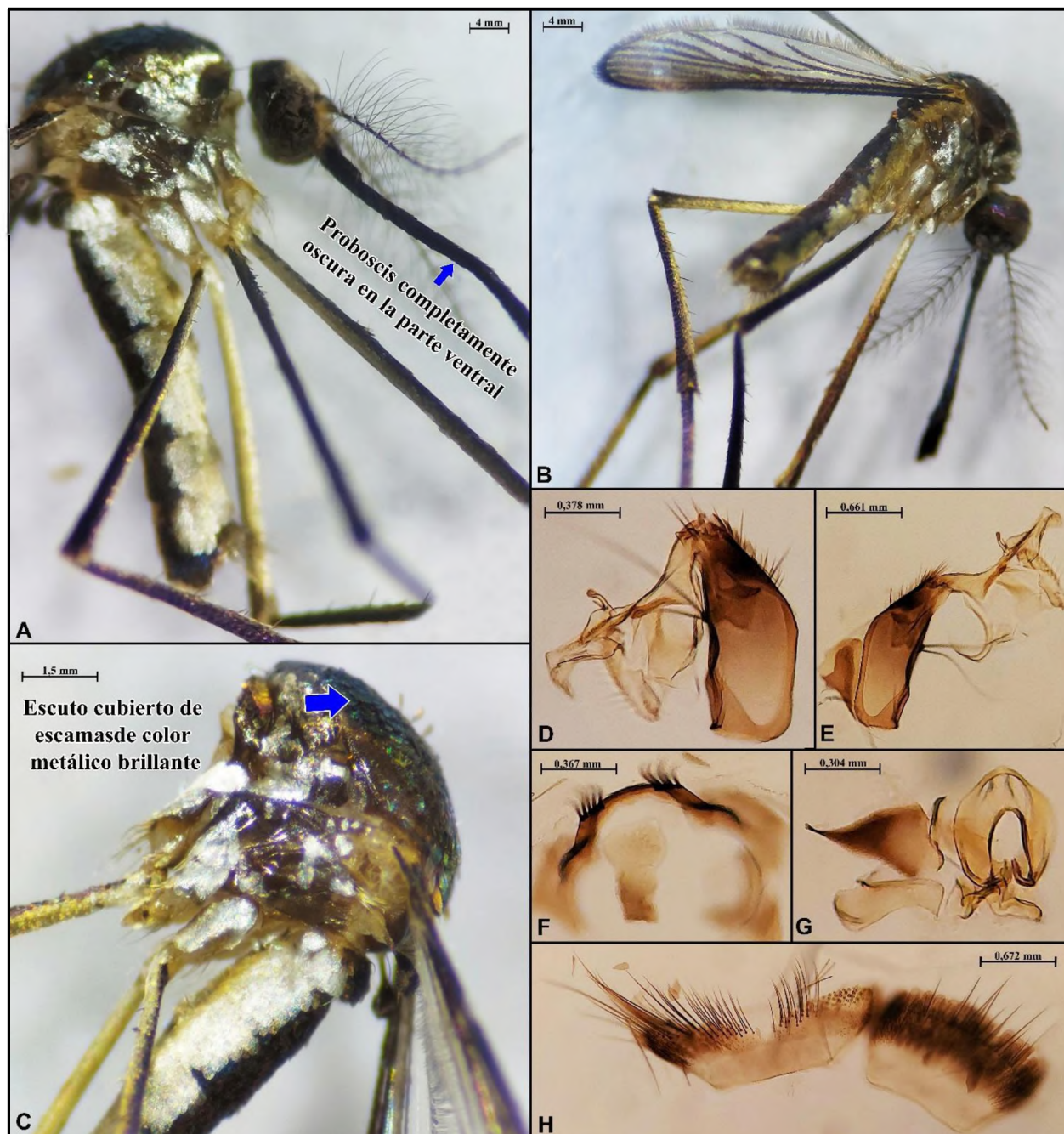


Figura 17S. *Sabethes undosus* (A) Aspecto general del adulto macho; (B) Tórax y abdomen, vista posterior; (C) Tórax, vista lateral; (D-F). *Genitalia masculina*: Gonocoxito y gonostilo; (F) Tergo IX; (G) Adeago; (H) Tergo VIII y Esterno VIII.

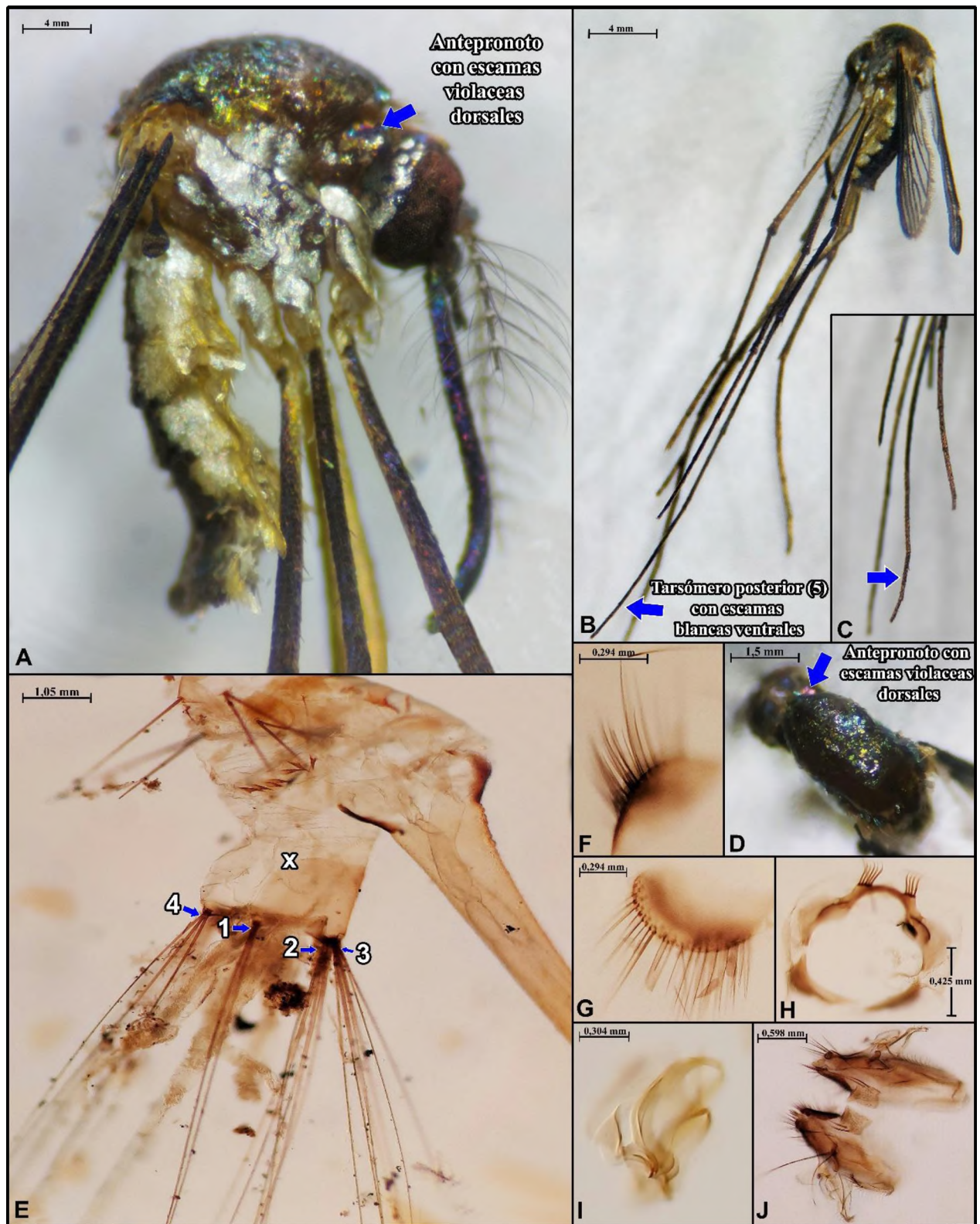


Figura 18S. *Sabethes undosus* (A) Tórax y abdomen, vista lateral; (B) Aspecto general del macho; (C) Patas, vista lateral; (D) Escuto, vista dorsal. Larva estadio IV: (E) Segmento X, vista dorsal; (F-G) Tergo VIII; (H) Tergo IX; (I) Adeago; (J) Gonocoxito y gonostilo.

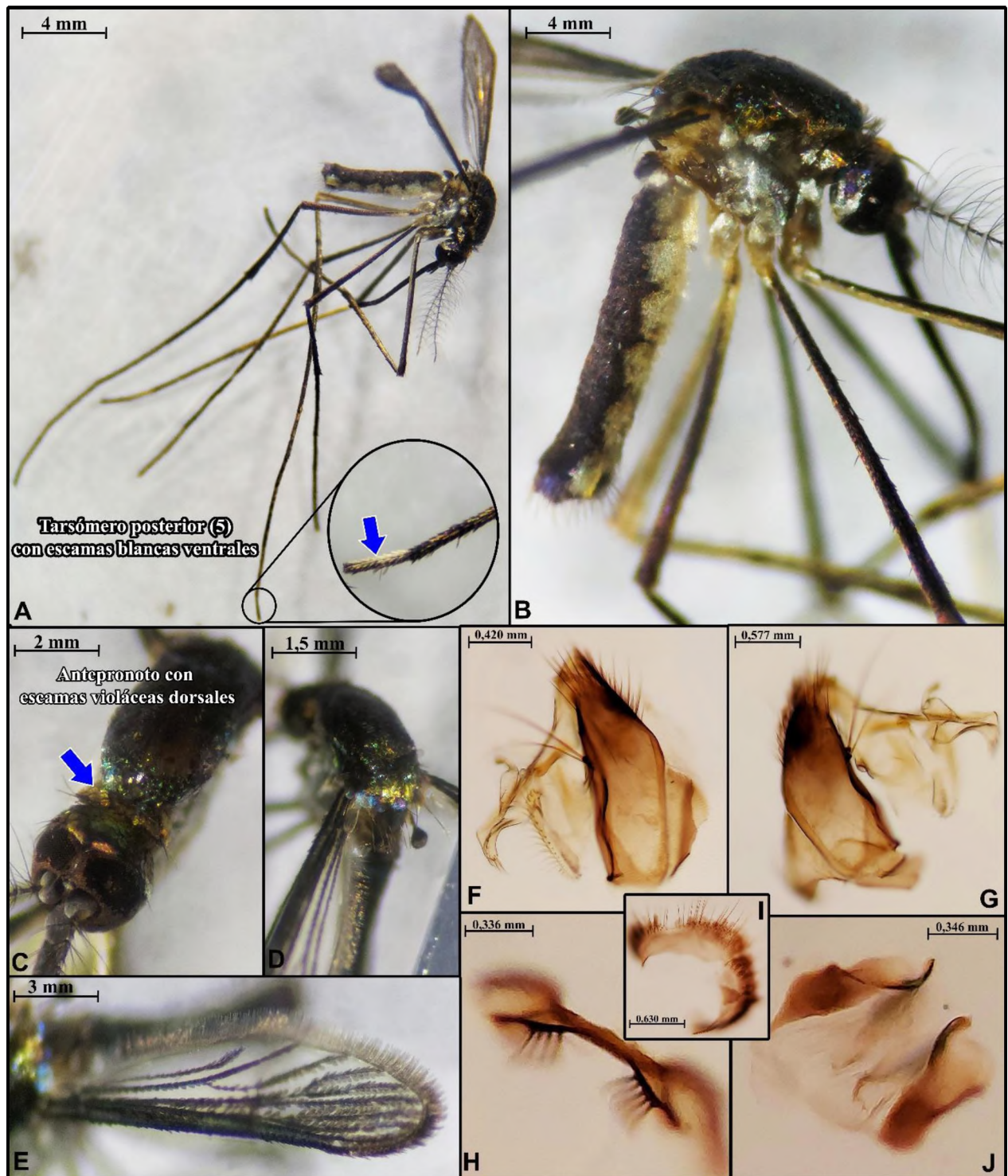


Figura 19S. *Sabethes undosus* (A) Aspecto general del adulto macho, insertado: mayor aumento de los tarsómeros posteriores; (B) Tórax y abdomen, vista lateral; (C) Anteprenoto, vista dorsal; (D) Escuto, vista postero-dorsal; (E) Ala izquierda, vista dorsal. *Genitalia masculina:* (F-G) Gonocoxito y gonostilo; (H) Tergo IX; (I) Esterno VIII; (J) Adeago y paraprocto.

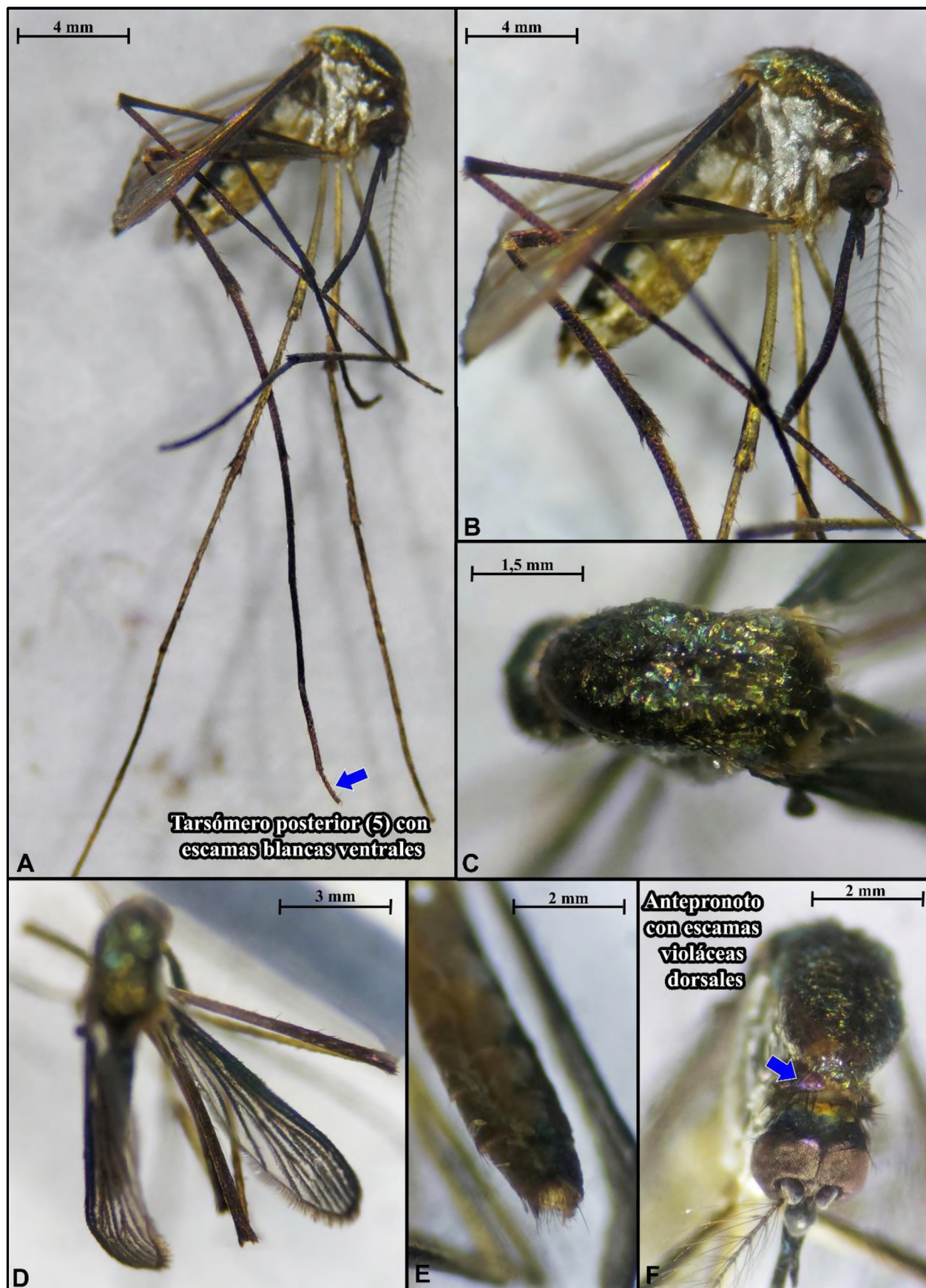


Figura 20S. *Sabethes undosus* (A) Aspecto general del adulto hembra; (B) Tórax, vista lateral; (C) Escuto, vista dorsal; (D) Alas, vista dorsal; (E) Abdomen, vista ventral; (F) Antepronoto, vista dorsal.

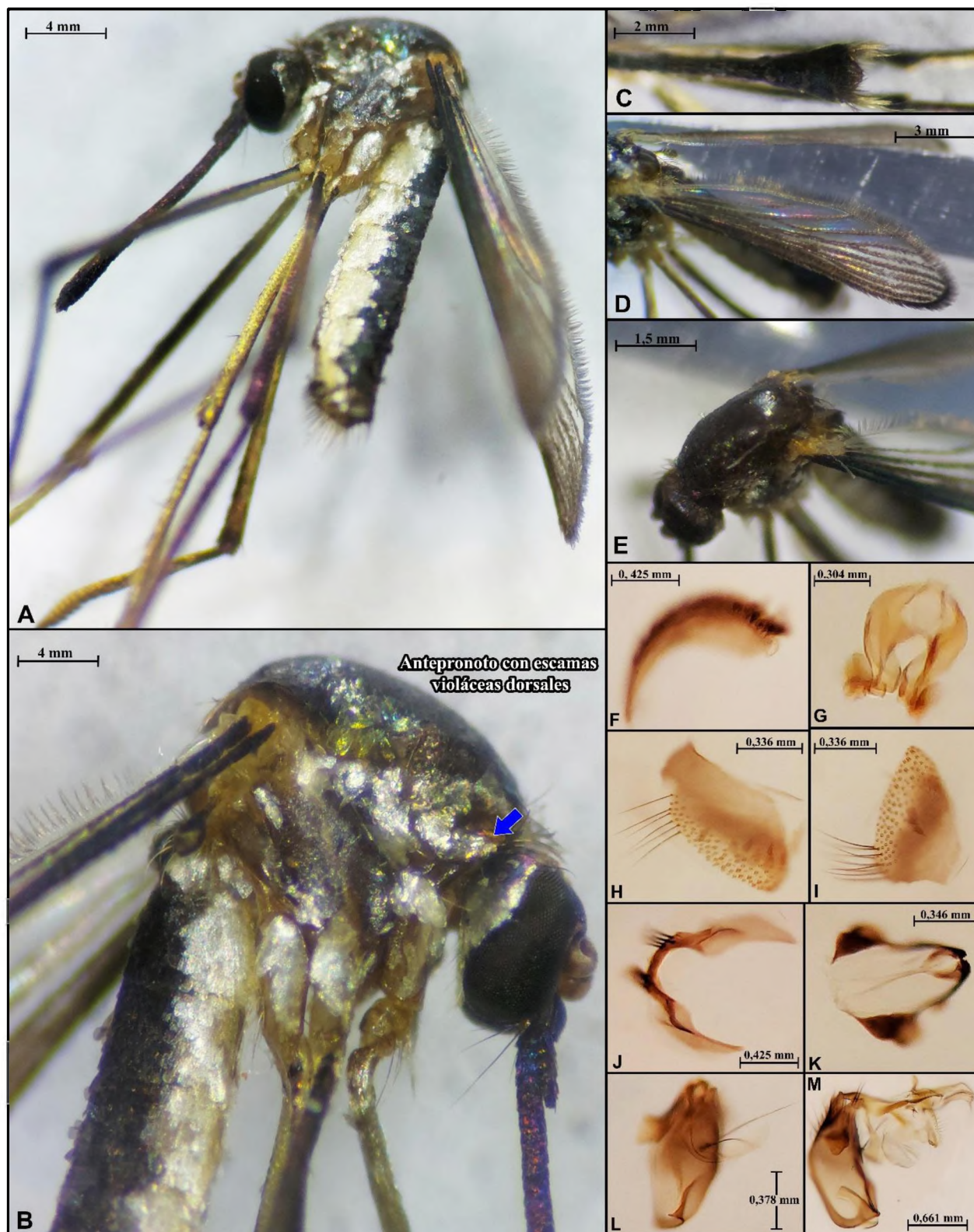


Figura 21S. *Sabethes undosus* (A) Aspecto general del adulto macho; (B) Tórax, vista lateral; (C) Abdomen, vista dorsal; (D) Ala izquierda, vista dorsal; (E) Escuto, vista dorsal. *Genitalia masculina*: (F) Esterno VIII; (G) Adeago; (H-I) Tergo VIII; (J) Tergo IX; (K) Proctiger; (L-M) Gonocoxito y gonostilo.

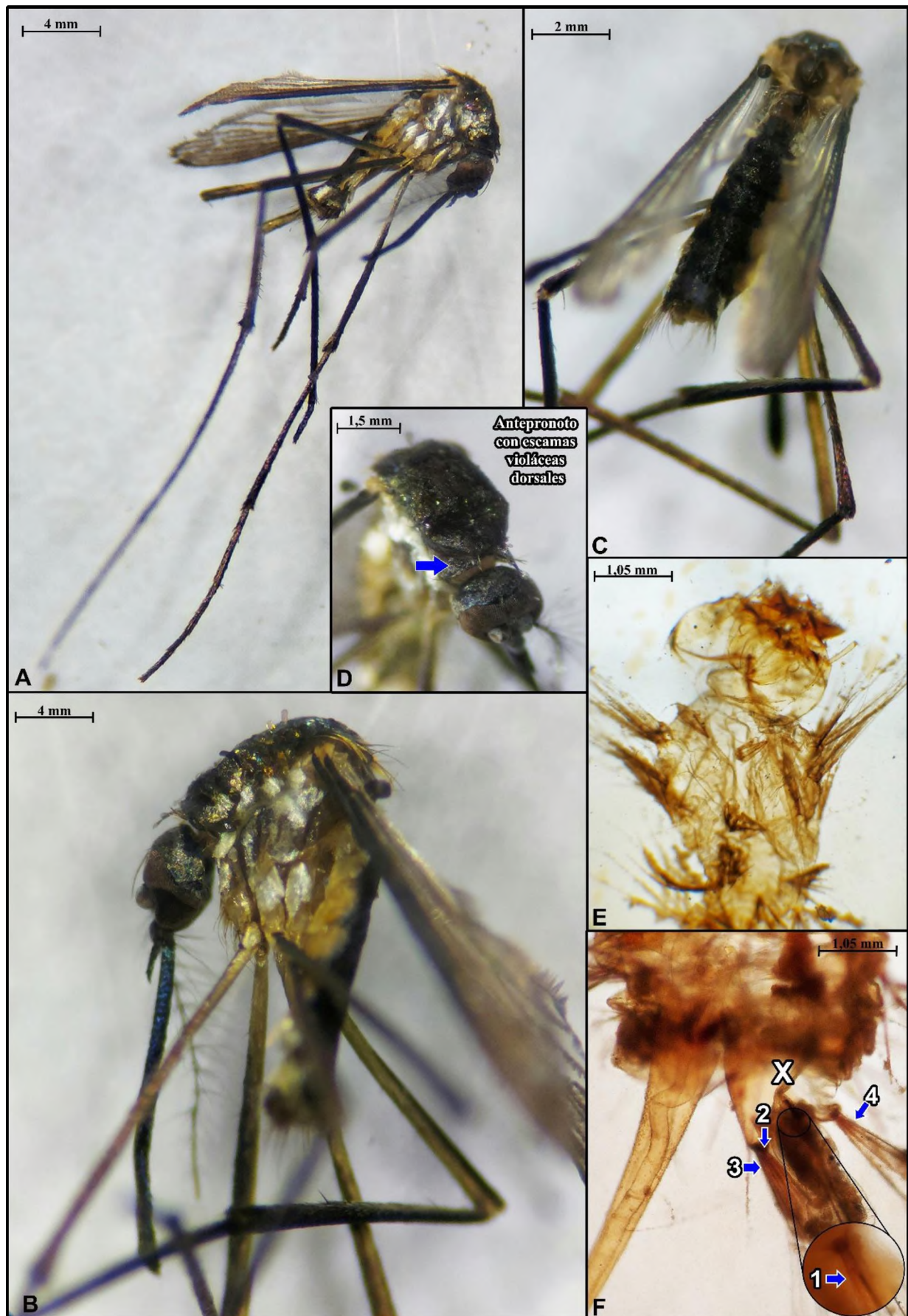


Figura 22S. *Sabethes undosus* (A) Aspecto general del adulto macho; (B) Tórax, vista lateral; (C) Abdomen, vista dorsal; (D) Escuto y antepronoto, vista dorsal. *Larva estadio IV*: (E) Cabeza, vista dorsal; (F) Segmento X, vista dorsal, insertado; mayor aumento de la cerda 1-X.

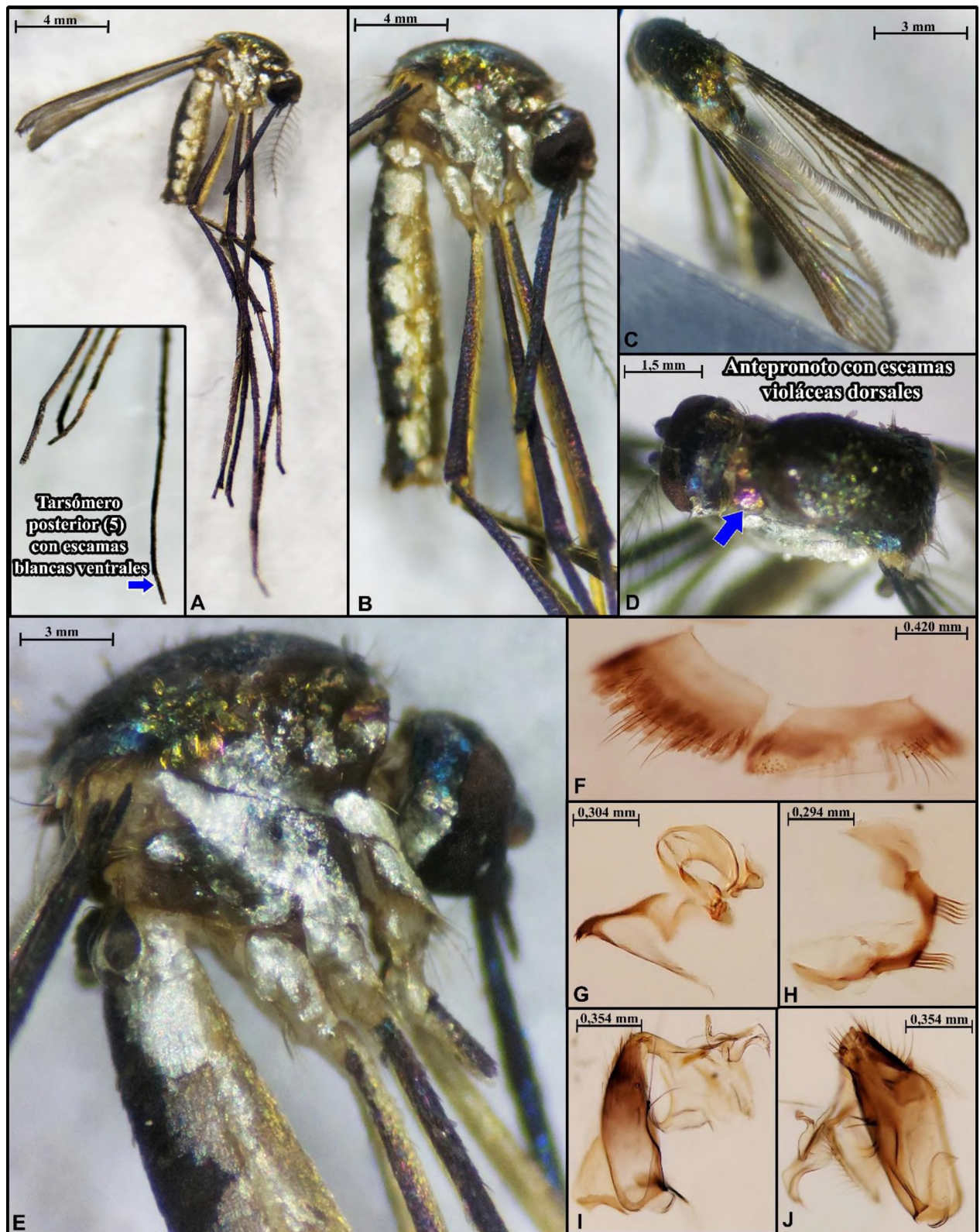


Figura 23S. *Sabethes undosus* (A) Aspecto general del adulto macho, insertado; mayor aumento de las patas; (B) Tórax y abdomen, vista lateral; (D) Alas, vista dorsal; (D) Escuto y anteprenoto, vista dorsal; (E) Tórax, vista lateral. *Genitalia masculina*: (F) Tergo VIII y Esterno VIII; (G) Adeago y proctiger; (H) Tergo IX; (I-J) Gonocoxito y gonostilo.

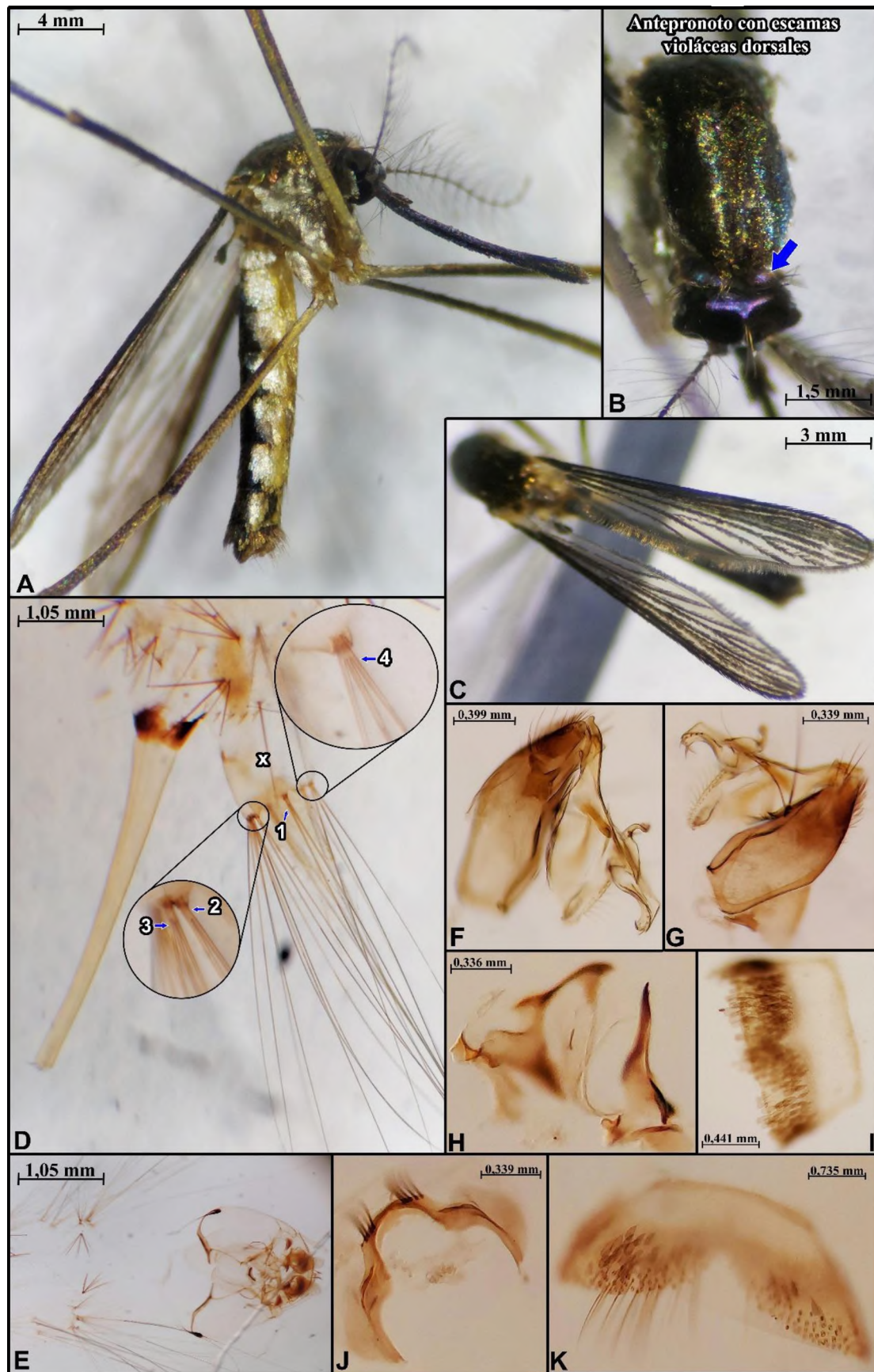


Figura 24S. *Sabethes undosus* (A) Aspecto general del adulto macho; (B) Escuto y antepronoto, vista dorsal; (C) Alas, vista dorsal. *Larva estadio IV*: (D) Sifón y segmento X, vista dorsal, insertado: mayor aumento de cerdas; (E) Cabeza, vista dorsal. *Genitalia masculina*: (F-G) Gonocoxito y gonostilo; (H) Proctiger; (I) Esterno VIII; (J) Tergo IX; (K) Tergo VIII.

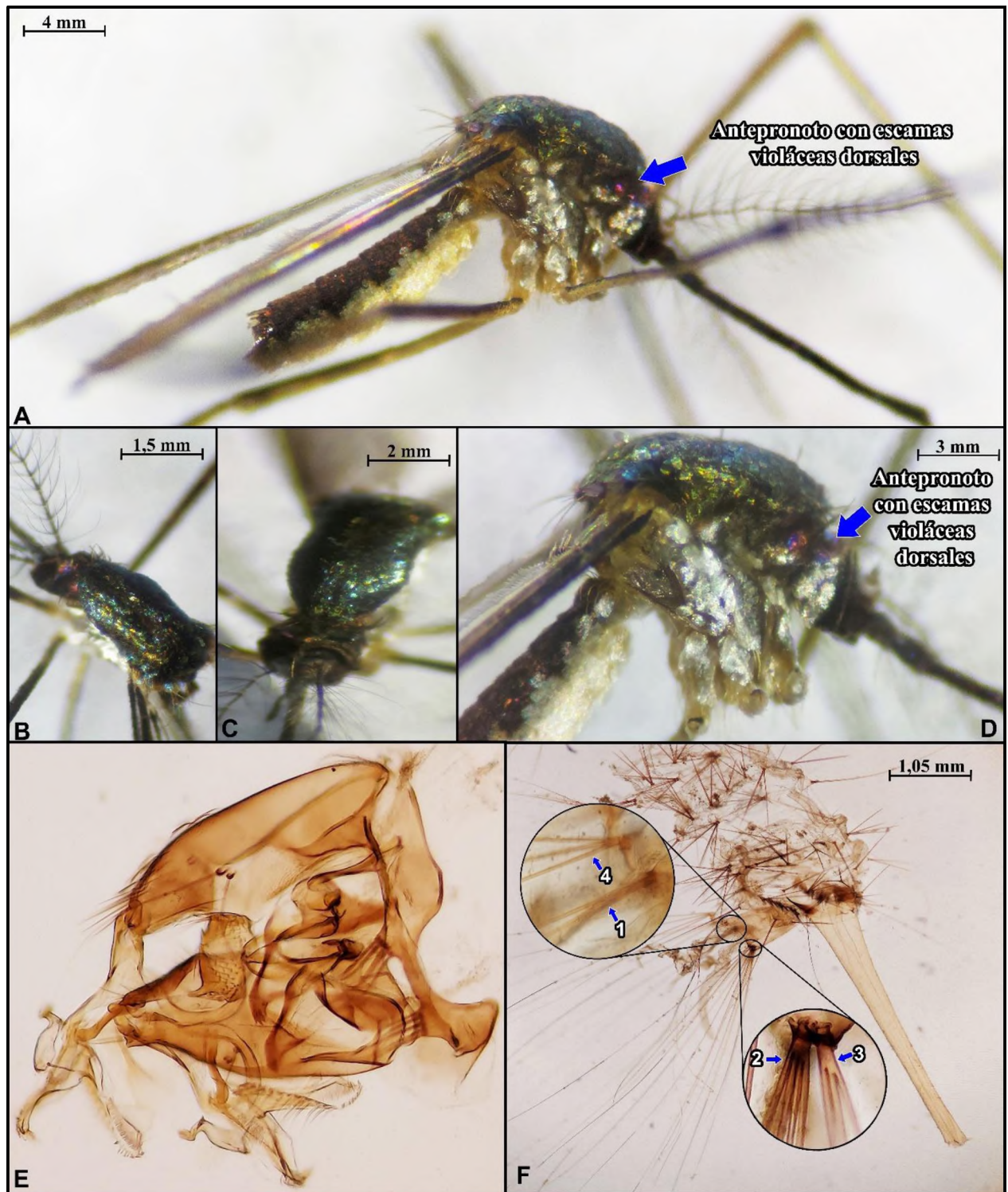


Figura 25S. *Sabethes undosus* (A) Aspecto general del adulto macho; (B-C) Escuto, vista dorsal; (D) Escuto, vista dorsal. *Genitalia masculina*: (E) Genitalia del macho. *Larva estadio IV*: (F) Sifón y segmento X, vista dorsal, insertado; mayor aumento de cerdas del segmento X.

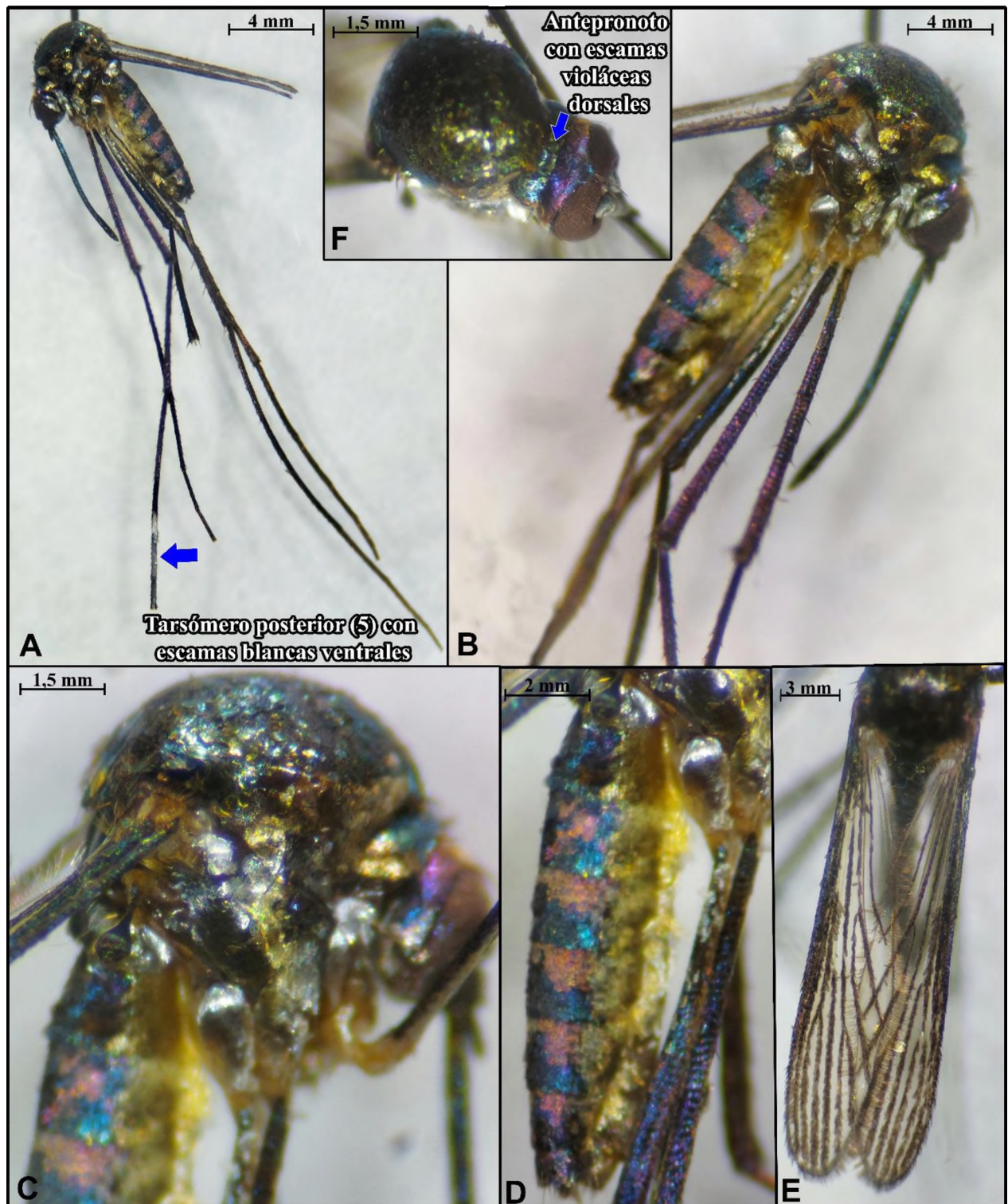


Figura 26S. *Sabethes undosus* (A) Aspecto general del adulto hembra; (B) Tórax y abdomen, vista lateral; (C) Tórax, vista lateral; (D) Abdomen, vista lateral; (E) Alas, vista dorsal; (D) Escuto y antepronoto, vista dorsal.

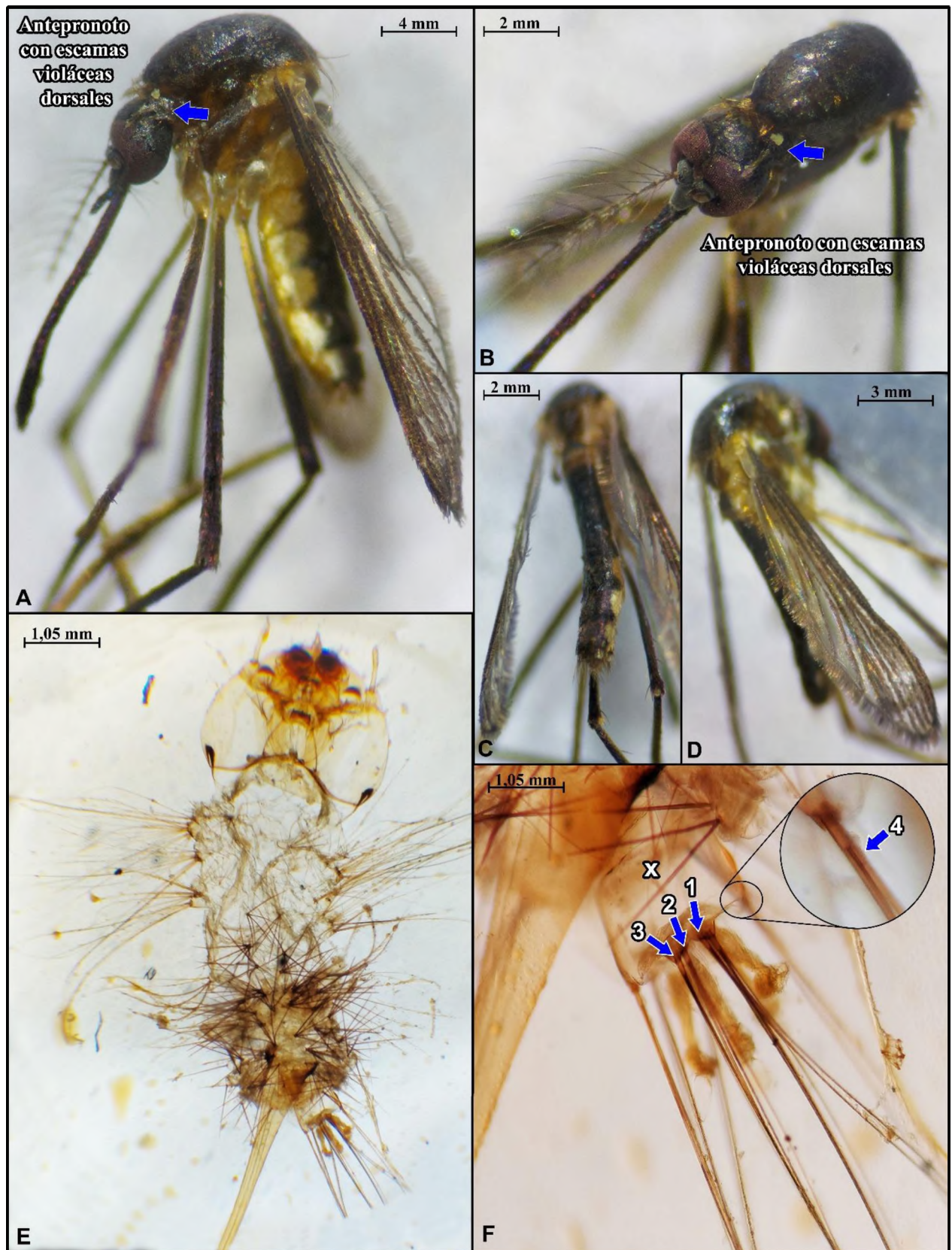


Figura 27S. *Sabethes undosus* (A) Aspecto general del adulto macho; (B) Escuto y antepronoto, vista antero-dorsal; (C) Abdomen, vista dorsal; (D) Ala derecha, vista dorsal. *Larva estadio IV*: (E) Larva, vista dorsal; (F) Segmento X, vista dorsal, insertado; mayor aumento de cerda 4.

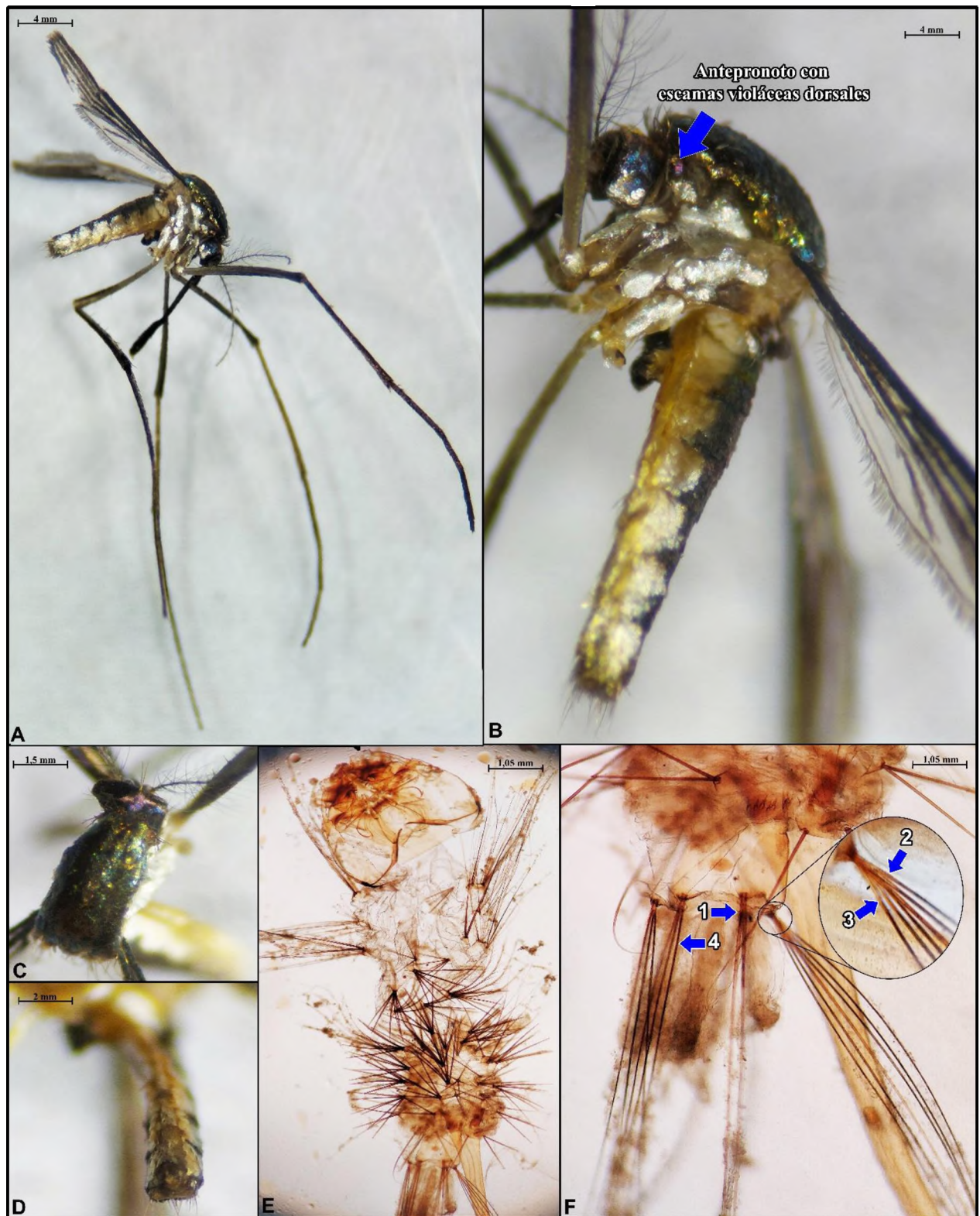


Figura 28S. *Sabethes undosus* (A) Aspecto general del adulto hembra; (B) Tórax y abdomen, vista lateral; (C) Escuto y antepronoto, vista dorsal; (D) Abdomen, vista ventral. *Larva estadio IV*: (E) Larva, vista dorsal; (F) Segmento X, vista dorsal, insertado; mayor aumento de cerda 3 y 2.

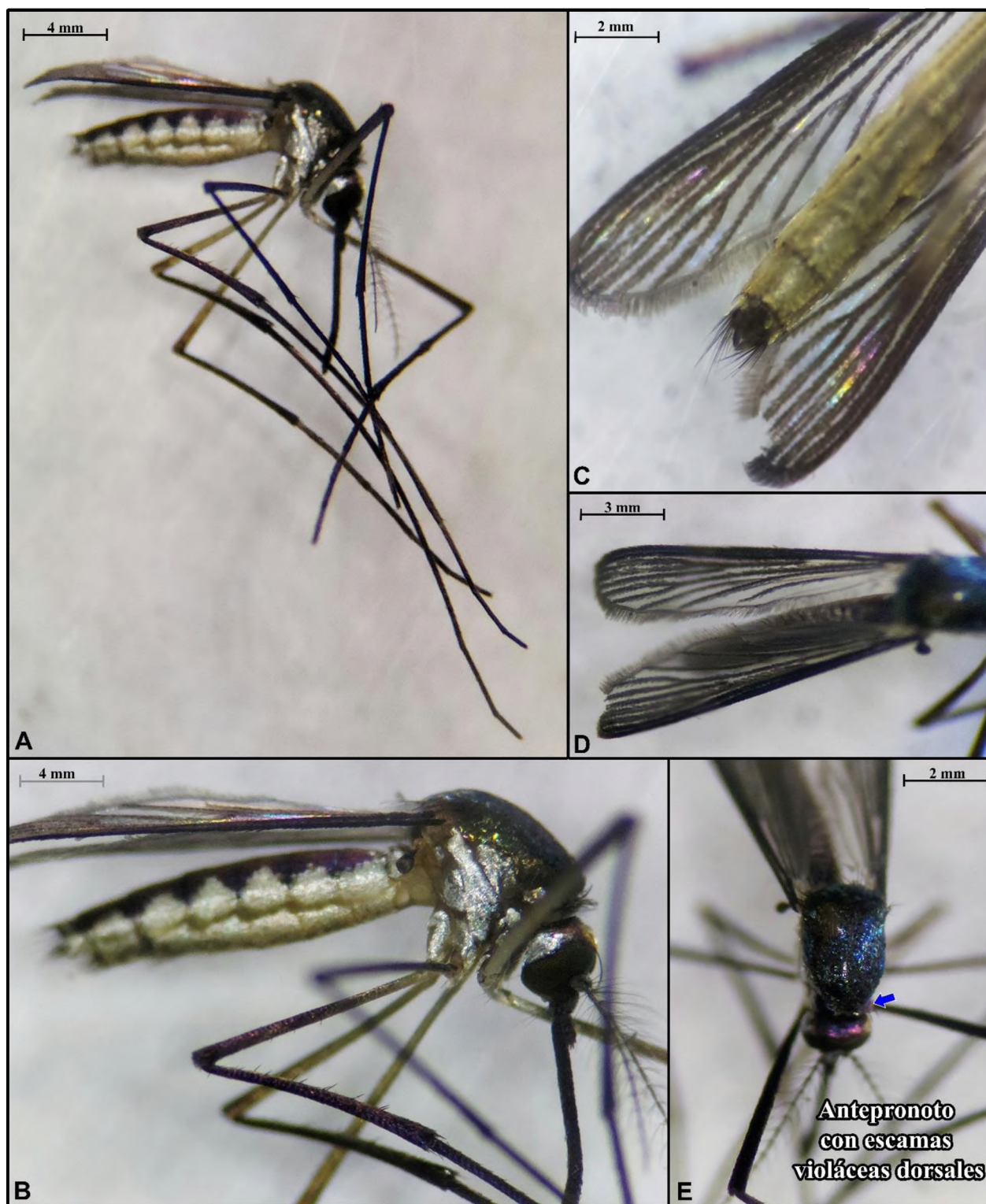


Figura 29S. *Sabethes undosus* (A) Aspecto general del adulto macho; (B) Tórax y abdomen, vista lateral; (C) Abdomen, vista ventral; (D) Alas, vista dorsal; (E) Escuto, vista dorsal.

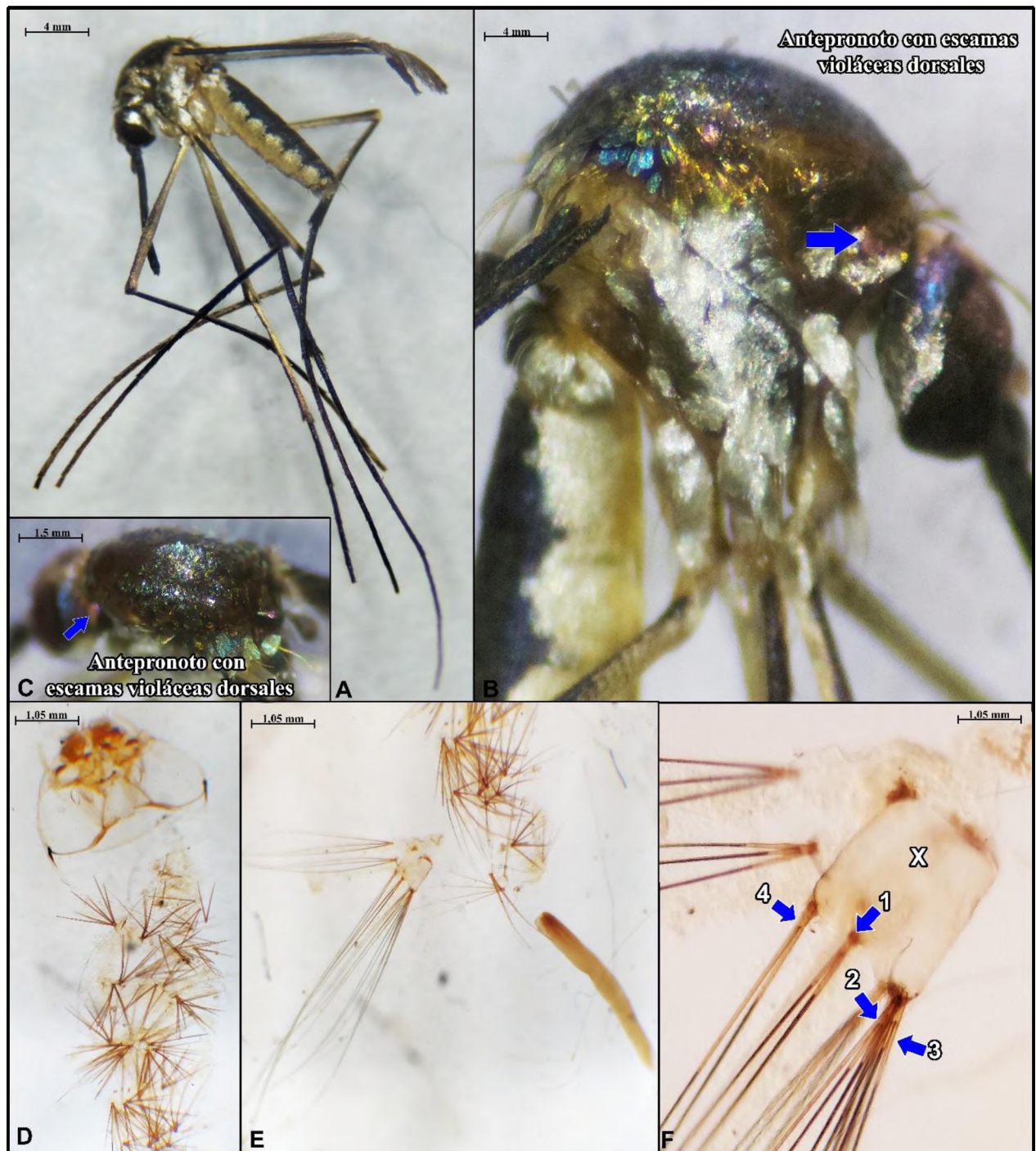


Figura 30S. *Sabethes undosus* (A) Aspecto general del adulto hembra; (B) Tórax, vista lateral; (C) Escuto, vista dorsal. Larva estadio IV: (E) Cabeza, vista dorsal; (e) Sifón y segmento X, vista dorsal; (F) Segmento X.

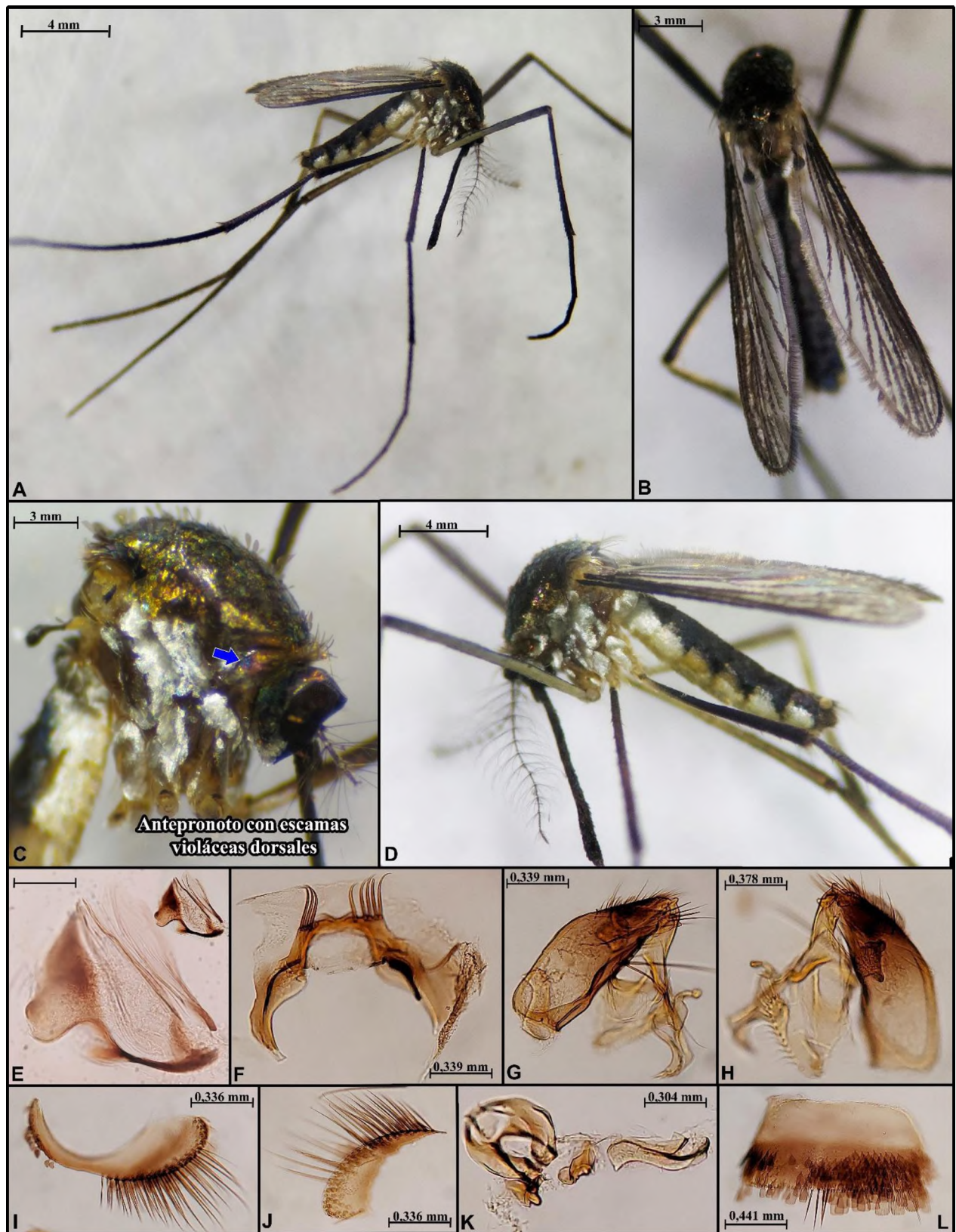


Figura 31S. *Sabethes undosus* (A) Aspecto general del adulto hembra; (B) Alas, vista dorsal; (C) Tórax, vista lateral; (D) Tórax y abdomen, vista lateral. *Larva estadio IV* (E) Paraproctos; (F) Tergo IX; (G-H) Gonocoxito y gonostilo; (I-J) Tergo VIII; (K) Adeago; (L) Esterno VIII.

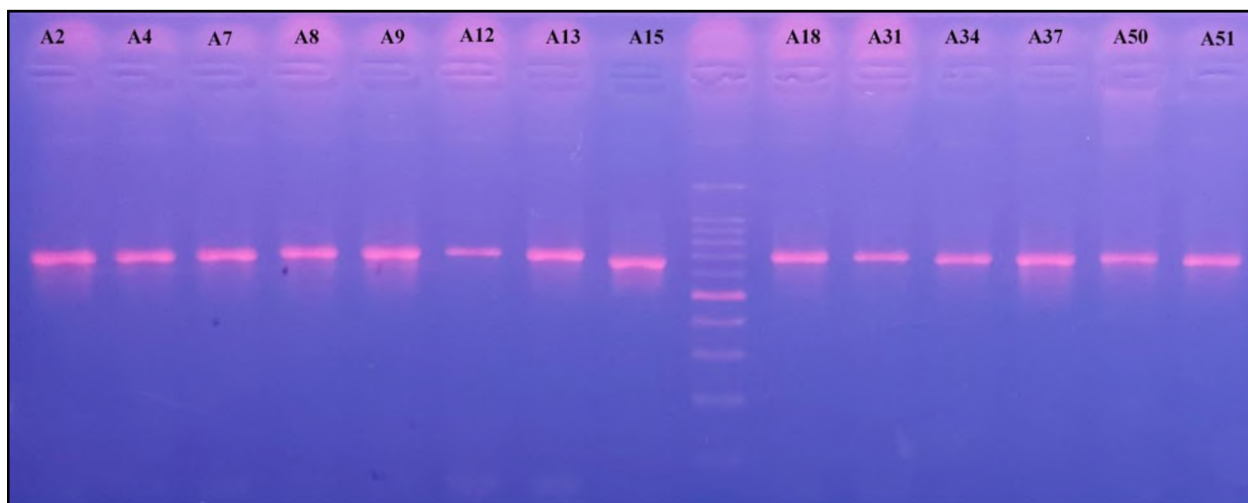


Figura 32S. Bandas obtenidas de muestras enviadas a secuenciar.

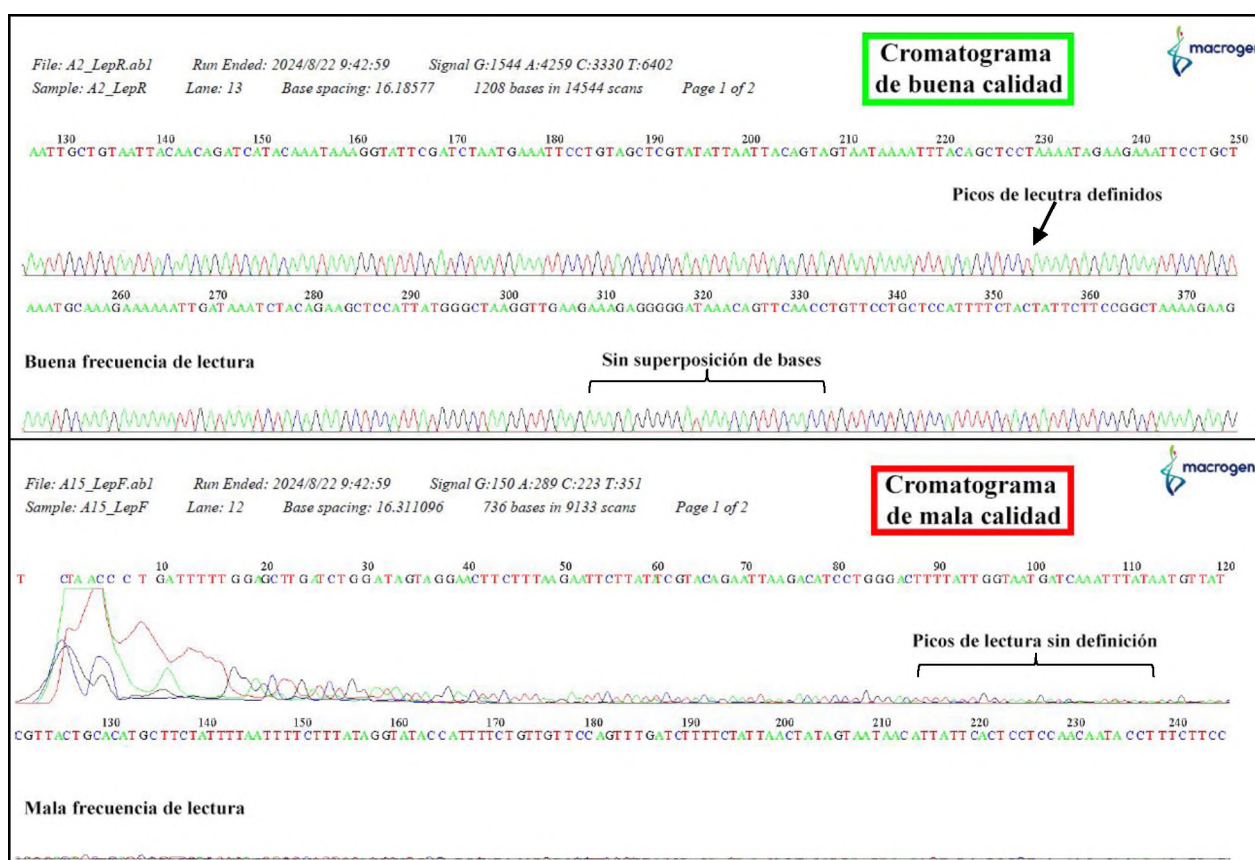


Figura 33S. Comparación entre cromatogramas de buena y mala calidad.