

---

# ESTADÍSTICA FILOGEOGRÁFICA EN *Culex annulirostris*: CONSTRUCCIÓN DE REDES DE HAPLOTIPOS EN ESTUDIOS DE GENEALOGÍAS INTRAESPECÍFICAS, USANDO TRES METODOLOGÍAS DIFERENTES.

PHYLOGEOGRAPHIC STATISTICS IN *Culex annulirostris*:  
CONSTRUCTION OF HAPLOTYPE NETWORKS IN  
INTRASPECIFIC GENEALOGY STUDIES USING THREE DIFFERENT METHODOLOGIES

Wendy Catalina Arenas Calle<sup>1</sup> y Víctor Hugo García- Merchán<sup>2\*</sup>

---

<sup>1</sup> Universidad del Quindío, Armenia, Colombia. Ktalina62@hotmail.com

<sup>2</sup> Departamento de Genética, Universidad de Barcelona, Barcelona, España. victorhugogarcia@ub.edu

---

Recibido: Agosto 25 de 2010

Aceptado: Marzo 9 de 2011

\*Correspondencia del autor: Departamento de Genética, Universidad de Barcelona, Barcelona, España.  
victorhugogarcia@ub.edu

## RESUMEN

*Culex annulirostris* es el principal vector del virus de la encefalitis Japonesa (JEV) en Australia. A pesar que las condiciones ambientales son ideales para el establecimiento de JEV en Australia, *C. annulirostris* no ha sido un vector efectivo, posiblemente debido a presencia de linajes divergentes en la especie. En este trabajo se establece la filogeografía para *C. annulirostris* en Australia y sur de Papua Nueva Guinea, utilizando las secuencias de 118 haplotipos de una región del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I generadas previamente por Hemmerter *et al.* (2007), con el fin de realizar un análisis comparativo desde el punto de vista de inferencias biológicas, evaluando para ello tres enfoques metodológicos para la construcción de filogenias intraespecíficas: red de uniones promediadas (Median-Joining Network MJ), red de parsimonia estadística (Statistical Parsimony Network SP) y Cómputo Bayesiano Aproximado (Approximate Bayesian Compute ABC). Los resultados de la filogenia bajo los tres enfoques concuerdan con algunas diferencias, estableciéndose 5 linajes para la especie en la región de Australasia: ann-AUS presente en Australia continental, ann-S-AUS en el sur de Australia, ann-IS linaje insular en las Islas Salomón, ann-PNG-2 restringida a Papua Nueva Guinea y ann-PNG-1 distribuida en la península del cabo York y sur de Papua Nueva Guinea. Asimismo, se establece, con las metodologías filogeográficas utilizadas, un límite entre los linajes de Papua Nueva Guinea y Australia que coincide con el límite de la actividad de JEV y así, la diferencia de huésped en las zonas también genera un impacto identificable en la distribución haplotípica de *C. annulirostris*.

## PALABRAS CLAVES

*Culex*, haplotipos, Filogeografía, análisis Bayesiano

## ABSTRACT

*Culex annulirostris* is the main vector of Japanese Encephalitis Virus (JEV) in Australia. Although the environmental conditions are ideal for the establishment of JEV in Australia, *C. annulirostris* has not been an effective vector, possibly due to the presence of divergent lineages in the species. This study establishes the intraspecific phylogeography to *C. annulirostris* in Australia and southern Papua New Guinea, using the sequences of 118 haplotypes from a region of the mitochondrial gene cytochrome oxidase I previously generated by Hemmert et al. (2007), in order to make a comparative analysis from the biological inferences standpoint. Three methodological approaches were evaluated to the construction of intraspecific phylogenies: a network of averaged unions (Median-Joining Network-MJ-), statistical parsimony network (Statistical Network-Parsimony-SP-) and Approximate Bayesian Computation (Approximate Bayesian Compute-ABC-). The results of the phylogeny under the three approaches are consistent with some differences, establishing five lineages for the species in the Australasian region: ann-AUS present in mainland Australia, ann-S-AUS in southern Australia, a lineage ann-SI island in the Solomon Islands, PNG-2 ann-restricted to Papua New Guinea and ann-PNG-1 distributed in the Cape York Peninsula and southern Papua New Guinea. Likewise, a boundary is established, using phylogeographical methods, between the tribes of Papua New Guinea and Australia which coincides with the limit of JEV activity; and thus the host difference in the two areas also creates an identifiable impact on the haplotype distribution of *Culex annulirostris*.

## KEYWORDS

*Culex*, haplotypes, Phylogeography, Bayesian analysis.

## INTRODUCCIÓN

Una de las especies más abundantes y de amplia distribución en el sureste Asiático y en Australia asociadas a los brotes de JEV es *Culex annulirostris*. El virus de la encefalitis japonesa se creía restringido a países del sureste asiático como Japón, China, Camboya, Corea del sur, Indonesia entre otros, donde los índices de infectados sugieren que anualmente se identifican entre 30.000 y 50.000 casos (1). No obstante, ha habido reportes de brotes esporádicos y localizados en otros países como Australia y Papua Nueva Guinea en los años 1995 y 1998.

El carácter generalizado de los brotes de 1995 y 1998 en el norte de Queensland indicó un caso de migración a gran escala, posiblemente causada por los mosquitos arrastrados por el viento o las aves migratorias procedentes del sur de Papua Nueva Guinea (2, 3). Para varios investigadores (1, 2, 4, 5) esto demuestra una gran capacidad del virus para difundirse y establecerse en nuevas áreas; pese a lo anterior, el virus de la encefalitis Japonesa no ha tenido éxito para establecerse en Australia continental mediante *C. annulirostris* como vector.

Según Hemmerter *et al.* (2007) se han expuesto varias explicaciones al fenómeno, sin embargo ninguna ha sido probada hasta el momento. Una de dichas explicaciones plantea que la especie vector no ha sido reco-

nocida o la variación en la población vector (*C. annulirostris*) puede crear barreras, es decir las poblaciones pueden ser diferentes y afectar la propagación del virus desde Papua Nueva Guinea (donde el virus está establecido) a Australia

El anterior escenario de distribución del vector origina un grado de complejidad importante, dado que, en general, la habilidad de los mosquitos del complejo *Culex* para transmitir numerosos agentes de enfermedades incrementa el riesgo potencial de expansiones repentinas (6). Aproximadamente, en los últimos dos siglos, los factores favorables para la difusión y distribución geográfica de las enfermedades transmitidas por vectores ha aumentado por fenómenos tanto abióticos (calentamiento global, procesos de deforestación en zonas antes no expuestas, inundaciones) como bióticos (adaptación de los ciclos de vida de los vectores a las nuevas condiciones ambientales, desplazamiento y/o aumento de las fronteras de distribución de las especies en función de las migraciones y asentamientos humanos, alteración a nivel ecológico de las relaciones huésped-hospedero).

Para intentar resolver la problemática asociada a la interacción de la dinámica espacial y de distribución de un vector y una enfermedad específica, Hemmerter *et al.* (2007) realizaron una investigación sobre la filogeografía de *Culex annulirostris*, el principal vector de arbovirus endémicos en Australia y responsable del estable-

cimiento de JEV en el sur de Papua Nueva Guinea, así como de algunas incursiones en el norte de Australia. Papua Nueva Guinea y el área continental de Australia están separados por un pequeño estrecho de agua (Tories Strait) y sus islas.

Dentro de los principales resultados encontrados en el trabajo de Hemmerter *et al.* (2007), se encontraron cinco linajes intraespecíficos para *C. annulirostris* que concuerdan con los límites biogeográficos de la actividad de JEV y la distribución en el área continental australiana. La concordancia entre la diversidad genética encontrada en los linajes del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I (COI) en *C. annulirostris* y el límite sur de la actividad del JEV en Papua Nueva Guinea es, de acuerdo a los autores de la investigación, la clave para explicar por qué el JEV no se ha establecido todavía en el área continental Australiana, pese a encontrarse allí la especie vector y los potenciales hospederos.

De acuerdo a lo anterior, se hace evidente la necesidad de estudios a nivel molecular complementarios a las investigaciones morfológicas, ecológicas, y epidemiológicas tradicionales llevadas a cabo en vectores como los mosquitos, y en el caso particular de *C. annulirostris*, reconociendo especialmente la variabilidad genética, las poblaciones de mayor densidad y el establecimiento de los riesgos de infección por arbovirus asociados a la encefalitis japonesa (2, 7).

Como aporte complementario a la investigación de Hemmerter y colaboradores (2007), en el presente trabajo se realizan una serie de análisis alternativos a los propuestos en el artículo original, trabajando con la base de datos de secuencias de una región del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I sometidas y publicadas por los autores mencionados anteriormente en el GENBANK. Estos análisis alternativos manejan unos supuestos de agrupación de clados diferentes, con miras a explorar diferencias entre las posibles interpretaciones biológicas que se pueden realizar e inferir de una misma problemática partiendo de una misma serie de datos.

Como valor agregado de gran importancia se plantea la pertinencia de este tipo de estudio, en cuanto a los movimientos de dispersión y filogeografía de vectores de enfermedades, en este caso los mosquitos, que presentan un potencial de extrapolación para evaluar y analizar otros casos de movimientos y distribución de especies, por lo que se podría considerar este tipo de trabajo como un modelo de estudio para resolver cues-

tiones epidemiológicas, evolutivas y de conservación. Asimismo, la posibilidad de realizar investigaciones usando herramientas como el GenBank que ofrecen la posibilidad de acercamiento entre investigadores y sus trabajos para generar nuevos datos y análisis que impulsen el potencial de extrapolación y validación a otros estudios.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología propuesta considera el análisis de un fragmento de 538pb del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I (COI) en 134 secuencias de la especie *Culex annulirostris* distribuida en la región Australasia de Papua Nueva Guinea y el área continental de Australia, con el fin de establecer la filogenia intraespecífica de la especie, mediante tres tipos de análisis filogenéticos.

La elección de la especie y del trabajo de Hemmerter *et al.* (2007) como documento base de la presente investigación se estableció de acuerdo a dos criterios:

- 1) Disponibilidad de acceso a las secuencias del gen COI generados para la especie *C. annulirostris*.
- 2) La importancia transversal a todo tipo de estudio epidemiológico que generan los análisis filogeográficos expuestos en la presente investigación.

Las 134 secuencias de la región COI del ADNmt utilizadas en la presente investigación fueron obtenidas en 13 regiones en Australasia (Australia, sur de Papúa Nueva Guinea, Timor Leste y las islas Salomón (Tabla 1), de acuerdo a Hemmerter *et al.* (2007) (accesión en el Genbank DQ673677 DQ673858).

Mediante el programa DnaSP v. 4.5 (8), se generaron ficheros con extensión Nexus y Fasta, para realizar los cálculos de diversidad molecular y la generación de los *output* para la construcción de las redes haplotípicas de parsimonia estadística y red de uniones promediadas.

Las 134 secuencias del COI mitocondrial originaron 118 haplotipos utilizados en la construcción de la filogenia de *Culex annulirostris*. Se realizó un análisis comparativo de tres métodos de construcción de gráficos filogenéticos según el enfoque estadístico de cada uno:

- 1) MJ “Median-Joining Network” basado en el criterio de MP (máxima parsimonia) mediante el software Network 4.5.1.0 (9). El valor de Épsilon fue por defecto

**Tabla 1.** Zonas de muestreo de *Culex annulirostris* en Australasia con el color de referencia por cada región.

<u>REF.</u>	<u>POBLACIÓN</u>	<u>NOMBRE</u>
	<u>1</u>	<u>Australia, Queensland (Cabo de York)</u>
	<u>2</u>	<u>Australia, Queensland (extreme del Cabo York)</u>
	<u>3</u>	<u>Australia, Nueva Gales del sur</u>
	<u>4</u>	<u>Australia, Territorio Norte</u>
	<u>5</u>	<u>Australia, Australia occidental</u>
	<u>6</u>	<u>Australia, Queensland</u>
	<u>7</u>	<u>Australia, Queensland (Estrecho de Torres)</u>
	<u>8</u>	<u>Timor Leste</u>
	<u>9</u>	<u>Australia, Sur de Australia</u>
	<u>10</u>	<u>Papua New Guinea (Provincia occidental)</u>
	<u>11</u>	<u>Papua New Guinea (Provincia del Golfo)</u>
	<u>12</u>	<u>Islas Salomon, territorio norte</u>
	<u>13</u>	<u>Islas Salomon, territorio sur</u>

cero y posteriormente se realizó el cálculo de MP para limpiar la red de vectores de innecesarios.

2) SP “Statistical Parsimony Network” bajo el enfoque de parsimonia estadística (10). Mediante el software TCS 1.21 (10) basado en el algoritmo de Templeton *et al.* (1992). El límite de conexión se estableció en 10 pasos mutacionales que garantizaron la conexión de todos los haplotipos a la red; la solución de los bucles se realizó siguiendo los criterios de distancia, frecuencia y topología (11).

3) Para efectos del análisis comparativo se extrajo el análisis filogeográfico ABC “Approximate Bayesian Compute”, de Hemmerter *et al.* (2007), generado mediante la metodología de aproximación bayesiana, utilizando el software Mrbayes 3.1.2.

Los tres análisis gráficos fueron sometidos a un análisis comparativo descriptivo con el fin de determinar la potencia, la congruencia y la eficacia de los métodos para la reconstrucción de la filogenia intraespecífica de *Culex annulirostris* y su historia evolutiva en la región de Australasia.

Se realizó un análisis filogeográfico mediante el método NCPA utilizando la red construida bajo parsimonia estadística TCS 1.21. (10). La solución de los bucles se realizó manualmente siguiendo los criterios de distancia, frecuencia y topología (11) y para la anidación de los clados se siguieron los criterios de anidación pareados (11). Las medidas de distancia de Clado y genéticas Dn y Dc se estimaron utilizando el software GeoDis 2.5 (12). Los resultados obtenidos en el análisis del GeoDis

fueron interpretados mediante la aplicación de la clave de clados para NCPA (13).

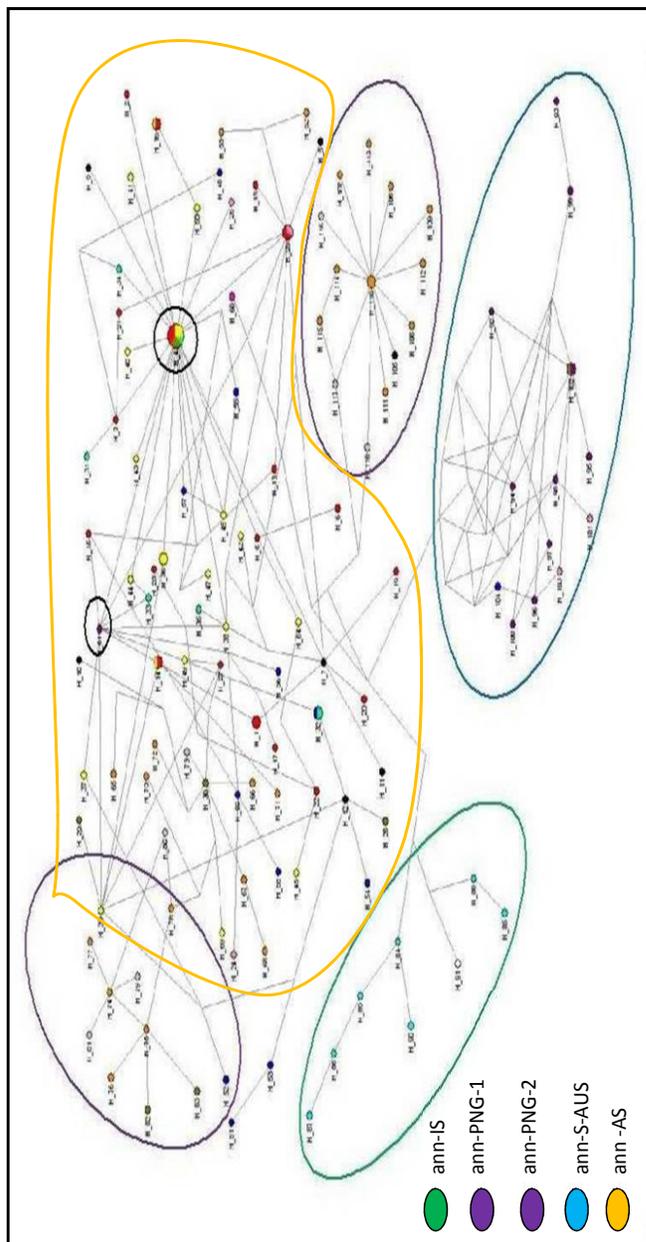
## RESULTADOS

Los valores de diversidad haplotípica (Hd) alta con un rango entre 0.98 – 1.0 indicando una alta cantidad de haplotipos únicos y exclusivos con una tamaño muestral bajo en las poblaciones, bajo esta condiciones los cálculos de diferenciación genética puede ser subestimados, por esta razón se presentan cálculos de Fst estadísticos del vecino mas próximo llamadas nearest-neighbor statistic (Snn) (14) basado en las diferencias de las secuencias y no en las frecuencias de los haplotipos, los valores de significancia P<0.05 se calcularon con Arlequín 3.01 utilizando pruebas de permutación implementadas en el software (15) (Tabla 2.)

Los gráficos de construcción filogenética bajo el enfoque MJ (Median-Joining Network) mostraron una red reticulada con múltiples conexiones entre los haplotipos. La posición de los haplotipos en la red identificó cuatro grupos diferenciados (Gráfico 1.): Haplotipos de las poblaciones de las Islas Salomón, Haplotipos de las poblaciones del sur de Australia y un haplotipo de la región 3 en Australia continental contigua a la región 6 al sur de Australia, Haplotipos de las poblaciones de Papúa Nueva Guinea y algunos haplotipos de las poblaciones en el estrecho de Torres, Haplotipos de las Poblaciones de Australia continental que incluyen las poblaciones de la península del Cabo York y el haplotipo de la región de Timor Leste, al igual que algunos haplotipos del sur de Papua Nueva Guinea.

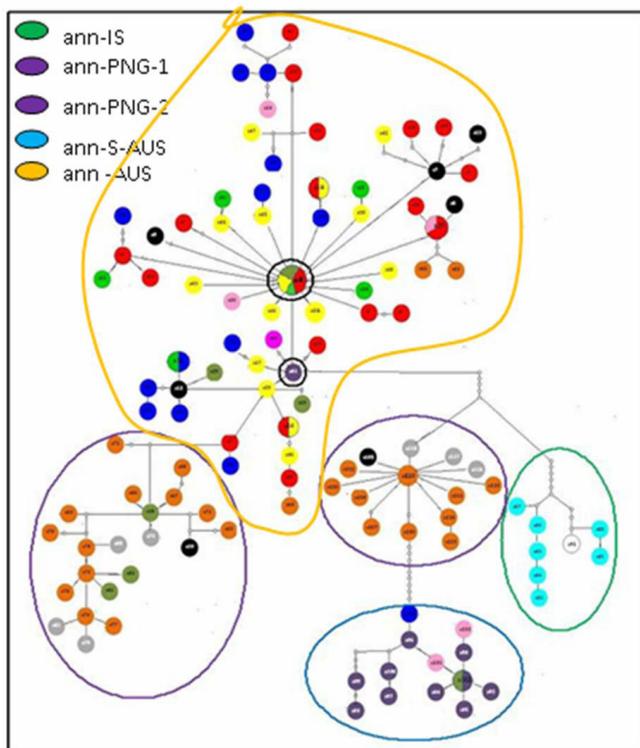
**Tabla 2.** Valores de diferenciación genética (Fst) entre poblaciones de *Culex annulirostris* en Australasia. En negrilla los valores con significancia P<0.05

POBLACIÓN	1	2	3	4	5	6	7	9	10	11	12
1		0.002	0.098	-0.020	0.004	<b>0.108</b>	<b>0.035</b>	<b>0.671</b>	<b>0.276</b>	<b>0.261</b>	<b>0.716</b>
2			0.016	0.003	0.025	0.052	-0.007	<b>0.587</b>	0.089	0.084	<b>0.610</b>
3				0.084	<b>0.121</b>	0.037	-0.001	<b>0.556</b>	<b>0.181</b>	<b>0.162</b>	<b>0.615</b>
4					-0.011	0.119	0.055	<b>0.685</b>	<b>0.290</b>	<b>0.269</b>	<b>0.716</b>
5						<b>0.147</b>	<b>0.032</b>	<b>0.697</b>	<b>0.294</b>	<b>0.268</b>	<b>0.731</b>
6							0.020	<b>0.190</b>	0.139	0.133	<b>0.471</b>
7								<b>0.516</b>	0.079	0.039	<b>0.598</b>
9									<b>0.551</b>	<b>0.548</b>	0.712
10										0.047	<b>0.588</b>
11											<b>0.566</b>



**Gráfico 1.** Red de haplotipos generadas mediante SP derivados de secuencias del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I en el mosquito *Culex annulirostris* distribuido en la región de Australasia construida bajo el enfoque MJ (Median-Joining Network) en el mosquito *Culex annulirostris* distribuido en la región de Australasia. Los círculos delimitan los linajes intraespecíficos.

La posición de los haplotipos en la red bajo SP (Statistical Parsimony Network) indicó cinco grupos diferenciados (Gráfico 2.): Haplotipos de las poblaciones de las Islas Salomón, Haplotipos de las poblaciones del sur de Australia y un haplotipo de la región 3 en Australia continental contigua a la región 6 al sur de Australia,



**Gráfico 2.** Red de haplotipos generada mediante SP derivados de secuencias del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I en el mosquito *Culex annulirostris*, distribuido en la región de Australasia. Los círculos delimitan los linajes intraespecíficos

Haplotipos de la población de Papúa Nueva Guinea y algunos haplotipos de las poblaciones en el estrecho de Torres, Haplotipos de las poblaciones de Papua Nueva Guinea con un haplotipo de la región 2 en la península del cabo York, Haplotipos de las Poblaciones de Australia continental y el haplotipo de la región de Timor Leste al igual que algunos haplotipos de las regiones de Papua Nueva Guinea.

Los resultados de la filogenia bajo el enfoque ABC fueron tomados de Hemmerter *et al.* (2007), mostraron cinco linajes intraespecíficos diferenciados dentro del árbol de haplotipos para *Culex annulirostris*: ann-AUS (Gráfico 3.): haplotipos presentes en poblaciones de Australia continental, ann-S-AUS: haplotipos presentes en las poblaciones del sur de Australia, ann-IS: haplotipos de

las poblaciones de las Islas Salomón, ann-PNG-2: haplotipos presentes en las poblaciones de Papua Nueva Guinea, estrecho de Torres y el cabo York en el Norte de Australia, ann-PNG-2: haplotipos de Papua Nueva Guinea.

Los gráficos para las tres metodologías parecen presentar historias filogenéticas similares, no obstante con algunas diferencias.

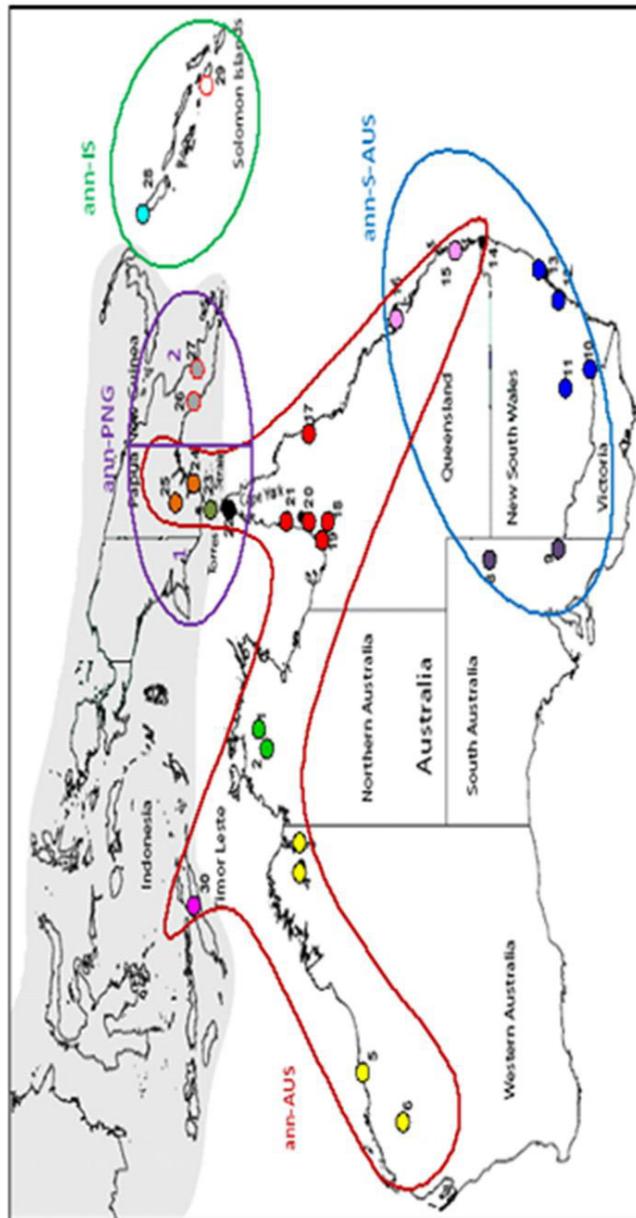
Las redes filogenéticas construidas bajo el enfoque MJ y SP son altamente concordantes y apoyan la asignación de linajes propuesta por Hemmerter *et al.* (2007) aunque difieran en 16 haplotipos presentes en poblaciones de Papua Nueva Guinea (Gráficos 1 y 2). Las dos metodologías exponen los linajes de ann-IS, ann-S-AUS y ann-PNG-1 bien establecidas y delimitadas, siendo la agrupación de los haplotipos igual en ambas metodologías; sin embargo, el linaje ann-PNG-2 no parece diferenciarse del linaje ann-AUS en la red bajo MJ, esto se debe a las múltiples conexiones bajo MJ que dificulta su interpretación, por otro lado, la metodología SP muestra claramente ann-PNG-2.

Los linajes ann-PNG-1 y ann-PNG-2 presentan una importancia relevante debido a que su distribución concuerda con el límite del virus de la encefalitis japonesa (JEV); esto a su vez coincide con los resultados presentados por Hemmerter *et al.* (2007 – 2009), que establece el norte de Australia como zona de amortiguamiento para el virus JEV.

Adicionalmente a la construcción filogenética para *Culex annulirostris* mediante tres enfoques metodológicos, se realizó un análisis filogeográfico mediante la metodología NCPA, la anidación para esto se tomó la red obtenida mediante parsimonia estadística. Los resultados de asignación de clados sobre la geografía (figura 1 y tabla 3.) concuerdan con los linajes establecidos bajo las metodologías SP y MJ

## DISCUSIÓN

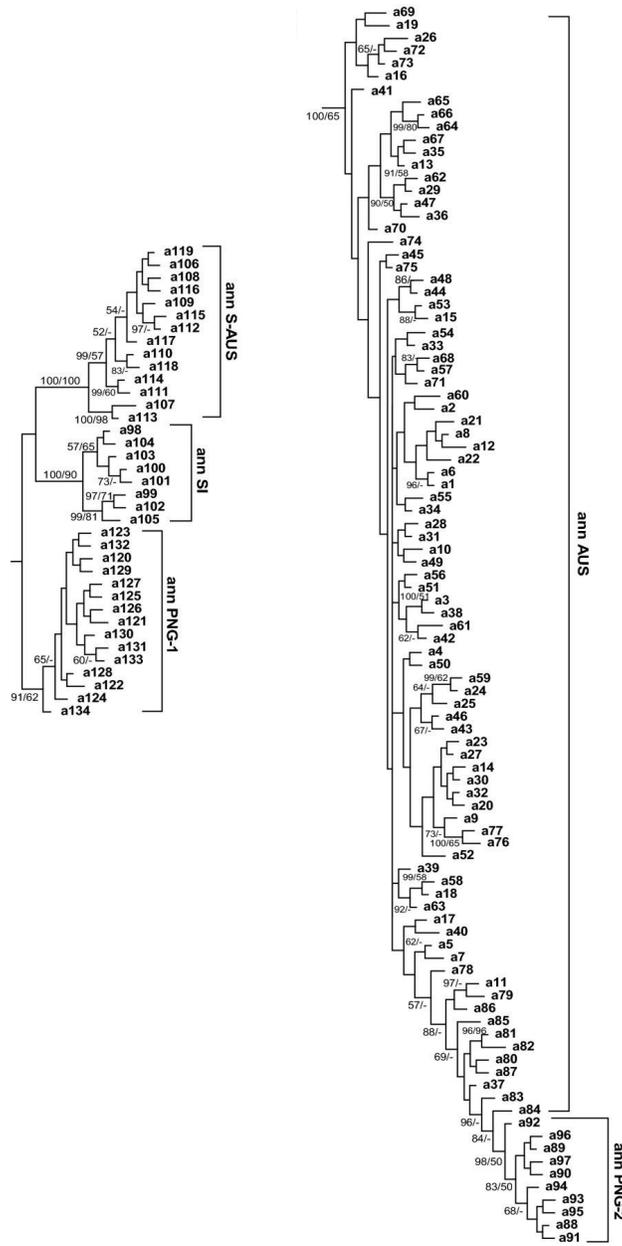
Los métodos de construcción filogeográfica bajo el enfoque de “Statistical Parsimony” y “Median Joining” establecen una red para *Culex annulirostris* que comprende 4 linajes bien delimitados: ann-AUS, ann-S-AUS, ann-IS y ann-PNG. El linaje ann-PNG se divide a su vez en dos linajes, ann-PNG-1 y ann-PNG-2, contiguos geográficamente, pero que presentan diferentes ubicaciones dentro de la reconstrucción filogeográfica;



**Figura 1.** Ubicación geográfica de las poblaciones muestreadas y los linajes de *Culex annulirostris* en Australia, sur de Papua Nueva Guinea, Timor Leste e Islas Salomón

CLADO	Dc	Dn	INFERENCIA
2-8 (interior)	187,88 S	811,43	Expansión de rango continua
3-1 (punta)	828.72	1589.15	Fragmentación pasada seguida de rango de expansión
3-2 (interior)	986,73 S	992,69 L	Colonización desde una gran distancia seguida de un proceso de expansión de rango amplio
3-4 (punta)	194.21 S	495.89	Flujo de genes restringido con aislamiento por distancia
3-6 (punta)	1128.00	1502.60 L	Flujo de genes restringido con aislamiento por distancia
3-7 (punta)	416.38 S	1075.89	Colonización desde una gran distancia y/o fragmentación en el pasado
4-1 (punta)			Expansión de rango continua
4-2 (punta)			Fragmentación alopátrica
4-3 (punta)			Fragmentación alopátrica

**Tabla 3.** Clave de inferencia de Templeton (2004) para datos originados a partir de la red de bajo SP, derivados de secuencias del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I en el mosquito *Culex annulirostris* distribuido en la región de Australasia.



**Gráfico 3.** Árbol filogenético presentado por Hemmerter et al. (2007) bajo el enfoque de aproximación bayesiana. Red de haplotipos derivados de secuencias del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I en el mosquito *Culex annulirostris* distribuido en la región de Australasia

esta designación de linajes concuerda con la establecida por Hemmerter *et al* (2007) quienes sugieren que los cuatro linajes divergentes indican aislamiento alopatrico.

El linaje ann-AUS se establece en Australia continental, cuenta con poblaciones contiguas con flujo de genes entre las poblaciones más cercanas, y muestra una estruc-

tura genética con poca o modera diferenciación entre las poblaciones. Este linaje es contiguo geográficamente al linaje ann-S-AUS del sur de Australia, sin embargo, parece haber poco flujo génico entre las poblaciones de ambos linajes por lo que se sugiere la existencia de divergencia para las poblaciones del sur de Australia y Australia continental.

El linaje ann-IS se encuentra restringido a las Islas Salomón, esto concuerda con los resultados presentados por Hemmerter *et al.* (2007): “El linaje ann-IS incluye individuos del norte y del sur las Islas Salomón y probablemente representa una especie insular del Pacífico”, Por otro lado, los linajes ann-PNG representan un caso importante no solo por la ubicación dentro del clado, sino porque la distribución de estos linajes concuerda con los límites de distribución del virus de la encefalitis japonesa.

Considerando lo anterior, podría esperarse que a medida que se alejan las poblaciones de Papua Nueva Guinea del estrecho de Torres, las distancias genéticas con los linajes Australianos será mucho mayor. En este sentido se entiende que la actividad de *Culex annulirostris* como vector de JEV se encuentre en la región del estrecho de Torres y el cabo York en el norte de Australia, justo en el límite entre los linajes ann-PNG y ann-AUS. En ese caso, el establecimiento de JEV en Australia continental se encuentra a cargo del linaje ann-AUS.

Considerando la divergencia, es evidente que el linaje ann-AUS no tiene la capacidad de establecer JEV en el continente Australiano, idea apoyada por diversos estudios (1, 2, 4, 9, 16, 17) a pesar de las condiciones factibles para el establecimiento de JEV en Australia y el potencial de *Culex annulirostris* como colonizador: “*Culex annulirostris* es una especie de temporada que se destaca por su capacidad de colonizar rápidamente superficies de agua temporales y semipermanentes, especialmente los resultantes de la humedad generada por las lluvias de la temporada” (18).

Considerando lo anterior es importante reconocer las áreas con mayor densidad de cerdos en las zonas como zona de alimentación de preferencia para los mosquitos, posible que estas zonas representen focos de propagación del virus y su relación con las poblaciones de vectores; en este sentido (17) encuentran que las áreas con mayor número de cerdos en Australia se encuentran en el Cabo York y están representados por algunos cerdos domésticos y cerdos salvajes en zonas aledañas a las poblaciones, en la región de Papua Nueva Guinea.

Este trabajo solo muestra una asociación entre los límites de linajes intraespecíficos para *Culex annulirostris* en la región con relación a los límites de la actividad de la encefalitis japonesa JEV al norte de Australia. Se destaca la complejidad y diferencia del papel de *Culex annulirostris* como vector de JEV en Australia y Papua

Nueva Guinea y se reconoce a JEV como una enfermedad emergente en Australia (3, 17). Aunque los métodos de construcción filogeográfica son ampliamente utilizados, hay pocos estudios que describen su rendimiento y dada su importancia es necesario realizar análisis comparativos que muestren las diferencias entre los métodos. En este sentido el objetivo de este estudio es comparar la fidelidad de los gráficos filogeográficos obtenidos para *Culex annulirostris* (10, 19).

En este estudio se emplean tres representaciones gráficas de la filogeografía de *Culex annulirostris* bajo tres enfoques metodológicos. Dos de ellas son redes filogeográficas bajo los enfoques MJ y SP y un gráfico tipo árbol que fue tomado de Hemmerter *et al.* (2007) bajo el enfoque ABC. Los métodos MJ y SP arrojan gráficos en forma de red, la principal diferencia entre los dos es que en SP los bucles en la red son resueltos, mientras en el enfoque MJ las reticulaciones o bucles no se resuelven, resultado de secuencias consenso incluidas en la red que indican eventos poblacionales que crean múltiples asociaciones.

Los resultados de Hemmerter *et al.* (2007) fueron corroborados por los métodos de construcción bajo MJ y SP; sin embargo, el gráfico presentando por el autor presentó muchas diferencias. Básicamente, estas fueron debidas a la ubicación de algunos haplotipos dentro del árbol como el caso del linaje ann-IS junto a haplotipos de Papua Nueva Guinea, para los casos de las redes bajo MJ y SP el linaje ann-IS solo mostró haplotipos de las Islas Salomón.

La razón de estas diferencias tiene fundamentos tanto en la estadística de las pruebas como en las características del gráfico. En este sentido diferentes investigadores (10-15), encuentran que los gráficos en forma árbol bifurcados presentan algunas ambigüedades debido a que cada haplotipo solo tiene la posibilidad de una conexión, mientras que los gráficos tipo red como los obtenidos por MJ y SP revelan mejor las relaciones de los haplotipos a nivel de población.

Considerando lo anterior, las relaciones reticuladas representan mejor las relaciones dentro de la población que los métodos tradicionales bifurcados que no tienen en cuenta las relaciones evolutivas dentro de la población (20). Teniendo esto en cuenta, los gráficos en forma de red propuestos para *Culex annulirostris* bajo los enfoques MJ y SP, representan mejor la filogeografía para la especie en el área geográfica y da mayor apoyo

a la asignación de linajes propuesto por Hemmerter *et al.* (2007).

Aunque los resultados encontrados para la redes filogeográficas en *Culex annulirostris* no sugieren diferencias significativas, las diferencias de ubicación de haplotipos encontradas dentro de la red pueden tener una explicación metodológica. El enfoque MJ sigue el criterio de Máxima Parsimonia (MP) que construye las conexiones entre los haplotipos con el mínimo número de pasos mutacionales entre dos secuencias, por su lado, la parsimonia estadística (SP) no solo tiene en cuenta las conexiones con menor pasos mutacionales entre dos secuencias, sino la probabilidad de mutación, de esta manera se reducen las posibilidades de conexión a la red (21).

Aunque el nivel de compatibilidad entre los patrones genealógicos y la construcción de gráfico es una importante medida de la eficacia de un método, es también necesario establecer comparaciones estadísticas en la topología de las redes que cuantifiquen el rendimiento de los métodos; sin embargo establecer las fortalezas y debilidades de los métodos de redes y la comparación de las diferentes estrategias de construcción no es sencillo (20).

Los resultados descritos por NCPA pueden interpretarse bajo dos historias filogeográficas (hipótesis filogeográficas), una de ellas es un evento de expansión desde Nueva Guinea hacia Australia y la otra implica un evento de divergencia; las dos posibles hipótesis se describen a continuación, partiendo de la base que ambas encuentran apoyo en los clados anidados por NCPA y los linajes filogeográficos presentados por las metodologías MJ y SP.

Una posible hipótesis sugiere que los procesos de expansión de *Culex annulirostris* se dan desde Papua Nueva Guinea hacia el norte de Australia a través del cabo York, luego se expande hacia el oriente y occidente y diverge en el sur de Australia, siendo las islas Salomón un linaje insular más reciente. La otra posible hipótesis de la historia de los haplotipos sugiere un evento de rango de expansión pasado en el territorio que comprende Australia y Nueva Guinea con un posterior evento de fragmentación causada por la formación del estrecho de Torres, posteriormente se da la divergencia de las poblaciones de Australia y Nueva Guinea, siendo las Islas Salomón un linaje insular.

Aunque estas inferencias encuentran apoyo en los análisis filogeográficos y en los valores de *Fst* entre poblaciones, no deben ser tomadas a la ligera y solo plantean posibles escenarios históricos de distribución de los haplotipos de la especie en la región. NCPA ha sido criticado debido a sus limitaciones asociadas a la sensibilidad de la resolución genética que genera, el tamaño y amplitud del muestreo y la carencia de límites de confianza de la clave de inferencia (21), factores que conllevan a inferencias erróneas bajo este método. A pesar de esto, este estudio apoya la sugerencia de que NCPA tiene un mejor rendimiento evaluando casos reales (2, 11-22) y no simulados (21).

En este sentido se debe considerar que las inferencias filogeográficas presentan limitaciones y factores que limitan las inferencias biológicas; uno de los límites es el tamaño de muestra. “En general, cuanto mayor sea el tamaño de muestra, más potencia hay para hacer inferencias, dado que los acontecimientos históricos de mayor tiempo pasado y los procesos de influencia de muchas poblaciones y haplotipos son generalmente más fáciles de detectar que los acontecimientos más recientes, que generalmente afectan a una mayor parte de la muestra” (13).

En este estudio, aunque las inferencias biológicas parecen estar bien soportadas y encuentran apoyo en las comparaciones realizadas y en los resultados encontrados por Hemmerter *et al.* (2007, 2009), se considera que el diseño de muestreo es escaso y no representa toda el área de interés, dado que los individuos por población para la región son bajos: 13 en las islas Salomón y 8 en Timor Leste, donde sólo hay un individuo analizado. Asimismo, faltan muestreos mejorar la resolución filogeográfica.

## CONCLUSIONES

La distribución geográfica de las diferentes linajes de *Culex annulirostris* sugiere alta diversidad biológica evaluada a través de diferentes metodologías filogeográficas, indicando que zonas de amortiguación natural (en este caso Australia) pueden ser identificadas en otras zonas del mundo.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Hemmerter S, Šlapeta J, van den Hurk AF, Cooper RD, Whelan PI, Russell RC, Johansen CA, Beebe NW. A Curious Coincidence: Mosquito Biodiversity and the Limits of the Japanese encephalitis virus in Australasia. *BMC Evolutionary Biology*. 2007; 7:100
2. Domínguez Domínguez O, Vázquez Domínguez E. Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación. *Animal Biodiversity and Conservation*. 2009; 32(1): 59 - 70
3. Hanna JN, Ritchie SA, Phillips DA, Shield J, Bailey MC. An outbreak of Japanese encephalitis in the Torres Strait, Australia. *Med. J. Aust.* 1996; 165:256
4. Hemmerter S, Šlapeta J, Beebe NW. Resolving genetic diversity in Australasian *Culex* mosquitoes: Incongruence between the mitochondrial cytochrome c oxidase I and nuclear acetylcholine esterase 2. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2009; 50 (2): 317-325
5. Mackenzie JS, Williams DT, Smith DW. Japanese encephalitis virus: the geographic distribution, incidence, and spread of a virus with a propensity to emerge in new areas. In *Emerging Viruses in Human Populations*, ed. E Tabor, Amsterdam: Elsevier. 2007; 201–68
6. Bradbury J. Beyond the fire-hazard mentality of medicine: the ecology of infectious diseases. *Plos. Biol.* 2003; 1(2): 148-151
7. Kay BH. Seasonal Abundance of *Culex annulirostris* and Other Mosquitoes at Kowanyama, North Queensland, and Charleville, South West Queensland (Pt. 5). 1979; 497-508
8. Rozas J, Sánchez-delbarrio JC, Messeguer X, Rozas, R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*. 2003; 19: 2496-2497
9. Network 4.5.1.0. User Guide. Copyright © Fluxus Technology Ltd. 2008
10. Clement M, Posada D, Crandall KA. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*. 2000; 9(10): 1657-1660.
11. Templeton AR. *Population Genetics and Microevolutionary Theory*. A John Wiley & Sons., Inc. 2006; 70
12. Posada D, Crandall KA, Templeton AR, Program Note. Nested Clade Analysis Statistics. *Molecular Ecology Notes*. 2000; 6: 590–593
13. Templeton AR. Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. *Molecular Ecology*. 2004; 13: 789–809
14. Hudson R. A New Statistic for Detecting Genetic Differentiation. *Genetics*. 2000; 155: 2011-2014
15. Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ver 3.01. An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. Copyright 1995-2006
16. Mackenzie JS, Johansen CA, Ritchie SA, van den Hurk AF, Hall RA. Japanese encephalitis as an emerging virus: the emergence and spread of Japanese encephalitis virus in Australasia. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2002; 267: 49-73
17. Van den Hurk AF, Ritchie SA, Mackenzie JS. Ecology and Geographical Expansion of Japanese Encephalitis Virus. *Annu. Rev. Entomol.* 2009; 54: 17-35
18. Chapman HF, Kay BH, Ritchie SA, Van Den Hurk AF, Hughes JM. Definition of Species in the *Culex sitiens* Subgroup (Diptera: Culicidae) from Papua New Guinea and Australia. *J. Med. Entomol.* 2000; 37(5): 736-742
19. Gascuel O. *Mathematics of Evolution and Phylogeny*. Oxford University Press Inc. First published 2005.
20. Posada D, Crandall KA, Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology & Evolution* 2001. Vol.16 No.1 January
21. Cassens I, Mardulyn P, Milinkovitch MC. Evaluating Intraspecific “Network” Construction Methods Using Simulated Sequence Data: Do Existing Algorithms Outperform the Global Maximum Parsimony Approach? *Syst. Biol.* 2005; 54(3): 363–372
22. Templeton AR. Coalescent-based, maximum likelihood inference in phylogeography. *Molecular Ecology*. 2010; 19: 431- 446.