

VARIASI GENETIK ANOPHELES SUNDAICUS BERDASARKAN SEGMENT ITS2 DNA RIBOSOM DAN GEN COI DNA MITOKONDRIA

(GENETIC DIVERSITY IN ANOPHELES SUNDAICUS USING ITS2 RIBOSOMAL DNA REGION AND COI MITOCHONDRIAL DNA REGION)

Irfanul chakim ¹

¹Fakultas Kesehatan Masyarakat, Universitas Muhammadiyah Semarang
email: irfan.unimus@gmail.com

Abstract

Entomological study with laboratory analysis done on Anopheles sundaicus mosquitoes as a malaria vector. The aim is to determine the existence of genetic variation in the Anopheles sundaicus species. PCR was used for the molecular identification of An. Sundaicus using COI and ITS2 genes. COI and ITS2 sequences in the study group compared with An. Epiroticus from GenBank. The comparison were done using a multiple sequence alignment program of Bioedit 7.1.9. The phylogenetic tree were constructed using neighbor-joining and bootstrap- tested by MEGA6. ITS2 sequence alignment results showed a single nucleotide substitution that can be used as markers for species determination. Phylogenetic tree analysis based on COI gene showed that An. Sundaicus in this study with isolates from GenBank, separate into two different groups or are polyphyletic. This study proved that An. Sundaicus from field collection was An. Epiroticus species by molecular identification. This study can be used to help public health policy related to vector control.

Keywords: PCR, COI, ITS2, An. Sundaicus, An. Epiroticus

PENDAHULUAN

Malaria masih merupakan salah satu masalah kesehatan masyarakat yang utama, karena mempengaruhi angka kesakitan bayi, balita, dan ibu melahirkan, serta menimbulkan kejadian luar biasa (KLB) (Harjanto PN, 2012). Penyakit ini disebabkan oleh protozoa genus plasmodium aseksual, yang masuk ke dalam tubuh manusia dan ditularkan oleh nyamuk *Anopheles* (Prabowo, 2004).

Spesies *An. Sundaicus* merupakan anggota dari spesies kompleks yang dikenal sebagai spesies sibling, cryptic atau isomorfik (WHO, 2007). Spesies sibling merupakan spesies yang sulit atau tidak mungkin untuk dibedakan berdasarkan karakter morfologi (Knowlton et al, 1993). Namun setiap spesies tersebut mempunyai perilaku bionomik yang berbeda (WHO, 2007; Elyazar et al, 2013).

Perbedaan karakteristik biologis dari anggota spesies kompleks berpengaruh penting terhadap dinamika penularan malaria. Oleh karena itu, penting untuk menentukan determinasi dan bionomik spesies sibling serta peran spesies tersebut di dalam penularan malaria. Teknik morfologi dianggap kurang efektif karena variabilitas dari karakteristik morfologi intraspesies, keterbatasan sumber daya, dan kemunculan spesies cryptic dalam berbagai taksa *Anopheles* (Elyazar et al, 2013). Sehingga karakterisasi genetik lebih luas digunakan karena memberikan identifikasi yang lebih pasti. Sekuensing DNA yang dapat memunculkan RNA ribosom (rRNA) secara luas di gunakan untuk analisis filogenik dari hubungan organisme yang sangat dekat termasuk nyamuk (Surendan, 2010).

Berbagai marker genetik dipilih dan di seleksi untuk tujuan studi tertentu. Sekuen gen

seperti internal transcribed spacer 1 dan 2 (ITS1 dan ITS2) atau DNA ribosom (rDNA), mitokondria cytochrome oxidase subunit I dan II (COI dan COII), dan D3 (28S rDNA) sangat membantu dalam identifikasi spesies dan analisis filogenetik. Diantara sekuen gen tersebut, ITS2 dari rDNA telah di temukan dan di gunakan untuk klasifikasi taksonomi (Cong et al, 2005; Coleman, 2003; Alvares, 2003; Linton et al, 2005; Sinka, 2011). Sampai saat ini, sekuen ITS2 rDNA telah berhasil di gunakan untuk membedakan anggota beberapa spesies *anopheles* kompleks, seperti grup *An. hyrcanus* (Coney et al, 2005), kompleks *An. Dirus* (Walton et al, 1999) dan grup *An. Maculatus* (Walton et al, 2007). Selain itu genom mitokondria telah di gunakan secara luas dalam studi evolusi molekuler (Bowling, 2000) dan gen COI telah memisahkan hubungan evolusi antara spesies yang terkait erat pada berbagai taksa (Avisé, 1994; Avisé, 2000), termasuk serangga (Brown et al, 1994; Lunt et al, 1996) dan kompleks cryptic spesies (Walton et al, 2000; Salvato et al, 2002).

Spesies *An. Balabacensis* yang berasal dari purworejo menunjukkan variasi genetik namun masih berada dalam kerangka/batasan satu spesies dengan bionomik yang seragam (Hadi permana, 2010). Selain itu ITS2 dan COI juga mengungkapkan dua clades yang berbeda dari kompleks *subpictus* di sri lanka yang terdiri dari dua spesies genetik yang berbeda sesuai dengan spesies A dan spesies B dari india (Surendan et al, 2014).

Kompleks *An.sundaicus* merupakan salah satu vektor malaria yang paling penting di Indonesia (Sukowati, 1996). Distribusi *An.sundaicus* telah di laporkan di seluruh pulau di indonesia, kecuali papua. Beberapa peneliti

juga telah mengkonfirmasi spesies ini sebagai vektor penting malaria di Jawa, Sulawesi, dan yang terbaru di Sumba Barat (Elyazar, 2013). *An. sondaicus* merupakan vektor penyakit potensial yang paling sering di temukan di sepanjang pantai Sumba Barat bersama dengan *An. subpictus* dan *An. vagus* (Barbara Kathrin et al, 2011).

Survey yang dilakukan oleh William et al di Sumba Barat menunjukkan bahwa prevalensi keseluruhan kejadian infeksi malaria di Kabupaten Sumba Barat pada musim hujan mencapai 6,83% (95% CI, 4,40, 9,26) dan 4,95% (95% CI, 3,01, 6,90) di musim kemarau pada tahun 2009. Hal ini meningkatkan kondisi endemisitas malaria di Sumba dari hipoendemik menjadi mesoendemik (Rogers et al, 2009).

Sampai saat ini belum ada data/penelitian mengenai variasi genetik pada nyamuk *Anopheles sondaicus* sebagai vektor utama di Sumba. Sedangkan pada saat yang sama kejadian malaria menjadi endemik di daerah tersebut. Oleh karena itu, perlu adanya penelitian tentang variasi genetik *An. sondaicus* di Sumba untuk basis data bagi pengendalian vektor malaria sebagai upaya eradikasi malaria di daerah tersebut.

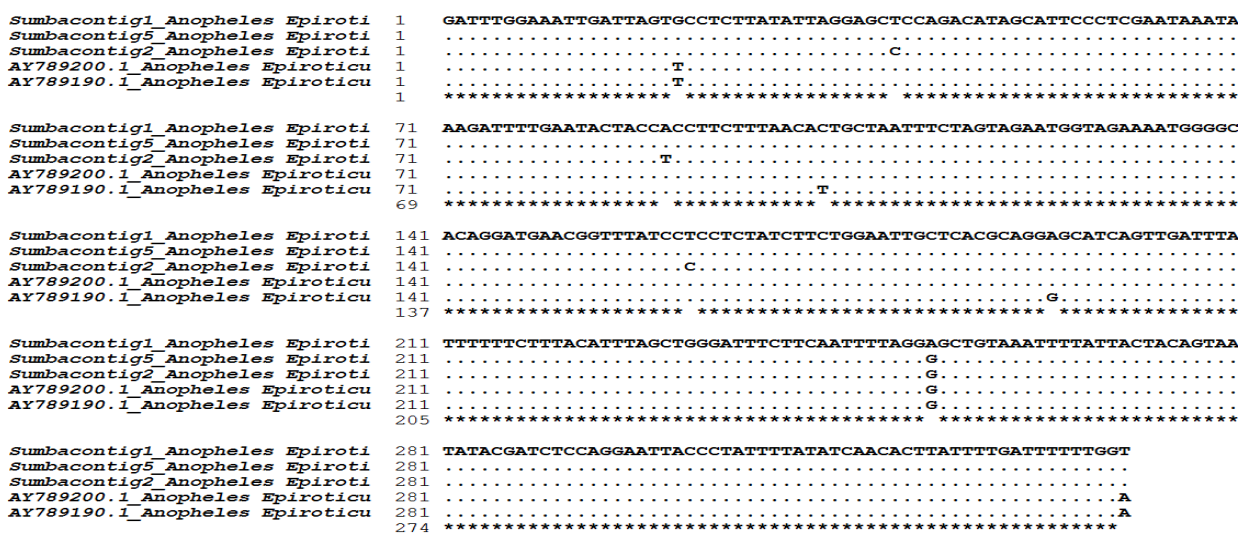
METODE PENELITIAN

Spesimen nyamuk

Spesimen merupakan nyamuk *Anopheles sondaicus* yang teridentifikasi sebagai *An. Sondaicus* secara morfologi yang berasal dari Sumba, Nusa Tenggara Timur. Pengerjaan laboratorium dilakukan di Laboratorium biologi molekuler Eijkman, Jakarta Pusat.

Tabel 1. Lokasi situs polimorfik berdasarkan status variasi dan alel spesifik

Gen	Situs polimorfik	Posisi	
		Varian tunggal	Multi varian
ITS2	3	Basa ke-479	Basa ke-538, 652
COI	7	Basa ke-24, 48, 492	Basa ke-42, 93, 165, 255



Gambar 1. 522 basa wilayah COI anopheles epiroticus Sumba dibandingkan dengan isolat dari GeneBank (basa ke-300 sampai 450 telah dipotong). Terdapat 8 variabel basa interspesifik.

```

Sumba1_Anopheles Sundaicus 300 TCGAGTTTGGTGCAATCGGATGCCTACTACCATGGGCGGTGCCGGCGTGC
Sumba2_Anopheles Sundaicus 300 .....
Thailand_AF469856.1_Anopheles 300 .....
*****

Sumba1_Anopheles Sundaicus 350 ATTCAACACTCGACGTGCGTGTCTGTATCAACCGGATGCCAAGTCCGCT
Sumba2_Anopheles Sundaicus 350 .....
Thailand_AF469856.1_Anopheles 350 .....T..
346 *****

Sumba1_Anopheles Sundaicus 400 GTCAGTTGGTGGTGTGCGGCGCAGACAGGACGCGCGGTACGCTTGAGTCG
Sumba2_Anopheles Sundaicus 400 .....
Thailand_AF469856.1_Anopheles 400 .....
396 *****

Sumba1_Anopheles Sundaicus 450 TGTAACGCGTGCAGCCATACACGTACCTGCTTGAGCTGTGCGTTGCGAG
Sumba2_Anopheles Sundaicus 450 .....T.....
Thailand_AF469856.1_Anopheles 450 .....
446 *****

Sumba1_Anopheles Sundaicus 500 CTGGAGAGTTGCCAGACGGAGCAAATACCACATACTCCAGTAGGCCTCAA
Sumba2_Anopheles Sundaicus 500 .....
Thailand_AF469856.1_Anopheles 500 .....
496 *****

Sumba1_Anopheles Sundaicus 550 GTGATGTGTGACTACCCCTGAATTTAAGCAT
Sumba2_Anopheles Sundaicus 550 .....
Thailand_AF469856.1_Anopheles 550 .....A.....

```

Gambar 2. 663 basa wilayah ITS2 *Anopheles sundaicus* dan *Anopheles epiroticus* Sumba dibandingkan dengan isolat GeneBank (dimulai dari basa ke-300). Terdapat 3 situs polimorfik pada basa ke-479,538 dan 632.

HASIL

Hasil sekuen COI

Sekuen COI 22 sampel *Anopheles sundaicus* yang berasal dari 3 desa hasil pengambilan secara acak telah diteliti. Verifikasi sekuen COI di lakukan dengan metode *blasting* dengan cara membandingkan sekuen tersebut pada GenBank. Hasil verifikasi sekuen COI pada GenBank menunjukkan bahwa dari 22 sampel yang diblasting, semuanya teridentifikasi sebagai spesies *An. Epiroticus* (AY789200.1 dan AY789190.1).

Pensejajaran (*alignment*) sekuen COI *An. Sundaicus* dilakukan dengan menggunakan aplikasi BioEdit versi 7.1.9. Pohon filogenetik di buat dengan aplikasi MEGA 4 dengan metode *maximum likelihood* berbasis pada model *neighbor-joining* dengan tes *bootstrap* (1000 kali pengulangan). Hubungan evolusi dari gen COI dari semua taksa merepresentasikan sejarah evolusi dari taksa yang telah di analisis. Persentase dari pohon di mana taksa terkait berkumpul bersama-sama dalam sebuah *cluster* ditampilkan di sebelah cabang. Pohon tersebut dipresentasikan dalam bentuk skala, dengan panjang cabang pada unit yang sama sebagai gambaran hubungan jarak evolusi yang digunakan untuk menyimpulkan pohon filogenetik tersebut.

Hasil perbandingan nilai *p-distance* sekuen COI *anopheles sundaicus* dan *Anopheles epiroticus* dari sumba (AY789200.1 dan AY789190.1) menunjukkan bahwa terdapat 0-1% variasi nukleotida (0.00-0.01 *p-distance* value). Sebaliknya, perbandingan antara *An. Gambiae* sebagai taksa *outgroup* menunjukkan 2.60-2.74 *p-distance* value. Jumlah situs polimorfik antara *An. Sundaicus* pada studi ini dan sekuen *An. Epiroticus* dari GenBank di estimasi menggunakan DnaSp 5.10.1.

Pohon filogenetik dari gen COI menunjukkan adanya perbedaan percabangan antara kelompok sekuen *An. Sundaicus* pada kajian ini dengan *An. Epiroticus* dari GenBank (AY789200.1 dan AY789190.1). Namun terdapat beberapa variasi intraspesies *An. Sundaicus* pada kajian ini namun masih dalam *cluster* yang sama.

Hasil sekuen ITS2

27 sekuen nukleotida dari *Anopheles sundaicus* dari sumba, nusa tenggara timur telah di teliti dan disejajarkan menggunakan BioEdit versi 7.1.9. Hasil dari pensejajaran sekuen kemudian dibuat pohon filogenetik menggunakan MEGA 4 dengan metode *maximum likelihood* berbasis pada model *jukes-cantor* dengan tes *bootstrap* (1000 kali pengulangan).

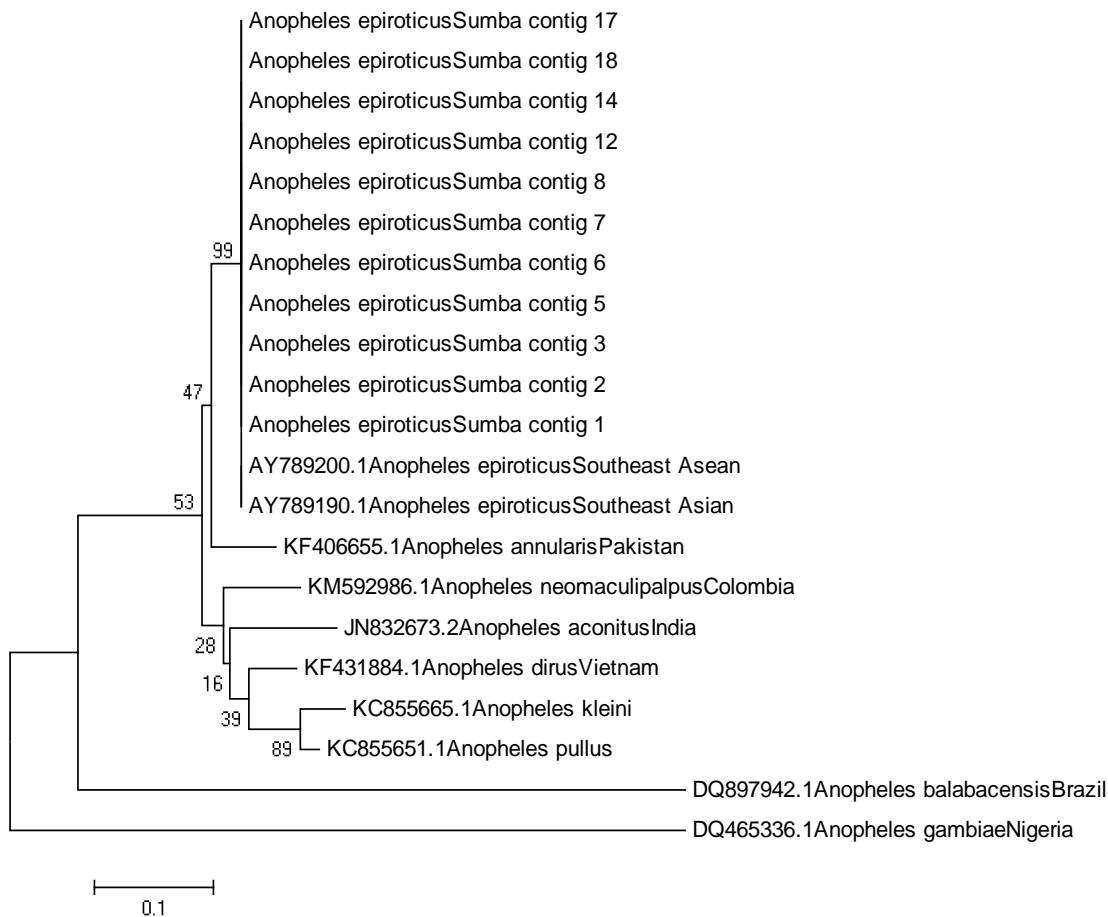
Terdapat 3 situs polimorfik yang dihitung menggunakan DnaSp 5.10.1 antara sekuen *Anopheles sundaicus* pada studi ini dengan *An. epiroticus* (AF469856.1) dan *An. Sundaicus* (AF369550.1) dari GenBank. ketiga situs polimorfik tersebut 1 merupakan *singleton variable sites* dan 2 lainnya adalah *parsimony informative sites*.

Sekuen ITS2 untuk *multiple alignment*

An. Epiroticus (AF469856.1) dan 1 sampel sebagai *An. Sundaicus* (AF369550.1).

Pada penelitian ini menemukan 3 tempat polimorfis pada sekuen *An. Sundaicus* dari sumba pada posisi 479 (T→C), 538 (G→T), dan 652 (A→G).

Analisis filogenetik dari sekuen ITS2 menunjukkan bahwa sekuen tersebut dipisahkan menjadi dua cabang utama. Cabang yang



Gambar 2. Analisis filogenetik sekuen COI *An. Sundaicus* menggunakan metode neighbor joining. *Anopheles epiroticus* dari Sumba menunjukkan adanya kesamaan percabangan dengan *An. epiroticus* dengan *accession number* AY789200.1 dan AY789190.1. Sedangkan *An. annularis*, *An. neomaculipalpus*, dll merupakan taksa *outgroup*.

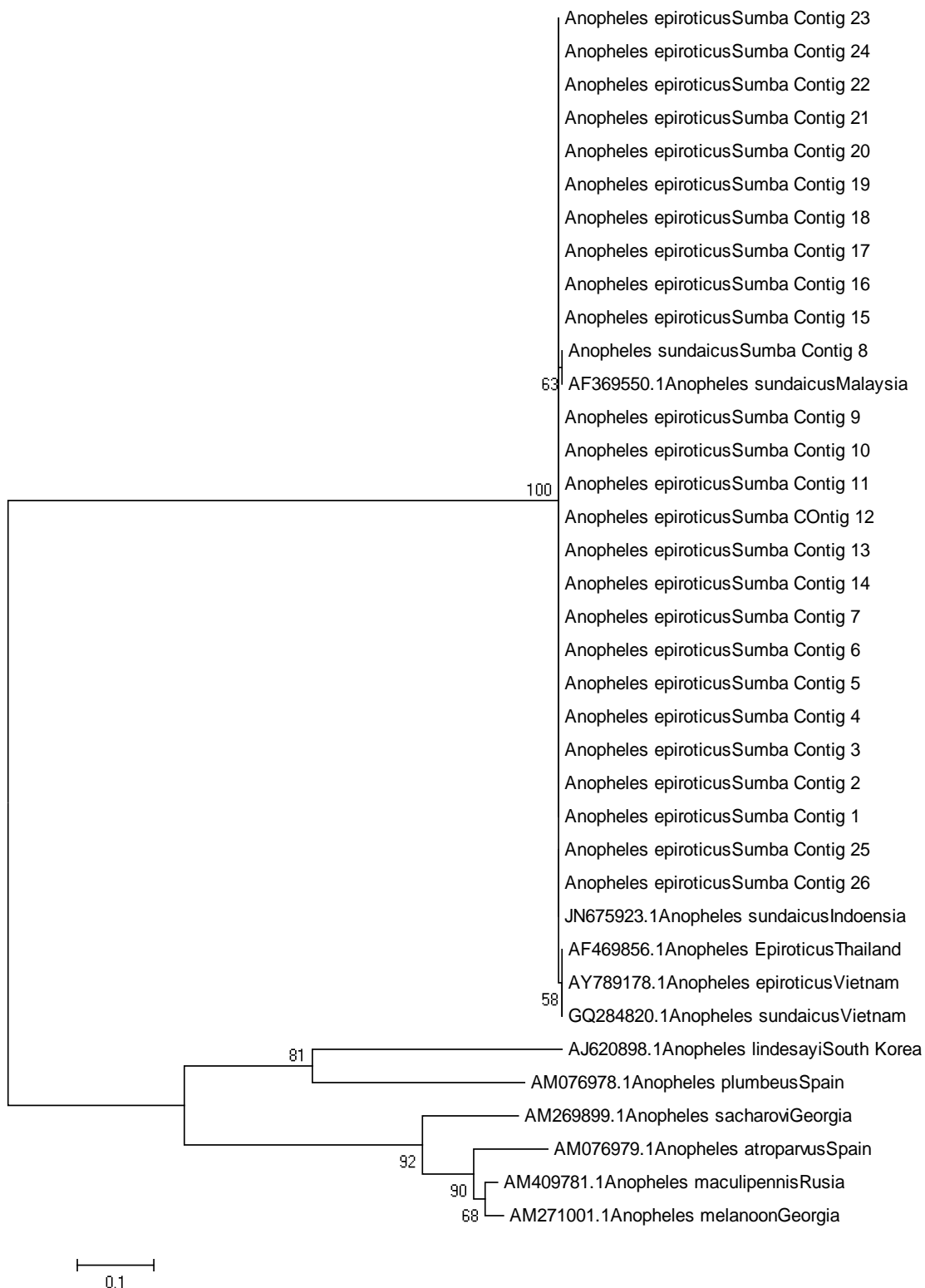
menggunakan 663 bp *An. Sundaicus* pada studi ini yang dibandingkan dengan 663 bp sekuen *An. Epiroticus* dengan nomer akses AF469856.1 dan *An. Sundaicus* dengan nomer akses AF369550.1 dari GenBank. Hasil verifikasi GenBank sekuen ITS2 *An. Sundaicus* pada studi ini menunjukkan 26 sampel diidentifikasi sebagai

pertama merupakan bagian dari *An. Epiroticus*, *An. sundaicus* dari beberapa daerah yang berkelompok bersamaan dengan sampel dan cabang yang kedua bagian dari taksa *outgroup*.

PEMBAHASAN

Nilai rata-rata *p-distance* berdasarkan sekuen COI *An. Epiroticus* dari sumba yaitu 1.1%(0-3%), hasil ini sama dengan 1.1% *p-distance* yang diteliti antara *An. Epiroticus* dari thailand serta vietnam (*dusfour et al., 2004*). Serta berhubungan dengan linton *et al* (*p-distance An. Epiroticus* dari cambodia, peninsular malaysia, thailand, dan vietnam yaitu 1.2%) (*Dusfour et al, 2004*). Sekuen COI dari sumba memperoleh 7 situs polimorfik (*variable sites*) yang terdiri dari 3 *singleton variable sites* dan 4 *parsimony variable sites*. sebagai perbandingan studi yang dilakukan oleh linton *et al* (2001), menemukan bahwa terdapat lima situs polimorfik (3 *parsimony informative*, dan 2 lainnya *singleton variable sites*) di dalam sekuen

COI malaysia. Sedangkan studi yang sama oleh suchada (2009) yang dilakukan di thailand menemukan 30 situs polimorfik (24 *parsimony informative sites*, dan 6 *singleton variable sites*). Sehingga sekuen COI penelitian ini mempunyai karakteristik yang hampir sama dengan sekuen COI malaysia di bandingkan dengan thailand. Adanya keberagaman pada sekuen COI disebabkan oleh ukuran dari populasi yang kecil pada saat pengumpulan, mungkin diakibatkan terbatasnya habitat nyamuk pada tahap dewasa (*linton et al., 2001*). Tiga puluh delapan *variable sites* juga terdeteksi pada *aligment* dari bagian gen COI *An. Epiroticus* yang berasal dari cambodia, peninsular malaysia, thailand, dan vietnam (*linton et al., 2005*). Hal ini



Gambar 3. Analisis filogenetik menggunakan metode neighbor joining. Sekuen ITS2 *An. Sundaicus* dan *An. epiroticus* dari Sumba menunjukkan kesamaan percabangan yang sangat dekat dengan *An. Sundaicus* dan *An. epiroticus* dari beberapa daerah di Asia Tenggara.

menunjukkan tingginya variasi nukleotida di dalam sekuen COI dari An. Epiroticus. Berdasarkan analisis filogenetik, semua sekuen COI sampel dan COI An. Epiroticus *accession number* AY789200.1 dan AY789190.1 berada pada percabangan yang sama.

Tidak ada perbedaan intraspesifik diantara sekuen ITS2 pada penelitian ini (0 nilai p-distance). Sekuen ITS2 pada penelitian ini memiliki panjang 663 bp yang sama dengan sekuen yang di dapat oleh linton *et al* (2005). Saat dibandingkan antara sekuen ITS2 sampel dengan sekuen An. Epiroticus (thailand dan vietnam) dari GenBank yang ditemukan oleh linton *et al* (2005) terdapat 3 situs polimorfik. Situs polimorfik tersebut yaitu pada basa ke 479, 538 dan 652 masing-masing menunjukkan transisi T→C, transversi G→T dan transversi A→G. Khusus pada basa ke 538, transversi hanya terjadi pada satu sampel yaitu 5S. Sama halnya dengan penelitian ini, linton *et al* (2005) saat membandingkan An. Epiroticus dari thailand dan vietnam dengan An. Sundaicus s.s dari sarawak. Serta suchada (2009) yang juga membandingkan antara sekuen An. Epiroticus (rayong) dengan An. Sundaicus s.s (malaysia) mendapatkan situs polimorfik pada basa ke 479, 538 dan 603 yaitu adanya transisi T→C, transversi G→T dan insersi C. Namun yang menarik pada penelitian ini adalah ditemukannya transversi A→G pada basa ke 652 yang tidak ditemukan oleh linton *et al* (2005) maupun suchada (2009). Hasil ini sama dengan penelitian pada An. Sundaicus D dari india oleh alam *et al* (2006) yang menemukan satu transisi ketika dibandingkan dengan An. Epiroticus pada basa 431 (C→T) sedangkan An. Sundaicus s.s dari malaysia menampilkan perbedaan pada dua posisi dari An. Sundaicus D. Posisi variable yang pertama merupakan transversi (G→T) pada basa ke 490 dan kedua, delesi dari basa "C" pada posisi ke 555. Ketiga situs di atas dapat digunakan untuk membedakan An. Epiroticus, An. Sundaicus s.s., dan An. Sundaicus D (Sumruayphol, 2009)

Kesimpulannya, perbandingan terhadap ITS2 menunjukkan adanya substitusi *single nucleotide* yang dapat digunakan untuk membedakan An. Sundaicus s.s (sarawak), An. Epiroticus (thailand dan vietnam) dengan An. Epiroticus (sumba). Selain itu substitusi dan penambahan basa (insersi) pada An. Sundaicus D dapat membedakannya dari An. Sundaicus s.s. dari malaysia (linton *et al*, 2001).

Oleh karena itu, sekuen ITS2 dapat digunakan untuk mengidentifikasi An. Epiroticus dan grup kompleks An. Sundaicus yang lainnya. Hal ini sesuai dengan Linton *et al* (2005) yang menyarankan bahwa hanya sekuen ITS2 yang dapat digunakan untuk membedakan spesies kompleks An. Sundaicus.

Tingginya rata-rata perbedaan sekuen intraspesifik dari COI dapat dengan mudah untuk membedakan An. Epiroticus dengan An. Sundaicus. Sedangkan sekuen ITS2 menunjukkan adanya transversi pada basa ke 652 pada penelitian ini yang dapat menjadi tambahan

referensi untuk mempermudah pemisahan spesies.

KESIMPULAN

Identifikasi spesies Anopheles sangat penting untuk memahami dinamika penularan malaria serta perencanaan program pengendalian vektor. Dahulu determinasi spesies menggunakan teknik morfologi. Namun karena tingginya variabilitas intraspesies dan munculnya sibling spesies maka saat ini teknik molekuler lebih banyak digunakan karena dapat memberikan hasil yang lebih baik. Penelitian ini membuktikan bahwa An. Sundaicus dari koleksi lapangan yang menggunakan teknik morfologi ternyata merupakan spesies An. Epiroticus dengan menggunakan identifikasi molekuler. Sehingga sekuen COI dan ITS2 dapat digunakan untuk membedakan antara An. Epiroticus dan An. Sundaicus. Serta dapat mencerminkan proses evolusi yang berkesinambungan.

SARAN

Berbagai spesies nyamuk Anopheles sebagai vektor utama malaria perlu diteliti secara genetik untuk digunakan sebagai basis data bagi pengendalian vektor di indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

- Alam MT, Das MK, Ansari MA, Sharma YD. Molecular Identification of Anopheles (celia) sundaicus from the andaman and nicobar island of india. Acta trop. 2006; 97: 10-18.
- Alvarez I, Wendel JF: Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. Mol Phylogenet Evol 2003, 29:417-434
- Avisé JC: Molecular markers, natural history and evolution Chapman & Hall, New York 1994.
- Avisé JC: Phylogeography. The History and Formation of Species University Press: Massachusetts 2000.
- Barbara, kathryn et al (2011). *Survey of Anopheles mosquitoes (diptera: culicidae) in west sumba district, indonesia.* from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21323168>, 10 september 2014.
- Bowling AT, Ruvinsky A: The Genetics of the Horse CABI Publishing, Wallingford 2000.
- Brown JM, Pellmyr O, Thompson JN, Harrison RG: Phylogeny of Greya (Lepidoptera: Prodoxidae), based on nucleotide sequence variation in the mitochondrial cytochrome oxidase I and II: congruence with morphological data. Mol Biol Evol 1994, 11:128-141.
- Cong Li, Lee JS, Groebner JL, Kim HC, Klein TA, O'Guinn ML, Wilkerson RC: A newly recognized species in the Anopheles Hyrcanus Group and molecular identification of related species from the Republic of South

- Korea (Diptera: Culicidae). *Zootaxa* 2005, 939:1–8.
- Coleman AW: ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparison. *Trends Genet* 2003, 19:370–375.
- Dusfour I, Linton YM, Cohuet A, et al. Molecular Evidence of Speciation Between Island and Continental Populations of *Anopheles (Cellia) sundaicus* (Diptera: Culicidae), a Principal Malaria Vector Taxon in Southeast Asia. *J med entomol.* 2004; 41: 287-295
- Elyazar, iqbal et al (2013). *The distribution and bionomics of Anopheles malaria vector mosquitoes in indonesia.* from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23876873> , 9 september 2014.
- Hadi permana, dendi. *variasi sekuen anopheles balabacensis baias (diptera : culicidae) berdasarkan segmen ITS2 DNA ribosom dan gen COI DNA mitokondria di purworejo, [thesis].* Indonesia.; 2012.
- Harijanto, PN et al. 2012. *Malaria dari molekuler ke klinis.* Jakarta. Penerbit buku kedokteran EGC.
- Knolwton, nancy (1993). *Sibling species in the sea.* From <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.es.24.110193.001201?journalCode=ecolsys.1>, 9 september 2014.
- Linton YM, Harbach RE, Chang MS, Anthony TG, Matusop A. Morphological and molecular identify of *Anopheles (cellia) sundaicus* (diptera: culicidae), the nominotypical member of a malaria vector species complex in southeast asia. *Syst entomol.* 2001; 26: 357-366
- Linton YM, Dusfour I, Howard TM, Ruiz LF, Duc Manh N, Ho Dinh T, Sochant T, Coosemans M, Harbach RE: *Anopheles (Cellia) epiroticus* (Diptera: Culicidae) a new malaria vector species in the Southeast Asia Sundaicus complex. *Bull Entomol Res* 2005, 95:329–339.
- Lunt DH, Zhang DX, Szymura JM, Hewitt GM: The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Mol Biol* 1996, 5:153-165.
- Prabowo, A. 2004. *Malaria, Pencegah dan Mengatasinya.* Penerbit Puspa Swara: Jakarta.
- Rogers, william et al (2009). *Seasonal prevalence of malaria in west sumba district, indonesia.* malaria journal. Volume 8, <http://www.malariajournal.com/content/8/1/8> , 14 agustus 2014.
- Salvato P, Battisti A, Concato S, Masutti L, Patarnello T, Zane L: Genetic differentiation in the winter pine processionary moth (*Thaumetopoea pityocampa-wilkinsoni* complex) inferred by AFLP and mitochondrial DNA markers. *Mol Ecol* 2002, 11:2435-2444.
- Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S, Chareonviriyaphap T, Patil AP, Temperley WH, Gething PW, Elyazar IR, Kabaria CW, Harbach RE, Hay SI: The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Asia-Pacific region: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasit Vectors* 2011, 4:89.
- Sukowati, S., Baimai, V., Andris, H., 1996. Sex chromosome variation in natural population of the *Anopheles sundaicus* complex from Thailand and Indonesia. *Mosquito Borne Dis. Bull.* 13, 8–13.
- Sumruayphol S. *Anopheles sundaicus s.l. population dynamics, species complex and insecticide susceptibility in a coastal area of Rayong Province.* 2009.
- Surendan, sinnathamby, 2010, “Genetic evidence for malaria vectors of the *Anopheles sindaicus* complex in sri lanka with morphological characteristics attributed to *Anopheles subpictus species B*”. *Malaria journal.* Volume 9, <http://www.malariajournal.com/content/9/1/343> , 15 agustus 2014.
- Surendran sinnathamby, Sarnaz devojit, Jude pavilupillai, Kampainen petri, Kanthakumaran nadarajah, Gajapathy kanapathy, Peiris lalanthika, Ramasamy ranjan, Walton catherine : molecular characterization and identification of member of the *anopheles subpictus* complex in sri lanka . <http://www.malariajournal.com/content/12/1/304>, 8 agustus 2014.
- Walton C, Hardley JM, Kuvangkadilok C, Collins FH, Harbach RE, Baimai V, Butlin RK: Identification of five species of the *Anopheles dirus* complex from Thailand, using allele-specific polymerase chain reaction. *Med Vet Entomol* 1999, 13:24–32.
- Walton C, Somboon P, O’Loughlin SM, Zhang S, Harbach RE, Linton YM, Chen B, Nolan K, Duong S, Fong MY, Vythilingum I, Mohammed ZD, Trung HD, Butlin RK: Genetic diversity and molecular identification of mosquito species in the *An. maculatus* group using ITS2 region of rDNA. *Infect Genet Evol* 2007, 7:93–102.
- Walton C, Handley JM, Tun-Lin W, Collins FH, Harbach RE, Baimai V, Butlin RK: Population structure and population history of *Anopheles dirus* mosquitoes in Southeast Asia. *Mol Biol Evol* 2000, 17:962-974.
- World healt organization (2007). *Anpheles species complexes in south and south-east asia.* From http://apps.searo.who.int/pds_docs/B2406.pdf, 9 september 2014.