



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Ana Letícia Guerra

Análise molecular do subcomplexo Brasiliensis (Hemiptera,
Triatominae)

São José do Rio Preto
2016

Ana Letícia Guerra

Análise molecular do subcomplexo Brasiliensis (Hemiptera,
Triatominae)

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor (a) em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Tercília
Vilela de Azeredo Oliveira

São José do Rio Preto
2016

Guerra, Ana Letícia.

Análise molecular do subcomplexo Brasiliensis (Hemiptera, Triatominae) / Ana Letícia Guerra. -- São José do Rio Preto, 2016
88 f. : il., tabs.

Orientador: Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira
Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biologia molecular. 2. Biologia - Classificação. 3. Hemiptera – Aspectos moleculares. 4. Triatoma – Brasil. 5. Citogenética animal.
I. Azeredo-Oliveira, Maria Tercília Vilela de. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 577.23

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Ana Letícia Guerra

Análise molecular do subcomplexo Brasiliensis (Hemiptera,
Triatominae)

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor (a) em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira
UNESP – São José do Rio Preto
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos
FAMERP - São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Aline Rimoldi Ribeiro
UNICAMP - Campinas

São José do Rio Preto
2016

Este trabalho foi realizado no laboratório de Biologia Celular, do Departamento de Biologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto – IBILCE - UNESP. Apoio financeiro na forma de bolsa de estudos financiada pela CAPES

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira, por ser um exemplo de pessoa, educadora e pesquisadora a ser seguido. Agradeço pelos valiosos ensinamentos transmitidos durante esses anos e principalmente por ter confiado que eu seria capaz;

Agradeço à Prof^a. Dr^a. Claudia Carareto e a Prof^a. Dr^a. Lílian Madi Ravazzi pelo espaço cedido e por me acolher em seus respectivos laboratórios e pelas grandiosas sugestões e colaborações valiosas a este trabalho;

Ao Prof. Dr. João Aristeu da Rosa, da UNESP de Araraquara pela doação das espécies utilizadas nesse trabalho e por sua colaboração sempre, estendo meus agradecimentos ao doutorando Jader pela atenção e envio do material entomológico;

À Prof^a. Dr^a. Lílian Castiglione, pela orientação no Mestrado, além de muito ter me ensinado e ter participado da minha formação;

Aos professores e funcionários do Departamento de Biologia, da sessão de Pós-graduação, da Vice Direção e da Direção especialmente a Betinha e a Magda pelo carinho, atenção e disposição em ajudar sempre;

A CAPES pela bolsa de Doutorado concedida e ao CNPQ pela bolsa produtividade concedida;

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e atenção;

Aos amigos e colegas que ainda estão ou já passaram pelo Laboratório de Biologia Celular: Lucilene, Maysa, Fernanda, Amanda, Giovana, Carlos, Kelly, João, Yago, pela convivência, amizade, apoio e incentivo em especial ao Kaio pela paciência e colaboração que sem dúvida foi de enorme importância para a realização e conclusão deste trabalho; a Nathália, amiga querida obrigada pelo companheirismo, pelos almoços animados e por estar presente em tantos

momentos e a Priscila que tanto me ensinou, sempre acreditou e confiou em mim, me incentivou e que além de tudo sempre será uma grande amiga;

Aos queridos amigos do Laboratório de Citogenética de Insetos e do Laboratório de Evolução Molecular de Insetos pela convivência agradável, trocas de ideias e ajuda; especialmente á Elaine, Adriana e a técnica Joice pela ajuda constante, por sempre terem me acolhido e por compartilharem seus conhecimentos;

A querida amiga Leliane, que mesmo distante, sempre esteve disponível para me ajudar, me incentivar e contribuir com seus ensinamentos;

A todos os amigos que fiz durante a infância que me proporcionaram momentos felizes e sempre torceram por mim, Marcella, Natália, Thayssa, Alessandra, Débora, Elisa;

Aos novos amigos que esta etapa me proporcionou e que se tornaram muito importantes, Isabela, Marina, Vanessa Urbinatti, Vanessa Cardoso, Iris que alegraram meus finais de semanas, por todo apoio e companheirismo. Em especial a querida amiga Cecília por toda sua amizade, paciência, pela convivência, que sempre me ajudou, obrigada apoio incondicional nos bons e maus momentos do meu trabalho e da minha vida pessoal;

Agradeço a meus familiares (tios/as, primos e avó), que apesar de nem sempre estarem presentes, sempre me incentivaram, apoiaram e torceram por mim;

Ao meu querido irmão Antonio, por todo o apoio, carinho e compreensão;

*Aos **meus pais**, Izilda e Antonio meus maiores exemplos de vida, obrigada pelo apoio sempre em todos os momentos da minha vida pessoal e profissional, pela força, pelo amor incondicional e por todo esforço que sempre fizeram (e fazem) para eu chegar até aqui;*

A todos que aqueles que nos mais diversos momentos me ajudaram direta ou indiretamente na realização e conclusão desse trabalho;

Agradeço a Deus pela vida e por ter colocado pessoas tão especiais como vocês no meu caminho, sem vocês tudo teria sido mais difícil...

A todos, muito obrigada!!!

*Nossa maior fraqueza está em desistir.
O caminho mais certo de vencer é tentar mais uma vez.
Thomas Edison*

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

I. Introdução	1
II. Objetivo Geral	10
III. Objetivo Específico	10
IV. Material e Métodos	11
1. Obtenção das amostras	11
2. Extração de DNA	11
3. Reações em cadeia da polimerase (PCR)	11
3.1. Domínio D2 (gene nuclear DNAr28S)	11
3.2. Gene mitocondrial ND1	12
4. Eletroforese	13
5. Purificação dos fragmentos amplificados	13
6. Análise do sequenciamento dos genes D2 e ND1	13
V. Resultados	15
Capítulo 1	16
Capítulo 2	26
Capítulo 3	41
VI. Discussão Geral	56
VII. Conclusões	62
VIII. Referências Bibliográficas	63

RESUMO

Os triatomíneos pertencem à ordem Heteroptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae. Atualmente, são admitidas 150 espécies, agrupadas em seis tribos e 18 gêneros. O subcomplexo Brasiliensis foi proposto, inicialmente por Lucena, em, 1970, contendo nove espécies, a saber: *Triatoma brasiliensis*; *T. juazeirensis*; *T. melânica*; *T. melanocephala*; *T. petrochiae*; *T. lenti*; *T. sherlocki*; *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps*. A partir de dados citotaxonômicos, foi proposta a exclusão das espécies *T. melanocephala*, *T. vitticeps* e *T. tibiamaculata* por apresentarem fragmentação do cromossomo sexual X e, com isso, serem proximamente relacionados aos triatomíneos da América do Norte. Com base em dados moleculares, foi sugerido, portanto, que esse subcomplexo compreende as seguintes espécies: *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis*, *T. melanica*, *T. sherlocki* e a subespécie *T. b. macromelasoma*. No entanto, os estudos não incluíram *T. lenti* e *T. petrochiae*. Com base em análises citogenéticas, foi proposto que *T. lenti* seja um membro do subcomplexo Brasiliensis. Visando esclarecer as dúvidas relacionadas à posição das espécies *T. lenti* e *T. petrochiae* dentro desse subcomplexo, o presente trabalho teve como objetivo analisar, por meio do Domínio D2 (região 28S DNAr) e do gene mitocondrial ND1 a relação filogenética dos táxons que compõem o subcomplexo Brasiliensis. A partir das análises geradas com o domínio nuclear D2, concluímos que não foi possível confirmar a relação filogenética entre os membros do subcomplexo Brasiliensis, visto que, as sequências obtidas apresentaram apenas dois sítios polimórficos em 567 pb, demonstrando que esse domínio não é um marcador molecular adequado para essas espécies, devido ao seu alto grau de conservação. Todavia, os resultados obtidos para o gene mitocondrial ND1 corroboraram os dados citotaxonômicos que consideram a espécie *T. lenti* como membro do subcomplexo Brasiliensis, comprovado pelo alto suporte nos ramos gerados pela filogenia (89% de *bootstrap*). Na topologia também foi verificado que *T. petrochiae* é grupo irmão das demais espécies do subcomplexo (100% de *bootstrap*), além de corroborar seu *status* específico. As observações encontradas na matriz de distância genética suportaram o fenômeno de hibridação homoploidal para a subespécie *T. b. macromelasoma*, contribuindo assim para o conhecimento filogenético das espécies desse subcomplexo. Os dados encontrados são significativos, pois, o conhecimento da taxonomia desses insetos e sua correta classificação permitem que os triatomíneos que atuam como vetores sejam foco específico dos programas de controle da doença de Chagas no Brasil e na América Latina.

Palavras-chave: taxonomia molecular; gene nuclear (D2); gene mitocondrial (ND1); *Triatoma lenti*; *Triatoma petrochiae*.

Abstract

Triatomines belong to the order *Heteroptera*, family *Reduviidae* and subfamily *Triatominae*. Currently, they admitted 150 species, grouped into two tribes and 18 genera. *Brasiliensis* subcomplex was proposed initially by Lucena, in 1970, containing nine species: *Triatoma brasiliensis*; *T. juazeirensis*; *T. melânica*; *T. melanocephala*; *T. petrochiae*; *T. lenti*; *T. sherlocki*; *T. tibiamaculata* and *T. vitticeps*. From data citotaxonomicals, it was proposed the exclusion of species *T. melanocephala*, *T. vitticeps* and *T. tibiamaculata* by present fragmentation of sex chromosome X and, therefore, are closely related to *triatomines* North America. Based on molecular data, it was suggested therefore that comprises the subcomplex species: *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis*, *T. melanica*, *T. sherlocki* and subspecie *T. b. macromelasoma*. However, the studies didn't include *T. lenti* and *T. petrochiae*. Based on cytogenetic analysis, it was proposed that *T. lenti* be a member of *Brasiliensis* subcomplex. Aiming to answer questions related to the position of the species *T. lenti* and *T. petrochiae* within this subcomplex, this study aimed to analyze, through the Domain D2 (region 28S RNAr) and mitochondrial gene ND1 the phylogenetic relationship of the taxa that comprise the subcomplex *Brasiliensis*. From the analysis generated with domain D2, we concluded that it was not possible to confirm the phylogenetic relationship among the members of *Brasiliensis* subcomplex, since the obtained sequences showed only two polymorphic sites in 567 bp, indicating that this domain is not a marker molecular suitable for these species, due to its high degree of conservation. However, the results obtained from the mitochondrial gene ND1 corroborate cytotaxonomic data that consider the species *T. lenti* as *Brasiliensis* subcomplex member, evidenced by the high support in the branches generated by phylogeny (89% bootstrap). In the topology it was also observed that *T. petrochiae* be the brother group of the other species of the subcomplex (100% bootstrap), and corroborate their specific status. The observations found in the genetic distance matrix support the homoploide hybridization phenomenon for the subspecies *T. b. macromelasoma*, thus contributing to the phylogenetic knowledge of the species of this subcomplex. Our data are significant because, the taxonomy of these insects and their correct classification allow *triatomine* that act as vectors are specific focus of Chagas disease control programs in Brazil and Latin America.

Keywords: molecular taxonomy; nuclear gene (D2); mitochondrial gene (ND1); *Triatoma lenti*; *Triatoma petrochiae*.

I. Introdução

Os triatomíneos são insetos hematófagos que pertencem à ordem Hemiptera, subordem Heteroptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae (LENT e WYGODZINSKY, 1979). Esses organismos possuem grande importância para a parasitologia humana, pois todas as espécies da subfamília Triatominae são potenciais vetores do protozoário *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (Kinetoplastida; Trypanosomatidae) agente etiológico da doença de Chagas. A infecção ocorre por meio da alimentação com sangue de mamífero infectado (homens, marsupiais e alguns roedores), sendo que, todos os estádios ninfais (N1, N2, N3, N4 e N5) podem ser contaminados com o parasito, uma vez que, após a eclosão, a hematofagia é obrigatória em todas as fases de vida dos triatomíneos. Já a transmissão do protozoário para os mamíferos ocorre por meio das fezes desses insetos, que tem o hábito de defecar durante o repasto (NOIREAU et al, 2009). Os animais infectados com *T. cruzi* são sempre mamíferos, uma vez que o parasito não se desenvolve no sangue de aves, répteis ou anfíbios, embora esses animais possam servir de fonte alimentar para esses (GALVÃO et al, 2015).

A doença de Chagas apresenta uma fase aguda, de curta duração, que na maioria dos casos progride para uma fase crônica. A fase aguda é geralmente assintomática, entretanto em 10% dos casos os sinais clínicos começam 6 a 10 dias após a infecção e se caracterizam por um quadro febril e inespecífico, linfadenopatia, esplenomegalia e, mais raramente, uma intensa miocardite (RASSI et al, 2000). Essa fase se resolve espontaneamente em quatro a oito semanas. Entretanto, alguns pacientes, principalmente crianças ou indivíduos imunodeficientes, podem apresentar quadros meníngeos graves e insuficiência cardíaca que podem levar ao óbito (SILVA et al, 2006).

Atualmente, são admitidas 150 espécies na subfamília Triatominae, agrupadas em 18 gêneros e seis tribos (ABAD-FRANCH et al, 2013; ALEVI et al, 2013; JURBERG et al, 2013; POINAR, 2013). No Brasil existem, aproximadamente, 66 espécies de triatomíneos distribuídas em 26 Estados (JURBERG et al, 2013; GARDIM et al, 2014).

É conhecida a ação antrópica sobre os ambientes naturais, o que gera uma crescente devastação do meio ambiente. Isso ocorre, principalmente, para exploração de recursos naturais e aumento das áreas habitáveis e de cultivo, o que reflete em um

crescimento descontrolado dos municípios em várias regiões do país, onde se implantam habitações precárias, e há falta de recursos, de educação e de saneamento básico. Dessa forma, o contato do ser humano com o ambiente silvestre é cada vez maior o que gera diminuição do habitat original de muitos animais, inclusive dos triatomíneos. Todas essas ações favorecem o fenômeno de domiciliação dos insetos vetores, que se refugiam próximos aos domicílios (intra e peridomicílio), em busca de abrigo e alimento. Assim, é incessante a transmissão de várias doenças ao homem (antropozoonoses), e dentre essas, a doença de Chagas (FORATTINI, 1980; DIOTAIUTI, 2000; VINHAES; DIAS, 2000; PEÑARANDA-CARRILLO et al, 2002; TARTAROTTI et al, 2004; OLIVEIRA; SILVA, 2007).

A identificação específica e a sistemática dos triatomíneos têm se pautado, fundamentalmente, em observações morfológicas, principalmente por meio de microscopia de luz (LENT; WYGODZINSKY, 1979; SHERLOCK, SERAFIM, 1967; LUCENA, 1970) utilizando como parâmetro morfológico a genitália feminina e masculina, metodologia largamente utilizada para a validação de novas espécies de triatomíneos (LENT; JURBERG, 1967, 1968, 1969, 1975; JURBERG et al, 1997; ROSA et al, 2014), bem como em outros grupos de insetos Heteropteras (WEIRAUCH; SCHUH, 2011), Coleopteras (MILLER, 2001).

A partir da década de 1960, as análises morfológicas foram auxiliadas pela Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), que possibilitou uma melhor visualização dos parâmetros morfológicos com imagens mais detalhadas. Essa metodologia também auxiliou no esclarecimento do *status* de algumas espécies de Triatominae (ROSA et al, 1992; 1999). No entanto, apenas a análise de parâmetros morfológicos nem sempre conseguem esclarecer todas as questões taxonômicas, como é o caso de alguns complexos de espécies crípticas, como as espécies do subcomplexo *Brasiliensis* e espécies do gênero *Rhodnius* (COSTA et al, 1997; MONTEIRO et al, 2001; JURBERG, 2003). Nesses casos, a fim resolver essas questões, são necessárias ferramentas mais sensíveis, para a distinção dessas espécies, como o uso de técnicas moleculares e sequenciamento por exemplo, no sentido de não utilizar apenas caracteres morfológicos para a identificação de espécies de Triatominae (ACTIS et al, 1964).

As espécies do subcomplexo *Brasiliensis*, que apresentam seu centro de dispersão no Nordeste do Brasil (FORATTINI, 1980) apresentam quatro padrões de coloração no pronoto, pernas e asas, cada um com distribuição em áreas distintas (COSTA et al, 1997, 1998, 2002; MONTEIRO et al, 2004; BORGES et al, 2005).

Devido a evidências morfológicas e genotípicas, o táxon *T. brasiliensis* (Neiva, 1911) sofreu várias revisões taxonômicas, pois as espécies desse grupo apresentam muitas semelhanças morfológicas, o que as torna um grupo de difícil classificação apresentando algumas espécies com o status taxonômico questionado (GARCIA et al, 1998).

Schofield e Galvão (2009) agruparam os triatomíneos em complexos e subcomplexos específicos, utilizando como critérios características morfológicas e distribuição geográfica, a saber: complexo Phyllosoma, dividido nos subcomplexos Dimidiata e Phyllosoma; complexo Flavida; complexo Rubrofasciata; complexo Protracta; complexo Lenticularia; complexo Dispar; complexo Infestans, que é subdividido nos subcomplexos Brasiliensis, Infestans, Maculata, Matogrosensis, Rubrovaria e Sordida e, por fim, o complexo Spinolai.

Entre esses subcomplexos, vamos destacar o subcomplexo Brasiliensis que foi proposto, pela primeira vez, por Lucena, em 1970, como um arranjo sistemático denominado complexo Brasiliensis, composto, principalmente, por espécies encontradas na região Nordeste do Brasil. Esse complexo foi descrito, inicialmente, incluindo as espécies *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911, *T. petrochii* Pinto e Barreto, 1925, *T. pessoai* Sherlock e Serafim, 1967, *T. lenti* Sherlock e Serafim, 1967 e *T. bahiensis* Sherlock e Serafim, 1967 e pelas subespécies *T. b. melanica* Neiva e Lent, 1941 e *T. b. macromelasoma* Galvão, 1955.

A espécie *T. brasiliensis* é uma das principais espécies vetoras da região Nordeste do Brasil, pois está diretamente relacionada com o clima semi-árido dessa região (LUCENA, 1970). Essa espécie habita seis Estados brasileiros: Maranhão; Paraíba; Pernambuco; Piauí; Rio Grande do Norte e Tocantins (GURGUEL-GONÇALVES et al, 2012).

A espécie *T. petrochii* foi descrita por Pinto e Barreto, em 1925, baseada em apenas um exemplar proveniente do Rio Grande do Norte. Os autores nomearam a espécie homenageando a Dra. Juana Petrochi e a descreveram como idêntica a *T. brasiliensis*, diferenciando apenas por não ter manchas claras nos fêmures. Carcavallo e Martínez (1985) corrigiram o nome científico de *T. petrochii* para *T. petrochiae*, por homenagear uma mulher. Lent e Wygodzinsky (1979) confirmaram a similaridade existente entre as duas espécies, contudo ressaltaram que apresentam algumas diferenças morfológicas, tais como: ausência de fosseta esponjosa nas tíbias dos machos de *T. petrochiae*, rostro praticamente glabro e primeiro segmento antenal mais curto. Espínola (1971), por meio de cruzamento experimental e Monteiro et al (1998), por meio de parâmetros genéticos, confirmaram o status específico de *T. petrochiae*.

As espécies *T. lenti*, *T. pessoai* e *T. bahiensis* foram descritas, em 1967, como formas melânicas de *T. brasiliensis* (SHERLOCK; SERAFIM, 1967). As principais diferenças descritas, pelos autores, para separar as três espécies foram: em relação ao conexivo a espécie *T. pessoai* apresentava manchas grandes e de cor vermelha; *T. lenti* com manchas pequenas e amarelas e *T. bahiensis* com manchas de tamanho intermediário, além disso, *T. bahiensis* apresenta duas manchas no cório. Devido a essas semelhanças morfológicas, Lent e Wygodzinsky, em 1979, sinonimizaram *T. pessoai* e *T. bahiensis* com *T. lenti*.

A subespécie *T. b. melanica*, por meio de parâmetros morfológicos, biológicos, ecológicos, enzimáticos, moleculares e cruzamentos experimentais teve seu *status* elevado para o nível de espécie (COSTA et al, 2006). Os autores ressaltam que *T. melanica* é a forma evolutiva mais diferenciada dentro do complexo, uma vez que apresenta incompatibilidade genética e produção de híbridos inviáveis em cruzamentos com os outros membros do subcomplexo Brasiliensis. Já a subespécie *T. b. macromelasoma*, descrita com base em formas melânicas de *T. brasiliensis* encontradas em domicílio (GALVÃO, 1955), foi recentemente redescrita e revalidada por Costa et al (2013).

Costa e colaboradores, por meio de análises isoenzimáticas (COSTA et al, 1997a), morfológicas (estruturas das genitálias) (COSTA et al, 1997b), da superfície exocorial do ovo (COSTA et al, 1997b), biológicas (COSTA et al, 1998a), ecológicas (COSTA et al., 1998b), genéticas (MONTEIRO et al, 1999), citogenéticas (PANZERA et al, 2000), biogeográficas (COSTA et al, 2002), de cruzamentos experimentais (COSTA et al, 2003), moleculares (MONTEIRO et al, 2004) e da morfometria dos testículos (FREITAS et al, 2008) propuseram que o complexo *T. brasiliensis* deveria ser formado pelas espécies *T. brasiliensis*, *T. b. macromelasoma*, *T. melanica* e uma população de *T. brasiliensis* de Juazeiro/Bahia. Em 2007, Costa e Felix descreveram essa população de juazeiro como uma nova espécie, *T. juazeirensis*.

Em 2009, Mendonça e colaboradores, por meio de reconstrução filogenética com dois genes mitocondriais (*cytb* e *16S*), sugeriram que *T. sherlocki* deveria fazer parte do complexo *T. brasiliensis* proposto por Costa e colaboradores. Assim, Costa et al (2013) propuseram que o subcomplexo Brasiliensis deveria ser constituído por quatro espécies (*T. brasiliensis*, *T. melanica*, *T. juazeirensis* e *T. sherlocki*) e uma subespécie (*T. b. macromelasoma*). *T. petrochiae* não foi considerado como membro do complexo pelos autores. Argola et al (2008) ressaltaram que esse inseto pode ser diferenciado dos demais agrupados no complexo pelas seguintes características: primeiro segmento antenal

incomumente curto, atingindo pouco mais da metade da distância entre a base e o ápice da cabeça e fosseta esponjosa ausente em machos e fêmeas.

Os triatomíneos classificados no complexo *T. brasiliensis* por Costa et al. (2013) foram agrupados por Schofield e Galvão (2009) no complexo Infestans e subcomplexo Brasiliensis: *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis*, *T. lenti*, *T. melanica*, *T. melanocephala*, *T. petrochiae*, *T. sherlocki*, *T. tibiamaculata*, *T. vitticeps* em uma tentativa de reunir a maioria das classificações propostas, por meio de dados moleculares, morfológicos e geográficos.

Entretanto, Alevi et al (2012), por meio da descrição do cariótipo, propuseram que as espécies *T. melanocephala*, *T. vitticeps* e *T. tibiamaculata* deveriam ser excluídas do subcomplexo Brasiliensis, uma vez que diferem do número de cromossomos observado nas espécies do subcomplexo ($2n = 20$ autossomos + XY) por apresentarem fragmentação do cromossomo sexual X. A espécie *T. vitticeps* possui um sistema de determinação do sexo do tipo $X_1X_2X_3Y$ (SCHREIBER; PELLEGRINO, 1950; SEVERI-AGUIAR et al, 2006; ALEVI et al, 2012) e *T. tibiamaculata* apresenta o sistema X_1X_2Y (PANZERA et al., 1996), aproximando-se, dessa forma, das espécies de triatomíneos da América do Norte. Os autores também apontaram que os dados moleculares dessas três espécies não apresentaram evidências de proximidade com os outros membros desse subcomplexo.

Recentemente, Gardim et al (2014), utilizando análises moleculares com os genes mitocondriais *citocromo b (cytb)*, *citocromo oxidadase subunidade I (COI)* e *16S rDNA*, corroboraram a exclusão dessas espécies do subcomplexo.

Mendonça et al (2009) e Gardim et al (2014), por meio de reconstrução filogenética, sugeriram que o subcomplexo Brasiliensis deve ser formado pelas espécies *T. brasiliensis*, *T. b. macromelasoma*, *T. juazeirensis*, *T. melanica* e *T. sherlocki*. No entanto, os autores não incluíram *T. lenti* e *T. petrochiae* nos estudos moleculares. Com base em análises citogenéticas, Alevi et al (2012, 2013, 2014) sugeriram que *T. lenti* seja um membro do subcomplexo Brasiliensis. No entanto, os autores sugerem que análises moleculares e filogenéticas deveriam ser realizadas para confirmar a posição dessa espécie como membro efetivo do subcomplexo.

Mesquita e colaboradores (2015) sequenciaram o genoma da espécie *R. prolixus* abrangendo 95% do genoma (~702 Mb).

Com relação à sistemática dos triatomíneos, faz-se necessário o desenvolvimento de outros e novos parâmetros para a avaliação de espécies próximas.

Os precursores na avaliação de aspectos moleculares estudaram os padrões isoenzimáticos desses insetos (ACTIS et al, 1964; JURBERG et al, 1998; NOIREAU et al, 2002), e nos últimos anos, vários estudos visaram esclarecer dúvidas relacionadas à filogenia desse grupo (GARCIA et al, 2001; HYPESA et al, 2002; MENDONÇA et al, 2009).

Novas análises têm auxiliado a elucidar questões filogenéticas sobre esses vetores usando marcadores moleculares baseados no DNA mitocondrial (mtDNA) e nuclear (nDNA). Os marcadores mais utilizados do DNA mitocondrial têm sido os fragmentos *12S*, *16S*, *citocromo oxidase I* (COI) e *citocromo b* (cytb) e do nDNA, *ITS1*, *ITS2*, *18S* e a porção D2 do fragmento 28S (BARGUES et al, 2000; HYPESA et al, 2002; TARTAROTTI ; CERON, 2005; MARTINEZ et al, 2006).

Com a disseminação da teoria filogenética e os avanços das técnicas moleculares surgiu a filogenia molecular, que estuda as relações evolutivas entre os organismos embasada em dados moleculares, como sequências de DNA, RNA e proteínas. Os dados obtidos a partir de estudos utilizando estas sequências são muitos, visto que, cada par de bases em uma sequência de nucleotídeos ou cada aminoácido de uma proteína são considerados um caráter separado (ARRIEL et al, 2006).

As relações filogenéticas e a formação de complexos específicos da subfamília Triatominae ainda são muito discutidos, e, até o momento, nem todas as espécies foram avaliadas com base em marcadores moleculares, o que pode gerar enganos e controversias (LENT; WYGODZINSKY, 1979; CARCAVALLO et al, 1999; HYPESA et al, 2002; SCHOFIELD; GALVÃO, 2009).

A subfamília Triatominae tem atraído atenção considerável, sendo que os primeiros estudos com foco no relacionamento evolutivo dentro das tribos que contêm os mais importantes vetores da doença Chagas (a saber, Rhodniini e Triatomini) realizados por Monteiro et al (2000) e Garcia et al (2001). Estudos subsequentes investigaram a monofilia da subfamília baseada em pequenas amostras de Triatomini, Rhodniini e não triatomíneos reduvídeos como *outgroups* (HYPESA, et al, 2002; SCHOFIELD e GALVÃO, 2009; DE PAULA, et al, 2005). A maioria destas análises baseou-se numa quantidade limitada de sequências nível molecular.

Weirauch e Munro (2009) analisaram cinco espécies de triatomíneos representando as tribos Triatomini e Rhodniini da subfamília Reduviidae. Essa análise envolveu 89 táxons e cinco *outgroups* para aproximadamente 3.300 pb, utilizando os genes *16S*, *28S* e *18S rDNA* e ,com isto, recuperou a idéia de monofilia para subfamília Triatominae. Nenhuma

análise incluiu representantes das outras três tribos da subfamília Triatominae, não permitindo, assim, corroborar dados morfológicos e moleculares.

O gene *28S* é considerado o mais longo (com até 4000 pb) e evolui um pouco mais rápido do que a região *18S*, por exemplo, principalmente devido à presença de segmentos de expansão diferentes ou os chamados domínios (D1, D2, D3, etc), o que explica o seu comprimento variável de acordo com o grupo de organismos (BARGUES, et al, 2009). Em geral, regiões conservadas dentro dos genes produzem informações filogenéticas úteis para altos níveis taxonômicos, considerando que a rápida evolução de sequências dentro de espaçadores e também dentro de genes (como os domínios variáveis do gene *28S*) permite que as mesmas sejam aplicadas para baixos níveis taxonômicos (BARGUES; MAS-COMA, 1997).

A região nuclear variável do gene *28S* (D2) é, frequentemente, usada em estudos filogenéticos na tribo Rhodniini. Dessa forma, os resultados corroboraram a hipótese de parafilia de *R. robustus* com a presença de uma derivada na posição 360, compartilhada com *R. prolixus* (MONTEIRO et al, 2000; MONTEIRO et al, 2003; MONTEIRO et al, 2014).

O genoma mitocondrial, diferente do nuclear, possui algumas características particulares, tais como: o fato de ser citoplasmática, não seguindo os padrões mendelianos de segregação e não sofrendo recombinação; apresentar herança materna; possuir uma taxa de mutação relativamente rápida, o que pode ser resultado da ausência de mecanismos de reparo durante a replicação; apresentar conteúdo gênico conservado (apenas 37 genes); apresentar estrutura gênica simples (não possui DNA repetitivo, transposons, íntrons ou pseudogenes) e, ainda, apresentar alta taxa de evolução por mutação de cinco a dez vezes superiores a um gene de cópia única nuclear (BROWN, 1985; MORITZ et al, 1987; HARRISON, 1989; CORNELI; WARD, 2000; WILSON et al, 2000; DINIZ, 2005; LIU et al, 2007; BAKER et al, 2008; WEI-BING, 2009; VERGAMINI; PILEGGI; MANTELATTO, 2011). Este por possuir uma valiosa informação genética, é amplamente utilizado em estudos que abordam relações filogenéticas entre espécies, genética de populações e caracterização da variabilidade genética intra e interespecíficas (AVISE, 1994; AVISE, 2000; CHANDRA et al, 2006; COOK et al, 2008; QING-YI; QI-QUN; WEI-BING, 2009; VERGAMINI; PILEGGI; MANTELATTO, 2011).

Os estudos filogenéticos em triatomíneos com genes mitocondriais tiveram início, em 1998 (GARCIA e POWELL, 1998). Em 2002, Hypsa e colaboradores

publicaram os resultados da amostra mais representativa de dados moleculares já descritos na literatura. Os autores utilizaram 57 espécies e fizeram inferências sobre a filogenia de três tribos da subfamília Triatominae, a partir dos genes mitocondriais ribossômicos 12S e 16S.

O genoma mitocondrial possui genes codificadores para duas subunidades ribossômicas (12S e 16S), 22 RNA transportadores, três subunidades da enzima citocromo c oxidase (*COI*, *COII* e *COIII*), citocromo B (*Cytb*), subunidades 6 e 8 da ATP F0 sintase (ATP6 e ATP8) e sete subunidades da NADH desidrogenase (ND1-ND6 e ND4L). O tamanho dessa região exibe grande variação entre os organismos (BROWN, 1985; MORITZ et al, 1987).

Análises do gene mitocondrial ND1, em Triatominae, demonstraram que tanto as sequências de nucleotídeos como a sequência de aminoácidos não variam homogeneamente ao longo do gene completo. Além disso, sítios polimórficos de diferentes partes do gene não parecem seguir uma taxa evolutiva uniforme dentro das diferentes linhagens de triatomíneos. *Hotspot* (pontos quentes mutacionais onde mutações são geradas mais frequentemente nesses sítios devido à ausência de reparo) ou regiões intragênicas conservadas aparecem em uma linhagem, mas tornam-se ausentes em outras (BARGUES; MAS-COMA, 2009).

Os fragmentos do genoma nuclear, geralmente, são mais conservados que genes dos fragmentos do gene mitocondrial, portanto evoluem em taxas distintas. Regiões mais conservadas são utilizadas para análise de diversidade, relação das espécies e comparação entre táxons mais distantes. Já as regiões que evoluem rapidamente são mais adequadas para o estudo de organismos muito próximos (ABAD-FRANCH; MONTEIRO, 2005).

A utilização de genes nucleares e mitocondriais demonstra ser o método que fornece informação mais valiosa a respeito da sistemática de triatomíneos, pois ambos incluem marcadores cuja utilidade já foi enfatizada em vetores da doença de Chagas (MONTEIRO et al, 2000; BARGUES et al, 2002). O sequenciamento de determinados genes permite avaliar, de forma direta, polimorfismos de DNA, fornecendo informações para inferência filogenética bem como para avaliação das relações entre organismos e populações.

No entanto, como referido anteriormente, há ainda uma grande dificuldade na identificação de espécies da subfamília Triatominae. Nesse contexto, novas análises moleculares, utilizando genes distintos, podem auxiliar no esclarecimento das questões

filogenéticas nesses insetos, visando contribuir para o desenvolvimento da profilaxia da doença de Chagas, visto que esta pode ser otimizada quando associada a dados biológicos dos vetores.

II. Objetivo Geral

Com base nas informações mencionadas acima, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a relação filogenética das espécies do subcomplexo Brasiliensis (*T. brasiliensis*, *T. b. macromelasoma*, *T. juazeirensis*, *T. melanica*, *T. petrochiae*, *T. lenti* e *T. sherlocki*), com o sequenciamento da região do domínio D2 do gene nuclear 28S e do gene mitocondrial ND1. Estes resultados, em conjunto com as informações já disponíveis na literatura, mostraram ser de extrema importância para avaliar a relação filogenética de *T. lenti* e *T. petrochiae* com as espécies subcomplexo Brasiliensis.

III. Objetivo Específico

- Avaliar a relação filogenética das espécies *T. lenti* e *T. petrochiae* com os membros do subcomplexo Brasiliensis, por meio da comparação das sequências de dois novos genes: nuclear D2 (domínio do 28S) e mitocondrial ND1, visando fornecer subsídios para as interpretações taxonômicas e filogenéticas das espécies analisadas.

IV. Material e Métodos

1. Obtenção das amostras

As espécies estudadas foram cedidas pelo “Insetário de Triatominae”, instalado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara, que se encontra sob a coordenação do Prof. Dr. João Aristeu da Rosa.

Para a obtenção da amostra de DNA genômico, o material genético foi extraído das pernas de exemplares adultos de cada espécie do subcomplexo *Brasiliensis* para ambos os genes. Os órgãos foram depositados em microtubos com etanol absoluto e armazenados no *freezer*, a -20°C.

Como *outgroup*, foram utilizados indivíduos adultos da espécie *Triatoma infestans*, pois esta já se mostrou eficiente para estudos filogenéticos no subcomplexo *Brasiliensis* (GARDIM et al, 2014; MENDONÇA et al, 2009).

2. Extração de DNA Genômico

O DNA genômico foi extraído utilizando o kit *DNeasy Blood and Tissue kit* (QIAGEN), de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração, o DNA foi quantificado no espectrofotômetro ND-1000 NanoDrop (*Uniscience*) para determinação de sua concentração. Em seguida, 2µL de cada amostra de DNA genômico foram aplicadas em um gel de agarose a 1% para verificar a integridade desse material.

3. Reações em Cadeia da Polimerase (PCR)

3.1. Domínio D2 (gene nuclear DNAr28S)

Os oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos fragmentos do domínio D2, região do gene *28S* (DNAr) foram descritos por Porter e Collins (1996).

- *Forward*: 5'- GCGAGTCGTGTTGCTTGATAGTGCAG - 3'
- *Reverse*: 5'- TTGGTCCGTGTTTCAAGACGGG - 3'

As condições para amplificação do gene nuclear D2 estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Condições para amplificação do gene nuclear D2.

Passo	Etapa do Processo	Temperatura	Duração
1	Desnaturação inicial	95°C	2 minutos
2	Desnaturação	95°C	30 segundos
3	Anelamento	68°C	30 segundos
4	Extensão	72°C	1 minuto
5	Volta para o passo 2	-	40 vezes
6	Extensão Final	72°C	5 minutos

3.2. Gene mitocondrial ND1

Os oligonucleotídeos do gene mitocondrial ND1 foram construídos com base da sequência correspondente de *T. dimidiata* (Genbank acesso AF301594, Dotson e Beard 2001), utilizando os programas *Primer 3 v. 0.4.0* e *Oligo Analyser 3.1*, para construção e verificação da sua qualidade e integridade. O oligonucleotídeo *reverse* foi degenerado a fim de abranger um número maior de espécies.

- *Forward*: 5'- TCTGATTCACCCTCAGCAAA - 3'
- *Reverse*: 5'- GGAGCGTARGGKTTRRGTTAT - 3'

As condições para amplificação do gene mitocondrial ND1 foram efetuadas e estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Condições para amplificação gene mitocondrial ND1.

Passo	Etapa do Processo	Temperatura	Duração
1	Desnaturação inicial	95°C	2 minutos
2	Desnaturação	95°C	30 segundos
3	Anelamento	61°C	30 segundos
4	Extensão	72°C	1,5 minuto
5	Volta para o passo 2	-	40 vezes
6	Extensão Final	72°C	5 minutos

4. Eletroforese

Após a amplificação, os fragmentos de ambos os genes foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1%, a uma voltagem de 90V, por aproximadamente 1:30 horas. O gel foi corado com brometo de etídio, visualizado em um transluminador UV e digitalizado. O marcador de peso molecular utilizado foi o *DNA Ladder* 1Kb (*GE Healthcare and Life Technology*).

5. Purificação dos fragmentos amplificados

Logo após a eletroforese, o produto da PCR foi purificado utilizando o *kit GFX PCR DNA & Gel Band* (*GE Healthcare and Life Technology*), de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos da PCR purificados foram submetidos ao sequenciamento direto (sem a necessidade de clonagem), enviados ao Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco, Setor de Sequenciamento de DNA, USP – SP.

6. Análise do sequenciamento dos genes D2 e ND1

A validade das sequências obtidas de ambos os genes foi verificada a partir dos seguintes critérios: a) submetendo-as ao *Nucleotide-nucleotide Blast* (NCBI); b) sequenciando as fitas *forward* e *reverse*, para confirmação da região gênica.

Para a avaliação das regiões, o alinhamento das sequências foi realizado utilizando o programa “*ClustalW Multiple Alignment*” do “*BioEdit Sequence Alignment Editor V. 7.0.9.0*” (Hall, 1999) e corrigido manualmente quando necessário. Uma sequência consenso foi obtida para cada segmento de DNA de cada um dos indivíduos.

A análise das distâncias genéticas entre as espécies, construção de árvores filogenéticas, elaboração de matrizes de distância e observação de sítios polimórficos foram estimadas usando o programa MEGA 6.0 (TAMURA et al, 2007). A construção da rede de haplótipos *Network* foi gerada, por meio do programa TCS 1.21 (CLEMENTE et al, 2000).

V. Resultados

- Os resultados do presente trabalho serão apresentados em forma de Capítulos.

Insights into a hotspot in the Brasiliensis subcomplex (Hemiptera, Triatominae) by analysis of the D2 domain of the gene 28S RNA

A.L. Guerra¹, K.C.C. Alevi¹, C.A. Banho², J. Oliveira³, J.A. Rosa³ and M.T.V. Azeredo-Oliveira¹

¹ Laboratório de Biologia Celular, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP/IBILCE, São José do Rio Preto, SP, Brasil

² Laboratório de Citogenética e Molecular de Insetos, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP/IBILCE, São José do Rio Preto, SP, Brasil

³ Laboratório de Parasitologia, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, SP, Brasil

Running title: Hotspot in the Brasiliensis subcomplex

ABSTRACT. The Brasiliensis subcomplex is a monophyletic group formed by the species *Triatoma brasiliensis brasiliensis*, *T. b. macromelasoma*, *T. juazeirensis*, *T. melanica*, and *T. sherlocki*. However, using cytogenetic data and experimental hybrid crosses, *T. lenti* and *T. petrochiae* were also grouped into this subcomplex. Monteiro and collaborators, in 2004, found independent mutations on the same locations of the cytochrome b gene, which are high frequency homoplastic sites termed hotspots. This study aimed to analyze the properties of hotspot in the nuclear gene D2 (variable region of the 28S RNA) in all species of the Brasiliensis subcomplex as well as *T. lenti* and *T. petrochiae*. These species show two transversions at position 385 (G↔C and T↔G). We suggest that this mutation in haplotype 4 may be an initial molecular tool that supports the relationship of these species with the subcomplex. In addition to the transversion at haplotype 4, these species, aside from *T. melanica*, also possess a transversion at position 385 (G↔T) in haplotype 1. Thus, we describe the hotspot mutations of the D2 gene for species in Brasiliensis subcomplex as follows: three transversions are present at position 385 of haplotypes 1 and 4, which are shared by members of the subcomplex as well as *T. lenti* and *T. petrochiae*. These transversions may be considered a synapomorphy between these species. However, we emphasize that new phylogenetic studies should be conducted to evaluate whether *T. lenti* and *T. petrochiae* are truly members of the Brasiliensis subcomplex.

Keywords: *Triatoma lenti*; *Triatoma petrochiae*; Hotspot

INTRODUCTION

The Triatominae subfamily consists of 150 species that are divided into 18 genera (Alevi et al., 2015). These species can also be grouped into complexes and specific subcomplexes (Lent and Wygodzinsky, 1979; Carcavallo et al., 2000; Schofield and Galvão, 2009). Although complexes and subcomplexes are not valid according to the International Code of Zoological Nomenclature (Carcavallo et al., 2000) they should be considered monophyletic groups (Justi et al., 2014).

Schofield and Galvão (2009) mainly used morphological characteristics and geographical distribution to group nine species in the Brasiliensis subcomplex: *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911; *T. juazeirensis* Costa & Felix, 2007; *T. melanica* Costa, Argolo & Felix, 2006; *T. melanocephala* Neiva & Pinto, 1923; *T. petrochiae* Pinto & Barreto, 1925; *T. lenti* Sherlock & Serafim, 1967; *T. sherlocki* Papa, Jurberg, Carcavallo, Cerqueira & Barata, 2002; *T. tibiamaculata* Pinto, 1926; and *T. vitticeps* Stal, 1859. However, *T. melanocephala*, *T. tibiamaculata* and *T. vitticeps* were excluded from this subcomplex based on cytogenetic (Alevi et al., 2012a, 2013a, 2014a, b) and molecular analyses (Gardim et al., 2014).

All phylogenetic reconstructions of the Brasiliensis subcomplex were conducted with mitochondrial genes (Cyt b, 16S, COI and COII) and nuclear (18S and D2). Brasiliensis subcomplex is a monophyletic group formed by the species *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis*, *T. melanica*, *T. sherlocki* and subspecies *T. b. macromelasoma* (Monteiro et al., 2004; Mendonça et al., 2009; Gardim et al., 2014; Justi et al., 2014). However, we emphasize that *T. lenti* and *T. petrochiae* were not used in any of the phylogenetic analyses described above (perhaps due to difficulties in sample collection). Cytogenetic data (Alevi et al., 2012b; 2013b, 2014a) and experimental hybrid crosses (Mendonça et al., 2014) suggest that *T. lenti* can be considered as a member of this subcomplex.

Monteiro et al. (2004) found independent mutations on the same sites of the Cyt b gene during phylogenetic reconstruction. These sites are high frequency homoplasious sites known as hotspots. Mutation hotspots often reflect a specific mechanism of generating mutations at a particular site and/or unusual properties of a phenotypic selection (Rogozin and Pavlov, 2003).

Thus, this study aimed to analyze hotspots in the domain D2 (region of the 28S RNA), in all species of the Brasiliensis subcomplex (*T. b. brasiliensis*, *T. juazeirensis*, *T. melanica*, *T. sherlocki* and subspecies *T. b. macromelasoma*), as well as *T. lenti* and *T. petrochiae*.

MATERIAL and METHODS

Seven adult specimens of each species belonging to the *Brasiliensis* subcomplex (except for *T. melanica*, where only two specimens could be collected due to difficulties with sample collection) and *T. infestans* (as an outgroup) were obtained from the “Insectary of Triatominae” the Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCFAR/UNESP), Campus of Araraquara, São Paulo, Brazil.

These triatomines were dissected, and the legs were used for extraction of genetic material using the DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN) according to the manufacturer instructions. Amplification of variable region D2 in the 28S gene (rDNA) was performed via PCR as previously described by Porter and Collins (1996). The primers used were as follows: forward sequence: 5'GCGAGTCGTGTTGCTTGATAGTGCAG-3' and reverse sequence: 5'-TTGGTCCGTGTTTCAAGACGGG-3'. The cycling parameters are as follows: an initial cycle at 95°C for 2 min; 40 cycles of denaturation (95°C, 30 s), annealing (68°C, 30 s), and extension (72°C, 1 min); and one cycle at 72° C for 5 min. Following electrophoresis, the amplified fragments were purified using the GFX PCR DNA & Gel Band kit (GE Healthcare and Life Technology) according to the manufacturer instructions.

Purified PCR products were subjected to direct sequencing. Samples were sent to the Research Center on the Human Genome and Stem Cells, USP/São Paulo, Brazil. Sequences of all individuals were analyzed by the BioEdit software 7.0.5, and a consensus sequence was obtained for each DNA segment. The sequences were aligned using ClustalW editor.

We constructed a haplotype network using the software TCS 1.21 (Clement et al., 2000) based on the statistical parsimony method (Templeton et al., 1992). Reticulations were resolved according to common theoretical predictions about network structures (Crandall and Templeton, 1993; Posada and Crandal, 2001).

RESULTS

All species analyzed, except for *T. infestans*, presented hotspot mutations in haplotype 4, which were characterized as two transversions at position 385 (G↔C and T↔G) (Figure 1). With the exception of *T. melanica*, all species showed transversion at position 385 (G↔T) of haplotype 1. In addition to the mutations described above, *T.*

brasiliensis showed a transition in haplotype 2, and a transition at position 495 (C↔T) was found in the *T. infestans* outgroup (Figure 1).

DISCUSSION

The nuclear D2 variable region of the 28S RNA gene (D2) is frequently used in phylogenetic studies in the Rhodniini tribe (Monteiro et al., 2000, 2003; Díaz et al., 2014). In the Rhodniini tribe, this gene is more conserved as compared with other genes, containing only 9% variable sites (Monteiro et al., 2000). Díaz et al. (2014) observed that the D2 gene contained only 12 variable sites in the *pallesceus* group. Monteiro et al. (2003) by means of D2 gene corroborates the paraphilia of *R. robustus* because *R. prolixus* and *R. robustus* from the Orinoco region share a derived C in position 360.

For a long time, the species of the Brasiliensis subcomplex were considered to be chromatic variants of *T. brasiliensis* (Costa et al., 1998). Costa et al. (2006) elevated the specific status of *T. b. melanica* to *T. melanica*. Costa et al. (2007) described *T. juazeirensis* based on the *T. brasiliensis* population in Juazeiro/Bahia. Mendonça et al. (2009) grouped *T. sherlocki* into the Brasiliensis subcomplex based on phylogenetic analyses with mitochondrial genes (16S and CytB). Costa et al. (2013) revalidated and re-described the subspecies *T. b. macromelanosoma* based on melanin forms of *T. brasiliensis* encountered at housing (Galvão, 1955).

All species of the Brasiliensis subcomplex have cytogenetic synapomorphies: 20 autosomes plus two sex chromosomes (XY in males and XX in females), C-blocks in one or both chromosomal ends in all autosomal pairs, a large chromocenter made up of both sex chromosomes plus two autosomal pairs, and multiple C-dots spread in the nucleus during early meiotic prophase (Panzera et al., 2000; Alevi et al., 2013a, 2014a). *T. vitticeps*, *T. melanocephala*, and *T. tibiamaculata*, which were excluded from this subcomplex, have been found to have multiple sex systems and different C-heterochromatin patterns (Panzera et al., 2010; Alevi et al., 2012a, 2013a, 2014b).

Hotspot analyses showed that all species belonging to the Brasiliensis subcomplex as well as *T. lenti* and *T. petrochiae* have two transversions at position 385 (G↔C and T↔G). Considering that *T. lenti* and *T. petrochiae* have the same cytogenetic characteristics described for the Brasiliensis subcomplex (Panzera et al., 2000; Alevi et al., 2012b, 2013b, 2014a), it is possible that this mutation in haplotype 4 may be an initial molecular tool that supports inclusion of these species within the subcomplex.

In addition to transversion in haplotype 4, all species except for *T. melanica* also demonstrated transversion at position 385 (G↔T) in haplotype 1. Since *T. melanica* is the most evolutionarily differentiated species within the subcomplex, it may have genetic incompatibility and provide unviable hybrids with other members of the Brasiliensis subcomplex (Costa et al., 2006). It is possible that this hotspot can also be a defining feature of the species within this subcomplex.

In this study, we have illustrated hotspot mutations in the D2 gene for species in the Brasiliensis subcomplex, and suggest that three transversions at position 385 of haplotypes 1 and 4 are shared by members of the subcomplex as well as *T. lenti* and *T. petrochiae*. However, we emphasize that new phylogenetic studies should be conducted to evaluate whether *T. lenti* and *T. petrochiae* truly are members of the Brasiliensis subcomplex.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Carlos Eduardo Almeida for the assistance in constructing a haplotype network and the useful comments. We especially thank Dr. Claudia Carareto for support in the molecular analyses. The research was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERENCES

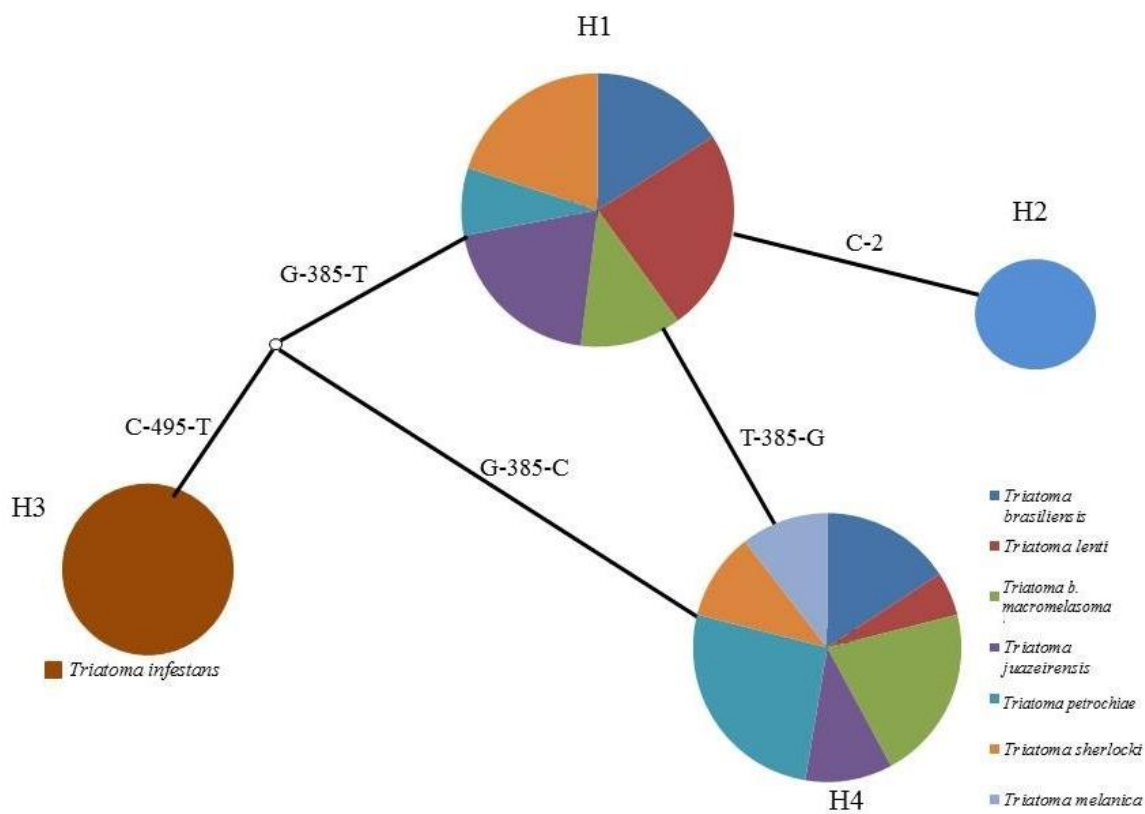
- Alevi KC, Mendonça PP, Pereira NP, Rosa JA, et al. (2012a). Karyotype of *Triatoma melanocephala* Neiva and Pinto (1923). Does this species fit in the Brasiliensis subcomplex? *Infect. Genet. Evol.* 12: 1652-1653.
- Alevi KC, Mendonça PP, Succi M, Pereira NP, et al. (2012b). Karyotype and spermatogenesis in *Triatoma lenti* (Hemiptera: Triatominae), a potential Chagas vector. *Gen. Mol. Res.* 11: 4278-4284.
- Alevi KC, Mendonça PP, Pereira NP, Rosa JA, et al. (2013a). Spermatogenesis in *Triatoma melanocephala* (Hemiptera: Triatominae). *Gen. Mol. Res.* 12: 4944-4947.

- Alevi KCC, Mendonça PP, Pereira NP, Guerra AL, et al. (2013b). Distribution of constitutive heterochromatin in two species of triatomines: *Triatoma lenti* Sherlock and Serafim (1967) and *Triatoma sherlocki* Papa, Jurberg, Carcavallo, Cerqueira & Barata (2002) *Infect. Genet. Evol.* 13: 301-303.
- Alevi KC, Rosa JA and Azeredo-Oliveira MTV (2014a). Cytotaxonomy of the Brasiliensis subcomplex and the *Triatoma brasiliensis* complex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Zootaxa* 3838: 583-589.
- Alevi KC, Rosa JA and Azeredo-Oliveira MTV (2014b). Distribution of constitutive heterochromatin in *Triatoma melanocephala* (Hemiptera, Triatominae). *Gen. Mol. Res.* 13: 7899-7903.
- Alevi KC, Moreira FFF, Jurberg J and Azeredo-Oliveira MTV (2015). Description of diploid chromosome set of *Triatoma pintodiasi* (Hemiptera, Triatominae). *Gen. Mol. Res.*, in press.
- Carcavallo RU, Jurberg J, Lent H, Noireau F, et al. (2000). Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Proposals for taxonomic arrangements. *Entomol. Vect.* 7: 1-99.
- Clement M, Posada D and Crandall KA (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* 9: 1657-1660.
- Costa, J, de Almeida JR, Britto C, Duarte R, et al. (1998). Ecotopes, natural infection and trophic resources of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 93: 7-13.
- Costa JM, Argolo AM and Felix M (2006). Redescription of *Triatoma melanica* Neiva & Lent, 1941, new status (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Zootaxa* 1385: 47-52.
- Costa J and Felix M (2007). *Triatoma juazeirensis* sp. nov. from the state of Bahia, northeastern Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102: 87-90.
- Costa J, Correia NC, Neiva VL, Gonçalves TC, et al. (2013). Revalidation and redescription of *Triatoma brasiliensis macromelasoma* Galvão, 1956 and key for the *Triatoma brasiliensis* complex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 108: 785-789.
- Crandall KA and Templeton AR (1993). Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics* 134:959-969.

- Díaz S, Panzera F, Jaramillo-O N, Pérez R, et al. (2014). Genetic, Cytogenetic and Morphological Trends in the Evolution of the *Rhodnius* (Triatominae: Rhodniini) Trans-Andean Group. *PLoS ONE* 9: e87493.
- Galvão FC (1955). *Triatoma brasiliensis macromelanosoma* n. subsp. (Reduviidae, Hemiptera). *Rev. Bras. Malariol. Doencas Trop.* 7: 455-457.
- Gardim S, Almeida CE, Takiya DM, Oliveira J, et al. (2014). Multiple mitochondrial genes of some sylvatic Brazilian *Triatoma*: non-monophyly of the *T. brasiliensis* subcomplex and the need for a generic revision in the Triatomini. *Infect. Genet. Evol.* 23: 74-79.
- Justi SA, Russo CA, Mallet JR, Obara MT, et al. (2014). Molecular phylogeny of Triatomini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Parasit. Vectors* 7: 149.
- Lent H and Wygodzinsky P (1979). Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas's disease. *Bulletin Am. Museum Nat. Hist.* 163: 123-520.
- Mendonça VJ, Silva MT, de Araújo RF, Júnior JM, et al. (2009). Phylogeny of *Triatoma sherlocki* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) inferred from two mitochondrial genes suggests its location within the *Triatoma brasiliensis* complex. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 81: 858-864.
- Mendonça VJ, Alevi KCC, Medeiros LMO, Nascimento JD, et al. (2014). Cytogenetic and morphologic approaches of hybrids from experimental crosses between *Triatoma lenti* Sherlock & Serafim, 1967 and *T. sherlocki* Papa et al., 2002 (Hemiptera: Reduviidae). *Infect. Gen. Evol.* 26: 123-131.
- Monteiro FA, Wesson DM, Dotson EM, Schofield CJ, et al. (2000). Phylogeny and molecular taxonomy of the Rhodniini derived from mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62: 460-465.
- Monteiro FA, Barrett TV, Fitzpatrick S, Cordon-Rosales C, et al. (2003). Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. *Mol. Ecol.* 12: 997-1006.
- Monteiro FA, Donnelly MJ, Beard CB and Costa J (2004). Nested clade and phylogeographic analyses of the Chagas disease vector *Triatoma brasiliensis* in Northeast Brazil. *Mol. Phylogenet. Evol.* 32: 46-56.
- Panzera F, Pérez R, Nicolini P, Hornos S, et al. (2000). Chromosome homogeneity in populations of *Triatoma brasiliensis* Neiva 1911 (Hemiptera – Reduviidae – Triatominae). *Cad. Saúde Pública.* 16: 83-88.

- Porter CH and Collins FH (1996). Phylogeny of nearctic members of the *Anopheles maculipennis* species group derived from the D2 variable region of 28S ribosomal RNA. *Mol. Phylogenet. Evol.* 6: 178-188.
- Posada D and Crandall KA (2001). Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends Ecol.Evol.* 16:37-45.
- Rogozin IB and Pavlov YI (2003). Theoretical analysis of mutational hotspots and their DNA sequence context specificity. *Mutat. Res.* 544: 65-85.
- Schofield CJ and Galvão C (2009). Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Trop.* 110: 88-100.

Figure 1. Parsimony haplotype network showing hotspot mutations in species of the subcomplex *Brasiliensis*, with *T. infestans* as the outgroup.



SHORT REPORT

Running title: **D2 domain is conserved in South American triatomines**

D2 region of the 28S RNA gene: a too conserved fragment for inferences on phylogeny of South American triatomines

Ana Letícia Guerra¹, Kaio Cesar Chaboli Alevi^{1*}, Cecília Artico Banho¹, Jader de Oliveira², João Aristeu da Rosa², Maria Tercília Vilela de Azeredo-Oliveira¹

¹ Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista - São José do Rio Preto, Rua Cristovão Colombo 2265, 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brasil

² Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista - Araraquara, Rod. Araraquara-Jaú km 1, 14801-902, Araraquara, SP, Brasil

Abstract

The *brasiliensis* complex is composed of five triatomine species and different approaches suggest that *Triatoma lenti* and *T. petrochiae* may be the new members. Therefore, this study sought to analyze the phylogenetic relationships within this complex by means of the D2 region of the 28S RNA gene and to analyze the degree of polymorphism and phylogenetic significance of this gene for South American triatomines. Phylogenetic analysis by using sequence fragments of D2 domain did not allow performing phylogenetic inferences on species within the *brasiliensis* complex, because the gene alignment composed of a matrix with 37 specimens exhibited only two variable sites along the 567 bp used. Furthermore, if all South American species are included, only four variable sites were detected, reflecting the high degree of gene conservation. Therefore, we do not recommend the use of this gene for phylogenetic reconstruction for this group of Chagas disease vectors.

Keywords: molecular taxonomy; nuclear gene; *brasiliensis* complex; *infestans* complex

Short Report

Triatomines are bloodsucking insects of great importance to public health because they transmit the protozoan *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas disease. Since 1966, triatomines have been grouped into complexes and specific subcomplexes.^{1,2} Although the use of complexes and subcomplexes do not follow the International Code of Zoological Nomenclature, there is a consensus that these groupings should reflect the phylogeny.³

Using mainly morphological characteristics and geographical distribution, Schofield and Galvão² grouped most of South American triatomine species within the *infestans* complex. This complex comprises the *brasiliensis*, *infestans*, *maculata*, *matogrossensis*, *rubrovaria* and *sordida* subcomplexes.

With the exception of *Triatoma melanocephala*, *T. vitticeps*, and *T. tibiamaculata*, which exhibit fragmentation of the sex chromosome X, all *infestans* complex species have 22 chromosomes.^{4,5,6,7} Using mitochondrial genes (16S, COI, COII and Cytb) and nuclear genes (18S and 28S), Justi et al.³ analyzed the phylogenetic relationships of 64 species within the Triatominae subfamily and suggested that *infestans* and *rubrovaria* subcomplexes are monophyletic. The non-monophyly of *brasiliensis* subcomplex was then evidenced because *T. melanocephala*, *T. vitticeps*, and *T. tibiamaculata* were clustered separately, and they were then excluded via cytogenetic analysis.^{5,6} With these exclusions, the *brasiliensis* complex is indeed a monophyletic group composed of *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis*, *T. melanica*, and *T. sherlocki*, and subspecies *T. b. macromelasoma*.^{8,9,10} However, it is important to note that *T. lenti* and *T. petrochiae* were not used in the phylogenetic analyses mentioned previously, possibly due their rarity. Cytogenetic data,^{6,11} experimental lab-crossings,¹² morphological analysis,² and geographic information² have also suggested that *T. lenti*

may be a member of the complex. *T. petrochiae* has cytogenetic characteristics similar to those of *brasiliensis* complex.⁶

The nuclear D2 region of the 28S RNA gene is frequently used in phylogenetic studies in the tribe Rhodniini^{13,14,15} and was recently analyzed in the *brasiliensis* complex.³ This gene consists of core segments that are highly conserved, and other useful for taxonomic purposes due to some variable regions, which are described as divergent D domains or expansion segments.¹⁶ The authors¹⁶ emphasized that the coexistence of variability and conserved regions along the 28S gene make this region suitable for estimating phylogenetic relationships among species, since sequence variation provides phylogenetic information while the conserved structure makes it easier to identify homology.

Therefore, this study aimed to analyze the phylogenetic relationships that *T. lenti* and *T. petrochiae* share with other members of the *brasiliensis* complex using the nuclear D2 region of the 28S RNA gene. In addition, a comparative analysis including other species of the subcomplexes grouped within the *infestans* complex was conducted to address the degree of polymorphism and the phylogenetic significance of this gene among South American triatomines.

Six adult specimens of each species in the *brasiliensis* complex were used (with the exception of *T. melanica*, with only 2 samples) and six adult *T. infestans* specimens (the outgroup) were used in the study, comprising a matrix with 37 sequences. The specimens were provided by the Triatomine Insectarium of the College of Pharmaceutical Sciences of São Paulo State University (UNESP), Araraquara Campus, in Brazil. The triatomines were dissected, genetic material was extracted from the legs using the DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions. PCR reactions were performed for amplification of the nuclear D2 variable

region of the 28S RNA gene according to Porter and Collins,¹⁷ with the forward sequence: 5'-GCGAGTCGTGTTGCTTGATAGTGCAG-3' and the reverse sequence: 5'-TTGGTCCGTGTTTCAAGACGGG-3'. The conditions for the amplification reactions of this gene were as follows: an initial cycle at 95° C for 2 minutes, followed by 40 cycles comprising denaturation (95° C, 30 seconds), annealing (68° C, 30 seconds) and extension (72° C, 1 minute), and a final single cycle at 72° C for 5 minutes. After electrophoresis, the amplified fragments were purified using the GFX PCR DNA & Gel Band kit (GE Healthcare and Life Technology) according to the manufacturer's instructions.

Direct sequencing was applied to the purified PCR products. The samples were sent to the Human Genome and Stem Cell Research Center, of the University of São Paulo (USP), Brazil. Sequences generated were analyzed using the BioEdit software, version 7.0.5, and a consensus sequence was obtained for each DNA segment. The sequences were aligned using the ClustalW. Subsequently, the MEGA 6.0 program for phylogenetic analysis was employed using the maximum likelihood method as a distance criterion. The bootstrapping resampling method was applied to assess support for the individual nodes (1,000 pseudoreplications). The Jukes–Cantor model was used to calculate genetic distances pairwise within each member of the complexes (Table 1) in the MEGA 6.0 software.

In addition, the nuclear D2 variable region of the 28S RNA gene sequences deposited in GenBank for species from the *infestans*, *maculata*, *matogrossensis*, *rubrovaria*, *sordida* and *brasiliensis* subcomplexes were used (Table supplement 1).

The nuclear D2 variable region of the 28S RNA gene did not allow to perform inferences on phylogenetic relationships among species within the *brasiliensis* complex due to the highly conserved nature of the fragments, with only two variable sites of 567

base pairs sequenced (Table 2, Figure Supplementary Material 1). Furthermore, when aligned with the species of the *infestans* complex, the gene also proved to be extremely conserved, with only four variable sites (Table 3).

Phylogenetic analyses of the tribe Rhodniini showed that this gene had 9% of variable sites.¹³ For species within the *brasiliensis* complex, however, the gene had only 0.35% of variable sites, and for the species in the *infestans* complex, the gene had 0.70% of variable sites. It is natural for the nuclear genes that are less polymorphic than mitochondrial, which have a rate of evolution by mutating five to ten times higher than a single copy nuclear gene.¹⁸ However, the ITS2 nuclear intergenic region was found to have 22% of variable sites between *T. infestans* and the *phyllosoma* complex and 21.2% of variable sites between *T. infestans* and *Dipetalogaster maxima*.¹⁹ This region was also found to have many polymorphic sites compared the tribes Triatomini and Rhodniini (85.8% variable sites).¹⁹

Recently, Justi et al.³ stated that DNA barcoding (COI) relies on a gene that does not separate the triatomine from South America, as observed by at least one intraespecific distance greater than the interspecific distances for species in the *infestans* complex. Initially, four *T. brasiliensis* populations were separated based on genetic distance.²⁰ Later, these populations were defined as *T. melanica*, *T. juazeirensis*, *T. b. brasiliensis*, and *T. b. macromelasoma*. The analysis of the distance matrix for the *infestans* complex species is in agreement with this study,²⁰ because the nuclear D2 region of the 28S RNA gene exhibited low variation (Table 1). This finding once again reflects the high degree of conservation of the gene. Our analysis confirms that the nuclear D2 region of the 28S RNA gene is not a good molecular marker for triatomine species from South America.

Thus, the nuclear D2 region of the 28S RNA gene did not allow for the confirmation of the phylogenetic relationships of *T. lenti* and *T. petrochiae* in comparison with the species from the *brasiliensis* complex. This domain proved to be extremely conserved in the South American triatomine species, thus demonstrating the fact that it is not a good molecular marker for phylogenetic studies on these vectors.

Acknowledgments

We thank Dr. Carlos Eduardo Almeida, Universidade Federal da Paraíba, Brazil, for the assistance in the construction of the phylogenetic tree and the useful comments and Dr. Claudia M. A. Carareto for lending the lab to perform the practical part of this work. Research supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

1. Usinger, RL, Wygodzinsky, P, Ryckman, RE 1966. The biosystematics of Triatominae. *Annu. Rev. Entomol* 11: 309-330.
2. Schofield CJ, Galvão C 2009. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Trop* 110: 88-100.
3. Justi SA, Russo CAM, Mallet JRS, Obara MT, Galvão C 2014. Molecular phylogeny of Triatomini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Paras. Vect* 7: 149.

4. Panzera F, Pérez R, Panzera Y, Ferrandis I, Ferreiro MJ, Calleros L 2010. Cytogenetics and genome evolution in the subfamily Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). *Cytogenet. Genome Res* 128: 77-87.
5. Alevi KCC, Mendonça PP, Pereira NP, Rosa JA, Azeredo-Oliveira MTV 2012. Karyotype of *Triatoma melanocephala* Neiva and Pinto (1923). Does this species fit in the Brasiliensis subcomplex? *Infect. Genet. Evol* 12: 1652–1653.
6. Alevi KCC, Rosa JA, Azeredo-Oliveira MTV 2014. Cytotaxonomy of the Brasiliensis subcomplex and the *Triatoma brasiliensis* complex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Zootaxa* 3838: 583-589.
7. Alevi KCC, Oliveira J, Moreira FFF, Jurberg J, Rosa JA, Azeredo-Oliveira MTV 2015. Chromosomal characteristics and distribution of constitutive heterochromatin in the Matogrossensis and Rubrovaria subcomplexes. *Infect. Genet. Evol* 33: 158-162.
8. Monteiro FA, Donnelly MJ, Beard CB, Costa J 2004. Nested clade and phylogeographic analyses of the Chagas disease vector *Triatoma brasiliensis* in Northeast Brazil. *Mol. Phylog. Evol* 32: 46-56.
9. Mendonça VJ, Silva MTA, Araujo RF, Junior JM, Junior MB, Almeida CE, Costa J, Graminha MAS, Cicarelli RMB, Rosa JÁ 2009. Phylogeny of *Triatoma sherlocki* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) inferred from two mitochondrial genes suggests its location within the *Triatoma brasiliensis* complex. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 81: 858-864.

10. Gardim S, Almeida CE, Takiya DM, Oliveira J, Araújo RF, Cicarelli RMB, Rosa JÁ 2014. Multiple mitochondrial genes of some sylvatic Brazilian *Triatoma*: non-monophyly of the *T. brasiliensis* subcomplex and the need for a generic revision in the Triatomini. *Infect. Genet. Evol* 23: 74-79.
11. Alevi KCC, Mendonça PP, Pereira NP, Guerra AL, Facina CH, Rosa JA, Azeredo-Oliveira MTV 2013. Distribution of constitutive heterochromatin in two species of triatomines: *Triatoma lenti* Sherlock and Serafim (1967) and *Triatoma sherlocki* Papa, Jurberg, Carcavallo, Cerqueira & Barata (2002). *Infect. Gen. Evol* 13: 301-303.
12. Mendonça VJ, Alevi KCC, Medeiros LMO, Nascimento JD, Azeredo-Oliveira MTV, Rosa JA 2014. Cytogenetic and morphologic approaches of hybrids from experimental crosses between *Triatoma lenti* Sherlock & Serafim, 1967 and *T. sherlocki* Papa et al., 2002 (Hemiptera: Reduviidae). *Infect. Gen. Evol* 26: 123-131.
13. Monteiro FA, Wesson DM, Dotson EM, Schofield CJ, Beard CB 2000. Phylogeny and molecular taxonomy of the Rhodniini derived from mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 62: 460-465.
14. Monteiro FA, Barrett TV, Fitzpatrick S, Cordon-Rosales C, Feliciangeli D, Neard CB 2003. Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. *Mol. Ecol* 12: 997-1006.

15. Díaz S, Panzera F, Jaramillo-O N, Pérez R, Fernández R, Vallejo G, Saldanã A, Calzada JE, Triana O, Gómez-Palacio A 2014. Genetic, Cytogenetic and Morphological Trends in the Evolution of the *Rhodnius* (Triatominae: Rhodniini) Trans-Andean Group. *PLoS ONE* 9: 87493.
16. Hillis DM, Dixon MT 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quart. Rev. Biol* 66: 411-453.
- 17 Porter CH, Collins FH 1996. Phylogeny of Nearctic Members of the *Anopheles maculipennis* Species Group Derived from the D2 Variable Region of 28S Ribosomal RNA. *Mol. Phyl. Evol* 6: 178-188.
18. Moritz C, Dowling, TE, Brown WM 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA. Relevance for population biology and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst* 18: 269-292.
19. Bargues MD, Marcilla A, Ramsey JM, Dujardin JP, Schofield CJ, Mas-Coma S 2000. Nuclear rDNA-based molecular clock of the evolution of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vectors of Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 95: 567-573.
20. Costa J, Freitas-Sibajev MGR, Marchon-Silva V, Pires MQ, Pacheco RS 1997. Isoenzymes Detected Variation in Populations of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 92: 459-464.

Table 1. JC-distance between species of the Infestans complex studied.

Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
(1) <i>Triatoma infestans</i> 1																	
(2) <i>T. platensis</i>	0,000																
(3) <i>T. infestans</i>	0,002	0,002															
(4) <i>T. wygodzinskyi</i>	0,004	0,004	0,006														
(5) <i>T. sordida</i>	0,004	0,004	0,006	0,000													
(6) <i>T. guasayana</i>	0,004	0,004	0,006	0,000	0,000												
(7) <i>T. costalimai</i>	0,004	0,004	0,006	0,000	0,000	0,000											
(8) <i>T. circummaculata</i>	0,004	0,004	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000										
(9) <i>T. baratai</i>	0,004	0,004	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000									
(10) <i>T. brasiliensis</i>	0,006	0,006	0,007	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004								
(11) <i>T. brasiliensis</i> 2	0,004	0,004	0,006	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002							
(12) <i>T. lenti</i> 1	0,004	0,004	0,006	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,000						
(13) <i>T. b. macromelasoma</i> 1	0,004	0,004	0,006	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,000	0,000					
(14) <i>T. juazeirensis</i> 1	0,004	0,004	0,006	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,000	0,000	0,000				
(15) <i>T. petrochiae</i> 1	0,004	0,004	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,002	0,002	0,002	0,002			
(16) <i>T. sherlocki</i> 1	0,004	0,004	0,006	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002		
(17) <i>T. melanica</i> 1	0,004	0,004	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,002	0,002	0,002	0,002	0,000	0,002	0,000

Table 2. Polymorphic sites determinants of the members Brasiliensis subcomplex. Referring the fragment of 567 bp of the D2 gene.

Species	Polymorphic sites	
	3 8 4	5 1 4
<i>T. brasiliensis 2</i>	T	T
<i>T. brasiliensis 4</i>	T	T
<i>T. brasiliensis 5</i>	T	T
<i>T. brasiliensis 6</i>	C	T
<i>T. brasiliensis 7</i>	C	T
<i>T. brasiliensis 1</i>	T	T
<i>T. lenti 1</i>	T	T
<i>T. lenti 2</i>	T	T
<i>T. lenti 3</i>	T	T
<i>T. lenti 4</i>	T	T
<i>T. lenti 5</i>	T	T
<i>T. b. macromelasoma 1</i>	T	T
<i>T. b. macromelasoma 2</i>	T	T
<i>T. b. macromelasoma 3</i>	T	T
<i>T. b. macromelasoma 5</i>	C	T
<i>T. b. macromelasoma 6</i>	C	T
<i>T. b. macromelasoma 7</i>	C	T
<i>T. juazeirensis 1</i>	T	T
<i>T. juazeirensis 3</i>	C	T
<i>T. juazeirensis 4</i>	T	T
<i>T. juazeirensis 5</i>	T	T
<i>T. juazeirensis 6</i>	C	T
<i>T. juazeirensis 7</i>	T	T
<i>T. petrochiae 1</i>	C	T
<i>T. petrochiae 3</i>	C	T
<i>T. petrochiae 4</i>	C	T
<i>T. petrochiae 5</i>	C	T
<i>T. petrochiae 6</i>	C	T
<i>T. petrochiae 7</i>	T	T
<i>T. sherlocki 1</i>	T	T
<i>T. sherlocki 2</i>	T	T
<i>T. sherlocki 3</i>	T	T
<i>T. sherlocki 4</i>	T	T
<i>T. sherlocki 5</i>	T	T
<i>T. sherlocki 7</i>	C	T
<i>T. melanica 1</i>	C	T
<i>T. melanica 2</i>	C	T

Table 3. Polymorphic sites determinants of the members *Infestans* complex. Referring the fragment of 567 bp of the D2 gene.

Species	Polymorphic sites			
	1	3	4	5
	7	8	6	1
	9	4	8	4
<i>T. infestans</i> GQ853397	.	.	C	.
<i>T. brasiliensis</i> CQ853395	C	T	.	T
<i>T. wygodzinsky</i> KC249222	.	C	.	T
<i>T. sordida</i> KC249209	.	C	.	T
<i>T. guasayana</i> KC249163	.	C	.	T
<i>T. costalimai</i> KC249149	.	C	.	T
<i>T. circummaculata</i> KC249147	.	C	.	T
<i>T. baratai</i> KC249143	.	C	.	T
<i>T. brasiliensis</i> 2	.	T	.	T
<i>T. brasiliensis</i> 4	.	T	.	T
<i>T. brasiliensis</i> 5	.	T	.	T
<i>T. brasiliensis</i> 6	.	C	.	T
<i>T. brasiliensis</i> 7	.	C	.	T
<i>T. brasiliensis</i> 1	.	T	.	T
<i>T. lenti</i> 1	.	T	.	T
<i>T. lenti</i> 2	.	T	.	T
<i>T. lenti</i> 3	.	T	.	T
<i>T. lenti</i> 4	.	T	.	T
<i>T. lenti</i> 5	.	T	.	T
<i>T. b. macromelasoma</i> 1	.	T	.	T
<i>T. b. macromelasoma</i> 2	.	T	.	T
<i>T. b. macromelasoma</i> 3	.	T	.	T
<i>T. b. macromelasoma</i> 5	.	C	.	T
<i>T. b. macromelasoma</i> 6	.	.	.	T
<i>T. b. macromelasoma</i> 7	.	C	.	T
<i>T. juazeirensis</i> 1	.	T	.	T
<i>T. juazeirensis</i> 3	.	C	.	T
<i>T. juazeirensis</i> 4	.	T	.	T
<i>T. juazeirensis</i> 5	.	T	.	T
<i>T. juazeirensis</i> 6	.	C	.	T
<i>T. juazeirensis</i> 7	.	T	.	T
<i>T. petrochiae</i> 1	.	C	.	T
<i>T. petrochiae</i> 3	.	C	.	T
<i>T. petrochiae</i> 4	.	C	.	T
<i>T. petrochiae</i> 5	.	C	.	T
<i>T. petrochiae</i> 6	.	C	.	T
<i>T. petrochiae</i> 7	.	T	.	T
<i>T. sherlocki</i> 1	.	T	.	T
<i>T. sherlocki</i> 2	.	T	.	T
<i>T. sherlocki</i> 3	.	T	.	T
<i>T. sherlocki</i> 4	.	T	.	T
<i>T. sherlocki</i> 5	.	T	.	T
<i>T. sherlocki</i> 7	.	C	.	T
<i>T. melanica</i> 1	.	C	.	T
<i>T. melanica</i> 2	.	C	.	T

Table supplement 1. Accession codes from Genbank sequences of *Triatoma* and species used in this study.

Subcomplex	Species	D2 (28S rDNA)
Infestans	<i>T. infestans</i> 1	In this study*
	<i>T. platensis</i>	GQ853400
	<i>T. infestans</i>	GQ853397
Maculata	<i>T. wygodzinskyi</i>	KC249222
Sordida	<i>T. sordida</i>	KC249209
Matogrossensis	<i>T. guasayana</i>	KC249163
	<i>T. costalimai</i>	KC249149
	<i>T. baratai</i>	KC249143
Rubrovaria	<i>T. circummaculata</i>	KC249147
	<i>T. brasiliensis</i>	CQ853395
Brasiliensis	<i>T. brasiliensis</i> 2	In this study*
	<i>T. lenti</i> 1	In this study*
	<i>T. b. macromelasoma</i> 1	In this study*
	<i>T. juazeirensis</i> 1	In this study*
	<i>T. petrochiae</i> 1	In this study*
	<i>T. sherlocki</i> 1	In this study*
	<i>T. melanica</i> 1	In this study*

*Sequences in this study will be deposited in Genbank.

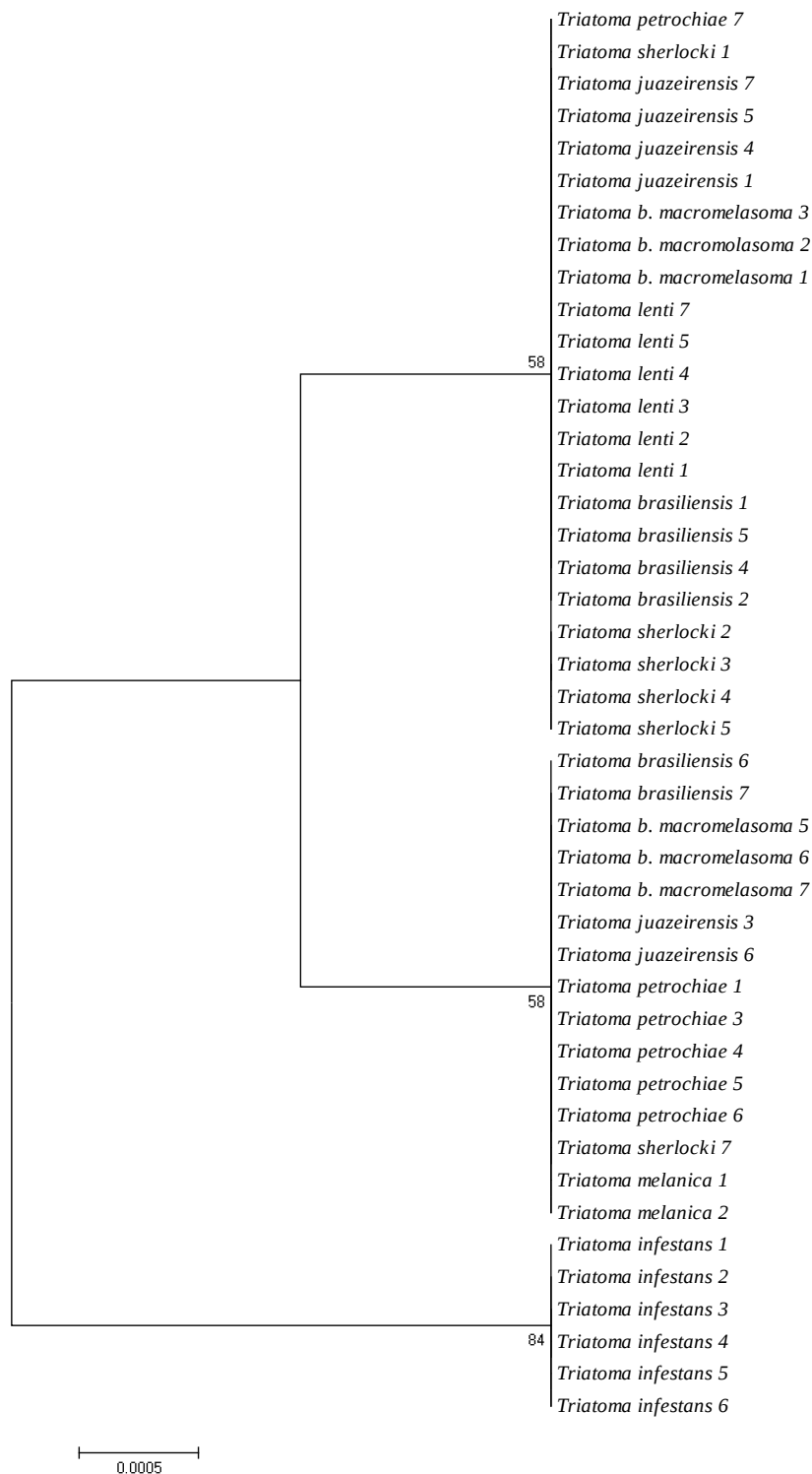


Figure supplement 1. Neighbor-joining tree based on Jukes-Cantor distances among members of Brasiiliensis complex, with D2 gene. The numbers at nodes represent the bootstrap values.

Capítulo 3 – Artigo científico a ser submetido para publicação na revista *Infection, Genetics and Evolution*

Phylogenetic analysis of *Brasiliensis* subcomplex (Hemiptera, Triatominae), by means of the ND1 mitochondrial gene

Ana Letícia Guerra¹, Kaio Cesar Chaboli Alevi¹, Cecília Artico Banho¹, Jader de Oliveira², João Aristeu da Rosa², Maria Tercília Vilela de Azeredo-Oliveira¹

¹ Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista - São José do Rio Preto, Rua Cristovão Colombo 2265, 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brasil

² Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista - Araraquara, Rod. Araraquara-Jaú km 1, 14801-902, Araraquara, SP, Brasil

ABSTRACT

The Brasiliensis subcomplex was proposed initially by geographical disposal, consisting of the species *Triatoma brasiliensis*, *T. petrochiae*, *T. pessoai*, *T. lenti* and *T. bahiensis* and the subspecies *T. b. melanica* and *T. b. macromelasoma*. Recently, through data on phylogenetic analyzes, the subcomplex composition was changed, including the species *T. brasiliensis*, *T. b. macromelasoma*, *T. melanica*, *T. juazeirensis*, *T. sherlocki*, *T. lenti* and *T. bahiensis*. However, it was suggested that other phylogenetic studies with new sequences might be used to assess the position of *T. lenti* and *T. petrochiae* regarding the species of the subcomplex. Thus, this study aimed to analyze the phylogenetic relationships of species from Brasiliensis subcomplex on the bases of a new molecular marker: ND1. Phylogenetic reconstruction confirmed the monophyletic relationship of *T. lenti* with members of the Brasiliensis subcomplex, rescued *T. petrochiae* as sister group of the subcomplex, corroborated to recognize the species status of *T. petrochiae* regarding *T. brasiliensis* and supported the idea of homoploid hybridization phenomenon to *T. b. macromelasoma*, contributing thus to the phylogenetic knowledge included in the species of Brasiliensis subcomplex.

KEYWORDS: *Triatoma lenti*, *Triatoma petrochiae*, homoploid hybridization

SHORT COMMUNICATION

Since 1966 the triatomines were grouped in complexes and specific subcomplexes, based mainly on morphology and geographical distribution (Usinger et al., 1966; Lucena, 1970; Lent and Wygodzinsky, 1979; Carcavallo et al., 2000; Schofield and Galvão, 2009). The Brasiliensis subcomplex was first proposed by Lucena (1970) as a systematic arrangement called Brasiliensis complex, composed of the species *Triatoma brasiliensis* (Neiva, 1911), *T. petrochiae* (Pinto and Barreto,

1925), *T. pessoai* (Sherlock and Serafim, 1967), *T. lenti* (Sherlock and Serafim, 1967) and *T. bahiensis* (Sherlock and Serafim, 1967) and the subspecies *T. b. melanica* (Neiva and Lent, 1941), *T. b. macromelanosoma* (Galvão, 1955).

Lent e Wygodzinsky (1979) synonymized the species *T. pessoai* and *T. bahiensis* with *T. lenti*. Costa et al. (2006), by means of morphological, biological, ecological, experimental, enzymatic and molecular analyses crossings raised specific status of *T. b. melanica* for *T. melanica*. Furthermore, the subspecies *T. b. macromelasoma* was redescribed and revalidated by Costa et al. (2013).

Through phylogenetic analysis using the mitochondrial gene *Cytb*, Monteiro et al. (2004) suggested that the Brasiliensis complex is a monophyletic group formed by species *T. brasiliensis*, *T. melanica*, *T. b. macromelasoma* and a population of *T. brasiliensis* from Juazeiro of which was later described as *T. juazeirensis* (Costa e Felix, 2007). In 2009, Mendonça et al. (2009), through mitochondrial genes *Cytb* and *16S*, suggested that *T. sherlocki* was the fifth member of that complex.

Schofield and Galvão (2009), mainly based on morphological characters and geographical distribution, grouped the triatomines of the South America in the Infestans complex. This complex is divided into six subcomplexes of species. In addition to the species *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis*, *T. melanica* and *T. sherlocki*, the authors grouped, in the Brasiliensis subcomplex, the species *T. lenti*, *T. petrochiae*, as originally suggested by Lucena (1970), and the species *T. melanocephala*, *T. vitticeps* and *T. tibiamaculata*. Alevi et al. (2012, 2014a, 2014b), by cytogenetic analyzes excluded *T. melanocephala*, *T. vitticeps* and *T. tibiamaculata* of Brasiliensis subcomplex. Gardim et al (2014), by means of the mitochondrial genes *Cytb*, *COI* and *16S*, presented supporte for excluding of these species from the subcomplex.

Mendonça et al. (2015) through several different analyses including morphology, cytogenetics, molecular and experimental hybrid crosses, revalidated the specie *T. bahiensis*. Moreover, the authors, utilizing the gene *Cytb*, have suggested that *T. bahiensis* is the sixth member of the Brasiliensis complex and *T. lenti* is the seventh member of the complex, as initially suggested by Lucena (1970), by geographical disposal, Alevi et al. (2012, 2013, 2014a), by cytogenetic analysis and Mendonça et al. (2014), by means of experimental hybrid crossing.

Newly, Oliveira et al. (unpublished data) analyzed the phylogenetic relationship of *T. petrochiae* with the species included in the Brasiliensis subcomplex. On the bases of data on mitochondrial genes *cytb*, *12S*, *16S*, *COI* and intergenic regions ITS, the authors suggested that *T. petrochiae* is a sister group of the species included in the Brasiliensis subcomplex and also suggested that the inclusion of this species in subcomplex should be considered with caution. The authors proposed that other phylogenetic studies with new sequences to had be made to evaluate the position of *T. lenti* and *T. petrochiae* in relation to the species of the subcomplex.

The ND1 mitochondrial gene belongs to family of NADH dehydrogenase 1, having an important role in oxidative phosphorylation. Analyses of the mitochondrial gene ND1, in the Triatominae subfamily, demonstrated that both the nucleotide sequences and amino acid sequences as don't change homogeneously along the whole gene. Furthermore, polymorphic sites from different parts of the gene don't appear to follow an uniform evolution rate within the different insect strains because hotspot or conserved intragenic regions are present in some strains but are absent in others (Bargues and Mas-Coma, 2009).

Thus, this study aimed to analyze the phylogenetic relationship of species of Brasiliensis subcomplex by means of a new molecular marker: ND1.

We used seventeen adult specimens of each species of *Brasiliensis* subcomplex (except for *T. melanica* that due to the difficulty to obtain specimens, had only two analyzed individuals) and *T. infestans* (used as outgroup), previously proved to be effective in phylogenetic studies of this subcomplex (Gardim et al., 2014; Mendonca et al., 2009). All of them came from the “Insectary of Triatominae” of the Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCFAR/UNESP), Campus of Araraquara, São Paulo, Brazil were used.

The triatomines were dissected and the legs used for extraction of the genetic material with the DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN), according to the manufacturer's instructions. The primers forward and reverse for the mitochondrial ND1 gene were constructed based on the sequence of the complete mitochondrial genome *T. dimidiata* (Genbank access AF301594, Dotson and Beard 2001). They were constructed with the assistance of Bioedit 7.0.5 software, used to perform the alignments of sequences and Primer 3, and ITD softwares were used in the construction and verification of the quality and integrity of the generated primers. The reverse primer was degenerate to encompass a greater number of species. The desired sequence was amplified using the following primers: *Forward*: 5'- TCTGATTACCCCTCAGCAAA - 3' and *Reverse*: 5'- GGAGCGTARGGTTTTRRGTTAT - 3'.

The conditions for the amplification reactions of this gene were as follows: an initial cycle at 95° C for 2 minutes, followed by 40 cycles comprising denaturation (95° C, 30 seconds), annealing (61° C, 30 seconds) and extension (72° C, 1,5 minute) finishing with one cycle at 72° C for 5 minutes. After electrophoresis, the amplified fragments were purified using the GFX PCR DNA & Gel Band kit (GE Healthcare and Life Technology) according to the manufacturer's instructions.

The products of purified PCR were subjected to direct sequencing, the samples were sent to the Research Center on the Human Genome and Stem Cells, USP/São Paulo, Brazil. The sequences of all individuals were analyzed by BioEdit software 7.0.5 and a consensus sequence was obtained for each DNA segment. The sequences were aligned using the ClustalW editor. Subsequently, we used the MEGA 6.0 program for constructing a phylogenetic tree using the maximum likelihood method as a distance criterion and the model HKY+G (Hasegawa-Kishino-Yano + Gamma 0,006). The resampling by bootstrap was applied to assess support for the individual nodes (1000 repetitions). The genetic distance matrix was also constructed through the software MEGA 6.0 using the model Tamura-Nei for estimates of evolutionary divergence between sequences.

As suggested by Mendonça et al. (2015), phylogenetic reconstruction with the gene confirmed the monophyletic relationship of *T. lenti* with members of the Brasiliensis subcomplex with 89% bootstrap (Figure 1). Oliveira et al. (unpublished data) also suggested that *T. petrochiae* was rescued as a sister group of species subcomplex (Figura 1).

Triatoma petrochiae has been regarded for long as identical to *T. brasiliensis*, being differentiated only by the absence of clear spots on the femur (Pinto and Barreto, 1925). Lent and Wygodzinsky (1979) confirmed the similarity between the two species, but emphasized that they present some morphological differences. Espínola (1971), through experimental crossing and Monteiro et al. (1998), through genetic parameters confirmed the specific status *T. petrochiae*. Our results corroborate the specific status the *T. petrochiae* with 0,085 genetic distance (Tabela 1).

The species *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis* and *T. b. macromelasoma* showed extremely low genetic distances (Tabela 1). These low genetic distances observed for

these species corroborate the homoploid hybridization phenomenon described by Costa et al. (2009). The authors suggested that *T. b. macromelasoma* resulted from the hybrid cross between *T. brasiliensis* and *T. juazeirensis*. These data that were supported by morphological, morphometric, environmental and geographical analysis are now also supported by the present molecular data.

Considering the geographical occurrence of *T. b. macromelasoma* (Pernambuco), which is situated between the areas of distribution of *T. b. brasiliensis* (north) and *T. juazeirensis* (south), it is suggested that the location of *T. b. macromelasoma* may support the natural hybridization of these species (hybrid zone). These data are reinforced by experimental crosses between *T. b. brasiliensis* and *T. juazeirensis* producing hybrids fertile, morphologically identical to *T. b. macromelasoma* (Costa et al, 2009; Costa, et al, 1997). The understanding of homoploide hybrid speciation has advanced substantially since this species formation mechanism has been coded for 50 years. Homoploidal hybrid speciation is defined as a hybridization process with no change in the number of chromosomes - it considered very rare (Mavarez et al, 2006).

Therefore, this study corroborates the phylogenetic relationship of the species *T. brasiliensis*, *T. b. macromelasoma*, *T. juazeirensis*, *T. melanica*, *T. sherlocki* and *T. lenti* included in the *Brasiliensis* subcomplex, confirms that *T. petrochiae* is a sister group of the subcomplex, corroborating for specific status of the species, and supports, by molecular data, the homoploid hybridization phenomenon for *T. b. macromelasoma*.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Carlos Eduardo Almeida for constructing the phylogenetic tree and for useful comments. Research supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado

de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

ETHICAL STANDARDS

The experiments comply with the current laws of the country in which they were performed.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

Alevi, K.C.C., Mendonça, P.P., Pereira, N.P., Rosa, J.A., Azeredo-Oliveira, M.T.V. 2012. Karyotype of *Triatoma melanocephala* Neiva and Pinto (1923). Does this species fit in the Brasiliensis subcomplex? Infect. Genet. Evol. 12, 1652-1653.

Alevi, K.C.C., Rosa, J.A., Azeredo-Oliveira, M.T.V. 2013. Mini review: karyotypic survey in Triatominae subfamily (Hemiptera, Heteroptera). Entomol. Ornithol. Herpetol. 2, 106.

Alevi, K.C.C., Rosa, J.A., Azeredo-Oliveira, M.T.V. 2014a. Cytotaxonomy of the Brasiliensis subcomplex and the *Triatoma brasiliensis* complex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Zootaxa 3838, 583-589.

Alevi, K.C.C., Mendonça, P.P., Pereira, N.P., Rosa, J.A., Azeredo-Oliveira, M.T.V. 2014b. Heteropyknotic filament in spermatids of *Triatoma melanocephala* and *T. vitticeps* (Hemiptera, Triatominae). Inv. Repro. & Devel. 58, 9-12.

Bargues, M.D., Mas-Coma, S. 2009. Populations, hybrids and the systematic concepts of species and subspecies in Chagas disease triatomine vectors inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA. *Acta Trop.* 110, 112-136.

Carcavallo, R.U., Jurberg, J., Lent, H., Noireau, F., Galvão, C. 2000. Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Proposals for taxonomic arrangements. *Entomol. Vect.* 7, 01-99.

Costa, J., Bargues M.D., Neiva V.L., Lawrence, G.G., Gumiel, M., Oliveira, G., Cabello, P., Lima, M.M., Dotson, E., Jr, D.W.OP., Almeida, C.E. Mateo, L., Mas-Coma, S., Dujardin, J.P. 2016. Phenotypic variability confirmed by nuclear ribosomal DNA suggests a possible natural hybrid zone of *Triatoma brasiliensis* species complex. *Infect. Gen. Evol.* 37, 77-87.

Costa, J., Freitas-Sibajev, M.G.R., Marchon-Silva V.P. 1997. Isoenzymes detect variation in populations of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 92, 459-464.

Costa, J.M., Argolo, A.M., Felix, M. 2006. Redescription of *Triatoma melanica* Neiva & Lent, 1941, new status (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Zootaxa* 1385, 47-52.

Costa, J., Felix, M. 2007. *Triatoma juazeirensis* sp. nov. from the state of Bahia, Northeastern Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102, 87-90.

Costa, J., Lorenzo, M. Biology, diversity and strategies for the monitoring and control of triatomines – Chagas disease vectors. 2009. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 104, 46-51.

Costa, J., Correia, N.C., Neiva V.L., Gonçalves, T.C.M., Felix, M. 2013. Revalidation and redescription of *Triatoma brasiliensis macromelasoma* Galvão, 1956 and an identification key for the *Triatoma brasiliensis* complex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 108, 785-789.

Dotson, E., Beard, C. B. 2001. Sequence and organization of the mitochondrial genome of the Chagas disease vector *Triatoma dimidiata*. Insect. Mol. Biol. 10, 205-215.

Espínola, H.N. Reproductive isolation between *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 and *Triatoma petrochii* Pinto & Barreto, 1925 (Hemiptera Reduviidae). 1971. Rev. Bras. Biol. 31, 278-281.

Galvão, F.C. 1955. *Triatoma brasiliensis macromelanosoma* n. subsp. (Hemiptera, Reduviidae). Rev. Bras. Malariol. D. Trop. 7, 455-457.

Gardim, S., Almeida, C.E., Takyai, D.M., Oliveira, J., Araújo, R.F., Cicarelli, R.M.B., Rosa, J.A. 2014. Multiple mitochondrial genes of some sylvatic Brazilian *Triatoma*: non-monophyly of the *T. brasiliensis* subcomplex and the need for a generic revision of Triatomini. Infect. Genet. Evol. 23, 74-79.

Lent, H., Wygodzinsky, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) and their significance as vector of Chagas's disease. 1979. Bull. Am. Museum of Nat. Hist. 163, 123-520.

Lucena, D.T. 1970. Estudos sobre a doença de Chagas no Brasil. Rev. Bras. Malariol. Trop. 22, 3-173.

Mavarez, J., Salazar, C.A., Bermingham, E., Christian, S., Jiggins, C.D. 2006. Speciation by hybridization in *Heliconius* butterflies. Nature. 441, 868–871.

Mendonça, V.J., Alevi, K.C.C., Medeiros, L.M.O., Nascimento, J.D., Azeredo-Oliveira, M.T.V., Rosa, J.A. 2014. Cytogenetic and morphologic approaches of hybrids from experimental crosses between *Triatoma lenti* Sherlock & Serafim, 1967 and *T. sherlocki* Papa et al., 2002 (Hemiptera: Reduviidae). Infect. Gen. Evol. 26, 123-131.

Mendonça, V.J., Alevi, K.C.C., Pinotti, H., Gurgel-Gonçalves, R., Pita, S., Guerra, A.L. Panzera, F., Araújo, R.F., Azeredo-Oliveira, M.T.V., Rosa, J.A. 2015. Revalidation of *Triatoma bahiensis* Sherlock and Serafim (1967) and phylogeny of *T. lenti* Sherlock and Serafim (1967) and *T. bahiensis* (Hemiptera, Reduviidae), new members of the Brasiliensis subcomplex. Para. Vect. In press.

Monteiro, F.A., Costa, J., Sole-Cava, A.M. 1998. Genetic confirmation of the specific status of *Triatoma petrochii* (Hemiptera:Reduviidae:Triatominae). Ann. Rev. Trop. Med, Parasitol. 92, 897-900.

Monteiro, F.A., Donnelly, M.J., Beard, B., Costa, J. 2004. Nested clade and phylogeographic analyses of the Chagas disease vector *Triatoma brasiliensis* in northeast Brazil. Mol. Phylogenet. Evol. 32, 46-56.

Neiva, A. 1911. Contribuição para o estudo dos hematophagos brasileiros e descrição de uma nova espécie de *Triatoma*. Brazil-Médico 25, 461-462.

Neiva, A., Lent, H. 1941. Sinopse dos triatomíneos. Rev. Entomol. 12, 62-92.

Oliveira, J., Almeida, C.E., Marcet, P.L., Gordillo, D.A., Gardim, S., Cardozo-de-Almeida, M., Mendonça, V.J., Costa, J., Rosa, J.A. Date Unpublished. Phylogenetic and morphometric relationships between *Triatoma petrochii* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) and members of *T. brasiliensis* species complex.

Pinto, C., Barreto, J.B. 1925. Uma nova espécie de “barbeiro” do Brasil, (*Triatoma petrochii* n.sp.). Sci. Medica 3, p.769.

Sherlock, I.A., Serafim, E.M. 1967. *Triatoma lenti* sp.n., *Triatoma pessoai* sp.n. e *Triatoma bahiensis* sp.n. do estado da Bahia, Brasil (Hemiptera: Reduviidae). Gaz. Med. Bahia 67, 75-92.

Schofield, C.J., Galvão, C. 2009. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Trop.* 110, 88-100.

Usinger, R.L., Wygodzinsky, P., Ryckman, R.E. 1966. The biosystematics of Triatominae. *Annu. Rev. Entomol.* 11, 309–330.

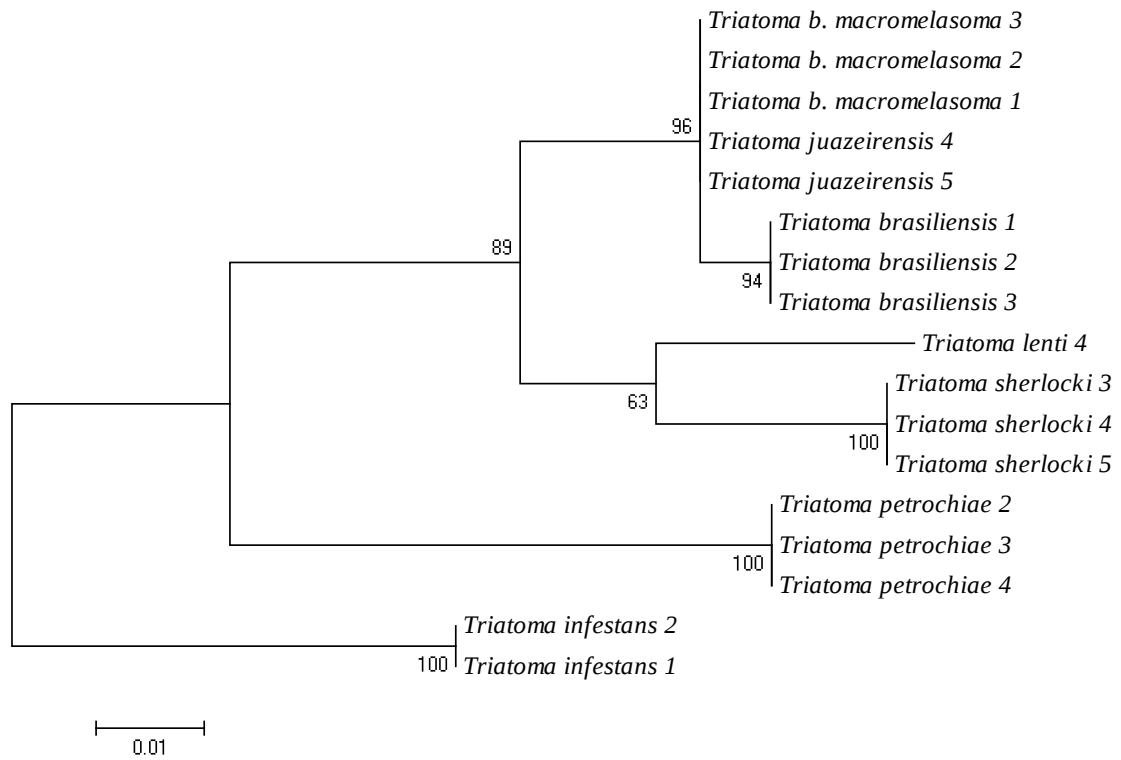


Fig. 1: Maximum likelihood tree based on HKY+G(0,006) distances among members of Brasiliensis subcomplex, with ND1 gene. The numbers at nodes represent the bootstrap values.

Table 1. Distance matrix constructed from the model Tamura-Nei showed distance between species of the Brasiliensis subcomplex through the mitochondrial gene ND1.

Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
(1) <i>Triatoma infestans</i> 1																	
(2) <i>T. infestans</i> 2	0,000																
(3) <i>T. brasiliensis</i> 1	0,085	0,085															
(4) <i>T. brasiliensis</i> 2	0,085	0,085	0,000														
(5) <i>T. brasiliensis</i> 3	0,085	0,085	0,000	0,000													
(6) <i>T. b. macromelasoma</i> 1	0,083	0,083	0,006	0,006	0,006												
(7) <i>T. b. macromelasoma</i> 2	0,083	0,083	0,006	0,006	0,006	0,000											
(8) <i>T. b. macromelasoma</i> 3	0,083	0,083	0,006	0,006	0,006	0,000	0,000										
(9) <i>T. lenti</i> 4	0,094	0,094	0,053	0,053	0,053	0,047	0,047	0,047									
(10) <i>T. sherlocki</i> 3	0,096	0,096	0,049	0,049	0,049	0,047	0,047	0,047	0,043								
(11) <i>T. sherlocki</i> 4	0,096	0,096	0,049	0,049	0,049	0,047	0,047	0,047	0,043	0,000							
(12) <i>T. sherlocki</i> 5	0,096	0,096	0,049	0,049	0,049	0,047	0,047	0,047	0,043	0,000	0,000						
(13) <i>T. petrochiae</i> 2	0,096	0,096	0,085	0,085	0,085	0,047	0,079	0,002	0,083	0,081	0,081	0,081					
(14) <i>T. petrochiae</i> 3	0,096	0,096	0,085	0,085	0,085	0,079	0,079	0,002	0,083	0,081	0,081	0,081	0,000				
(15) <i>T. petrochiae</i> 4	0,096	0,096	0,085	0,085	0,085	0,079	0,079	0,000	0,083	0,081	0,081	0,081	0,000	0,000			
(16) <i>T. juazeirensis</i> 4	0,083	0,083	0,006	0,006	0,006	0,000	0,000	0,002	0,047	0,047	0,047	0,047	0,079	0,079	0,079		
(17) <i>T. juazeirensis</i> 5	0,083	0,083	0,006	0,006	0,006	0,000	0,000	0,000	0,047	0,047	0,047	0,047	0,079	0,079	0,079	0,000	0,000

VI. Discussão geral

É surpreendente que mais de um século após a caracterização dos aspectos básicos da doença de Chagas (CHAGAS, 1909), ainda existam milhões de pessoas infectadas ou vivendo sob o risco de contrair essa doença transmitida pelos triatomíneos. A transmissão vetorial dessa doença acontece por meio do contato direto com as fezes de triatomíneos contaminados com o protozoário *T. cruzi*, devido ao seu hábito hematófago, porém caminhos alternativos surgiram na transmissão dessa doença, tornando-se sérias questões de saúde pública.

Em algumas regiões do nordeste brasileiro, por exemplo, a ingestão de comida contaminada por insetos infectados têm sido frequente, especialmente em localidades onde a polpa de açaí é apreciada, sendo responsável por surtos agudos da doença de Chagas (NOBREGA et al, 2009). A intensa migração humana também é um fator importante a ser considerado, pois devido a essa atividade, doenças têm sido reportadas com mais frequência em áreas não endêmicas (KIRCHOFF et al, 1993).

Mais de 62 espécies de triatomíneos habitam o Brasil e 40% destas estão presentes no nordeste brasileiro, onde residem os principais vetores da doença de Chagas, *Pastronylus megistus*; *T. brasiliensis*; *T. sordida*; *T. pseudomaculata*, além das espécies do gênero *Rhodnius* (JURBERG et al, 2014). Esses insetos podem ser encontrados em vários tipos de ecossistemas, em ambiente silvestre, cascas de árvores, buracos, fendas rochosas, grutas, cavernas e abrigos de animais em geral. Efetivamente, triatomíneos invadem as habitações humanas, seja devido ao desmatamento constante que têm ocorrido nos dias atuais ou até mesmo pela proximidade dessas habitações com o ambiente silvestre. Esses vetores dispersam-se facilmente e são facilmente atraídos por fontes luminosas instaladas nas habitações humanas, processo chamado de domiciliação. Nos ambientes peridomiciliares (ao redor da casa), esses insetos podem ser encontrados em abrigos de animais domésticos, tais como galinheiros, chiqueiros, currais, apriscos e canis. Dentro de casas (ambientes domiciliares), encontram-se, geralmente, nas paredes externas, sala e quartos ou atrás de objetos como quadros, estantes e embaixo da cama (GURGEL et al, 2012).

Nesse contexto, considerando os fatos citados acima, torna-se evidente a necessidade de diferentes abordagens sobre as espécies nordestinas de triatomíneos, como estudos taxonômicos, evolutivos, biológicos e ecológicos que são de extrema

importância para auxiliar nas atividades dos programas de controle dessa doença altamente negligenciada que é a doença de Chagas.

Importantes informações sobre a biologia desses insetos vetores têm sido obtidas por meio de técnicas de biologia molecular (PANIZZI; GRAZIA et al, 2015). O acúmulo crescente de dados nas sequências de DNA auxilia a inferência de filogenias mais robustas, o que reforça, cada vez mais, a necessidade de uma revisão dos gêneros e das espécies de triatomíneos, em especial do gênero *Triatoma* (GARDIM et al, 2014; JUSTI et al, 2014).

Hipóteses filogenéticas alternativas mostram que a subfamília Triatominae é considerada um grupo monofilético (HYPSE et al, 2002; WEIRAUCH; MUNRO, 2009; PATTERSON; GAUNT, 2010), porém alguns autores acreditam que este grupo seja parafilético (HWANG; WEIRAUCH, 2012) e existem autores que os consideram polifiléticos (DE PAULA et al, 2005; SCHOFIELD; GALVÃO, 2009), demonstrando, dessa forma, que as relações evolutivas dessa subfamília ainda não são bem compreendidas.

Atualmente, a utilização de marcadores moleculares vem sendo explorada, fornecendo assim informações importantes sobre a variabilidade genética dos triatomíneos, por meio da detecção de polimorfismo de DNA (BARGUES et al, 2009). O sequenciamento de determinados genes permite avaliar de forma direta, polimorfismos de DNA, fornecendo informações essenciais para identificar padrões filogenéticos (FUTUYMA, 1992).

Devido as taxas evolutivas do genoma mitocondrial ser mais rápidas em comparação com genomas nucleares, os genes mitocondriais são mais utilizados no estudo da evolução em famílias, gêneros e espécies (KUMAR, et al, 2014). Já o DNA nuclear devido à sua herança mendeliana e suas taxas evolutivas em geral têm sua utilidade reconhecida na sistemática de todos os grupos de organismos metazoários, pois inclui sequências que permitem a distinção entre espécies e entre as unidades de subespécies (BARGUES et al, 2008). Comparações de sequências de DNA nuclear oferecem informações valiosas sobre os eventos evolutivos em linhagens de triatomíneos e, por dedução das vias de dispersão de populações desses insetos, podendo também esclarecer a capacidade de espécies diferentes colonizarem novas áreas (BARGUES et al, 2002).

A partir das análises dos fragmentos D2 (gene 28S) pudemos observar a presença de mutações *hotspot* nas espécies do subcomplexo *Brasiliensis*. Mutações

hotspot são sítios que sofrem mutações muito mais constantemente que em outros, sendo que essas mutações são geradas mais frequentemente nesses sítios devido a ausência de mecanismos de reparo (NETTO; MENK, 2001).

Uma alta frequência de sítios homoplásicos foi encontrada nas análises de reconstrução filogenética realizadas por Monteiro et al, (2004), o que ele chamou de *hotspot* ou pontos quentes mutacionais. Os autores avaliaram por meio de genes mitocondriais (*cytb* e *16S*) 136 espécimes distribuídos em 16 populações de *T. brasiliensis*. Aparentemente mutações *hotspot* são comuns na classe Insecta e evidências atuais sugerem que a homoplasia reflete nessas mutações em vez de recombinação (DONNELLY et al, 2004; WALTON et al, 2000).

Galtier e colaboradores (2006) realizaram tentativas de detectar a presença de mutações *hotspot* na variação da sequência de DNA mitocondrial de mamíferos, questionando se a existência delas poderia explicar o alto nível de homoplasia encontrado dentro de cada espécie. Seus resultados sugeriram que, pelo menos, no genoma mitocondrial de mamíferos podem ocorrer efeitos de mutações neutras como consequência. Mutações *hotspot* podem dificultar a detecção de recombinação devido à geração de padrões de desequilíbrio de ligação independentemente da distância física, portanto os autores concluíram que este trabalho poderia conter suportes paradoxais para hipótese de recombinação.

Avaliando as mutações *hotspot* encontradas no nosso trabalho, observamos que todas as espécies do subcomplexo Brasiliensis, inclusive as espécies *T. lenti* e *T. petrochiae* compartilharam essa mutação encontrada no haplótipo 4, de acordo com esses dados sugerimos a possibilidade dessa mutação ser uma ferramenta molecular inicial para suportar a relação dessas espécies com os demais membros do subcomplexo Brasiliensis. Já quanto a mutação encontrada no haplótipo 1, também na posição 385, sugerimos que possa ser uma sinapomorfia compartilhada por essas espécies (exceto *T. melanica*). A espécie *T. melanica* provavelmente não apresentou essas mutações *hotspot* devido ao fato de ser considerada a forma evolutiva mais diferenciada entre os membros do subcomplexo Brasiliensis. Costa et al (2006) relataram que essa espécie apresenta incompatibilidade genética e gera híbridos inviáveis com todas as espécies do subcomplexo Brasiliensis, portanto acreditamos que as mutações *hotspot* encontradas podem ser característica das espécies desse subcomplexo.

Por outro lado, a análise do gene nuclear D2 não permitiu resgatar a relação filogenética entre as espécies do subcomplexo Brasiliensis, já que a filogenia gerada

apresentou, de forma geral, baixas consistências entre os ramos, evidenciados pelos baixos valores de *bootstraps* (58%) dificultando, assim, uma inferência evolutiva mais robusta nos cenários evolutivos observados. Dessa maneira, consideramos esse gene altamente conservado, já que apresentou apenas dois sítios variáveis em uma sequência total de 567 pb e um marcador molecular ineficaz para essas espécies. Além disso, quando realizamos uma análise comparativa com espécies agrupadas no complexo *Infestans*, também observamos que o gene nuclear D2 manteve-se conservado para as espécies de triatomíneos da América do Sul; apresentando apenas quatro possíveis sítios variáveis.

Díaz e colaboradores (2014) realizaram análises citogenéticas, morfométricas e estudos filogeográficos de indivíduos pertencentes a linhagens de *R. pallenscens*, *R. ecuadoriensis* e *R. colombiensis*, com o objetivo de esclarecer o quadro filogenético dessas espécies. Os estudos foram feitos com base na utilização dos genes mitocondriais *cytb* e *ND4* e gene nuclear D2. Os autores observaram que o gene D2 apresentou 12 sítios variáveis de um total de 434bp, portanto devido ao baixo número de sítios variáveis encontrados nesse gene, não foram obtidas topologias confiáveis para este marcador. Este fato corrobora com nossos resultados, destacando mais uma vez o alto grau de conservação desse gene. Pesquisas realizadas em outros grupos de insetos também têm sido feitas, como, por exemplo, na ordem *Lepidoptera* (Abraham e colaboradores, 2001). Os autores analisaram a relação filogenética entre os grupos irmãos *Geometridae* e *Drepanidae* baseado nos genes nucleares D1 e D2 (domínios do gene 28S). Os autores também não conseguiram resgatar evidências filogenéticas concretas utilizando esses marcadores.

As análises utilizando o gene mitocondrial ND1, nos permitiu gerar uma reconstrução filogenética das espécies do subcomplexo *Brasiliensis*, corroborando, dessa forma, a relação monofilética entre *T. lenti* com os membros desse subcomplexo (89% *bootstrap*), assim como observado por Mendonça e colaboradores (2015), por meio do gene mitocondrial *cytb*. Além disso, possibilitou resgatar *T. petrochiae* como grupo irmão (100% de *bootstrap*) das espécies desse subcomplexo, assim como observado por Oliveira et al. (dados não publicados) e permitiu confirmar o *status* específico dessa espécie em relação a *T. brasiliensis*, pois apresentou alta distância genética (0,085%).

O genoma mitocondrial é considerado fácil para amplificar e sequenciar (ARIF et al, 2011) . Mas, deve ser utilizado com ferramentas de bioinformática adequadas, isso

é um fator importante para uma inferência filogenética confiável. A sequência do genoma mitocondrial para ser utilizada em investigação filogenética é, portanto, restrita às espécies estreitamente relacionadas, devido à sua alta taxa de substituição nucleotídica.

O conteúdo do genoma mitocondrial sofre variações em sua sequência, no entanto, tem sido utilizado para resolver problemas filogenéticos de espécies relacionadas e também consideradas distantes, baseando-se no compartilhamento de características derivadas (RAWLINGS et al, 2001; BROWN et al, 1998).

Estudos utilizando o gene mitocondrial ND1 têm permitido detectar indivíduos com introgressão híbrida na natureza pela primeira vez (BARGUES et al, 2009). Três híbridos por introgressão foram encontrados no complexo *Infestans*, pois enquanto a classificação morfológica e as sequências ITS-1 e ITS-2 indicavam que os triatomíneos eram um espécime de *T. platensis* proveniente do Uruguai, e dois espécimes de *T. delpontei* vindo de Santiago, Argentina e Chaco, sequência ND1 indicou que esses três espécimes apresentavam sequências de *T. infestans* nos haplótipos a-I, a-I e c-III, respectivamente. A detecção de introgressão híbrida em três países diferentes revela ausência de duplicação na região ITS, sugerindo que essas amostras podem ser de populações híbridas estáveis. A presença de híbridos estáveis nessas áreas sugere que uma troca genética entre as espécies ocorreu, originando, assim, uma grande variabilidade genética dando base a ampla plasticidade dos triatomíneos (CATALA et al, 2007; BARGUES et al, 2009).

No presente estudo observamos, a partir dos dados gerados com a construção da matriz de distância genética, que as espécies *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis* e a subespécie *T. b. macromelasoma* apresentaram distâncias extremamente baixas (0,006%). Essas baixas distâncias genéticas observadas para esses três indivíduos corroboram com o fenômeno de hibridação homoploidal, inicialmente descrito por Costa et al. (2009), por meio de dados morfológicos. Os autores sugerem que *T. b. macromelasoma* seja resultado do cruzamento híbrido entre *T. brasiliensis* e *T. juazeirensis*.

Considerando a posição geográfica de ocorrência de *T. b. macromelasoma* (Pernambuco), a qual é situada entre as áreas de distribuição de *T. b. brasiliensis* (norte) e *T. juazeirensis* (sul), sugere-se que a localização de *T. b. macromelasoma* seja uma área de hibridação natural entre essas espécies (zona híbrida).

Esses dados são reforçam a indicação anterior baseada em cruzamentos experimentais entre *T. b. brasiliensis* e *T. juazeirensis*, que produziram híbridos férteis, morfologicamente idênticos a *T. b. macromelasoma* (COSTA, et al, 2009; COSTA, et al, 1997).

O entendimento sobre especiação híbrida homoploidal tem avançado substancialmente desde que esse mecanismo de formação de espécies foi codificado há 50 anos. Especiação híbrida homoploidal é definida como um processo de hibridização sem alteração no número de cromossomos (MAVÁREZ et al, 2006). A utilização de várias abordagens moleculares, combinando genes nucleares e mitocondriais tem favorecido um grande avanço na classificação dos triatomíneos e também de insetos em geral. A classificação desses insetos de forma independente de caracteres morfológicos amplia as possibilidades de estudar a variabilidade genética e os polimorfismos dentro de uma espécie, examinando, assim, o seu processo evolutivo (GUMIEL et al, 2003; PACHECO et al, 2003, 2007; ADAMS et al, 2009; COSTA et al, 2013; COSTA et al, 2016).

Costa e colaboradores (2016) investigaram a existência de fenótipos cromáticos intermediários para a subespécie *T. b. macromelasoma* em vários locais nas áreas de ocorrência entre o *T. b. brasiliensis* e *T. juazeirensis*. Treze padrões de cores diferentes foram caracterizados pela primeira vez e nove deles exibiram fenótipos intermediários. As análises moleculares realizadas pelos autores utilizando a região intergênica do DNA ribossomal (ITS-1, 5,8S e ITS-2), agruparam todas as espécies dentro do subcomplexo *Brasiliensis*. Os fenótipos cromáticos intermediários, as análises moleculares e os cruzamentos experimentais, em conjunto, suportam a distinção de uma zona de hibridação que deu origem à *T. b. macromelasoma*, por meio da evolução homoploidal.

Dessa forma, de acordo com os resultados encontrados, o presente trabalho também corrobora, por meio da baixa distância genética observada com o gene mitocondrial ND1, o fenômeno de hibridização homoploidal que deu origem a subespécie *T. b. macromelasoma* e ressalta a importância da utilização do gene ND1 em novas análises filogenéticas na subfamília *Triatominae*.

VII. Conclusões

Em relação ao domínio D2 (região do gene nuclear 28S DNAr):

- Descrevemos as mutações *hotspot*, encontradas nos membros do subcomplexo *Brasiliensis*;
- Sugerimos que as três mutações *hotspot* transversões encontradas na posição 385 no haplótipo 1 e no haplótipo 4 dos membros do subcomplexo *Brasiliensis* (incluindo as espécies *T. lenti* e *T. petrochiae*) possam ser uma sinapomorfia compartilhada entre elas e , com isso, uma ferramenta inicial para suportar a relação dessas espécies com as demais espécies do subcomplexo;
- O domínio D2 não permitiu confirmar a relação filogenética entre as espécies *T. lenti* e *T. petrochiae* com os membros do subcomplexo *Brasiliensis*, demonstrando não ser um marcador molecular eficiente para essas espécies e também provou ser extremamente conservado para as espécies de triatomíneos da América do Sul.

Em relação ao gene mitocondrial ND1:

- Mostrou-se eficiente como marcador molecular para as espécies do subcomplexo *Brasiliensis*, pois por meio dele conseguimos corroborar a relação filogenética das espécies do subcomplexo *Brasiliensis* com *T. lenti* e *T. petrochiae*;
- Confirmamos, por meio de análises filogenéticas, que a espécie *T. petrochiae* é um grupo irmão das espécies do subcomplexo *Brasiliensis* e, dessa forma, seu *status* específico;
- Reforçamos por dados moleculares o fenômeno de hibridação homoploidal, que originou a subespécie *T. b. macromelasoma*.

VIII. Referências Bibliográficas

ABAD-FRANCH, F.; MONTEIRO, F. Molecular research and the control of Chagas disease vectors. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, p. 437-454, 2005.

ABAD-FRANCH, F.; DIOTAIUTI, L.; GURGEL-GONÇALVES, R.; GUTTE, R. E. Certifying the interruption of Chagas disease transmission by native vectors: cui bono? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 251-254, 2013.

ABRAHAM D.; RYRHOLM N.; WITZELL H.; HOLLOWAY J. D.; SCOBLE M. J.; LOFSTEDT C. Molecular Phylogeny of the Subfamilies in Geometridae (Geometroidea: Lepidoptera). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 20, p. 65–77, 2001.

ACTIS, A. S.; TRAVERSA, O. C.; CARCAVALLO, R. U. Estudios taxonómicos sobre el género *Triatoma* Laporte mediante la electrophoresis de la linfa. **Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas**, v. 13. p. 97-106, 1964.

ADAMS B.; BOOTS M. How important is vertical transmission in mosquitoes for the persistence of dengue? Insights from a mathematical model. **Epidemics**, v. 2, p. 1-10, 2009.

ALEVI, K. C. C.; MENDONÇA, P. P.; PEREIRA, N. P.; ROSA, J. A.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Karyotype of *Triatoma melanocephala* Neiva and Pinto (1923). Does this species fit in the Brasiliensis subcomplex? **Infection Genetics and Evolution**, v. 12, p. 1652–1653, 2012.

ALEVI, K. C. C.; MENDONÇA, P. P.; PEREIRA, N. P.; ROSA, J. A.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Spermatogenesis in *Triatoma melanocephala* (Hemiptera: Triatominae). **Genetic Molecular Research**, v. 12, p. 4944-4947, 2013.

ALEVI, K. C. C.; ROSA, J. A.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Cytotaxonomy of the Brasiliensis subcomplex and the *Triatoma brasiliensis* complex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Zootaxa**, v. 3838, p. 583-589, 2014.

ARIF M. Development of specific primers for genus *Fusarium* and *F. solani* using rDNA sub-unit and transcription elongation factor (TEF-1 α) gene. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 444-447, 2011.

ARGOLA, A. M.; FÉLIX, M.; PACHECO, R.; COSTA, J. **Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil**. Ed. Imperial, 65 p.2008.

ARRIEL, N. H. de C; COSTA, M. M.; TREVISOLI, S. H. U.; DI MAURO, A. O. **Outras Aplicações dos Marcadores In: Marcadores Moleculares**. 1 ed. Viçosa, p.145-204, 2006.

AVISE, J. C. **Molecular Markers, Natural History, and Evolution**. Chapman and Hall, New York, NY, p. 511, 1994.

AVISE, J. C. **Phylogeography: the history and formation of species**. Cambridge: Harvard University Press, p. 511, 2000.

BAKER, N.; DE BRUYN, M.; MATHER, P. B. Patterns of molecular diversity in wild stocks of the redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) from northern Australia and Papua New Guinea: impacts of Plio-Pleistocene landscape evolution. **Freshwater Biology**, v. 53, p. 1592-1605, 2008.

BARGUES, M. D.; MAS-COMA, S. Phylogenetic analysis of lymnaeid snails based on 18S rDNA sequences. **Molecular Biology and Evolution**, v. 14, p. 569-577, 1997.

BARGUES, M. D.; MARCILLA, A.; RAMSEY, J.; DUJARDIN, J. P.; SCHOFIELD, C. J. MAS-COMA, S. Nuclear rDNA-based molecular clock of the evolution of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vector of Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.**, v. 95, p. 567-573, 2000.

BARGUES, M. D.; MARCILLA, A.; DUJARDIN, J. P.; MAS-COMA, S. Triatominae vectors of Chagas disease: a molecular perspective based on nuclear ribosomal DNA markers. **Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, p. 159-164, 2002.

BARGUES, M. D.; KLISIEWICZ, D. R.; GONZALES-CANDELAS, F.; RAMSEY, J. M.; MONROY, C.; PONCE, C.; SALAZAR-SCHETTINO, P. M.; PANZERA, F.; ABAD, F.; SOUSA, O. E.; SCHOFIELD, C. J.; DUJARDIN, J. P.; GUHL, F.; MAS-COMA, S. Phylogeography and genetic variation of *Triatoma dimidiata*, the main Chagas' disease vector in Central America, and its position within the genus *Triatoma*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, p. 233, 2008.

BARGUES M. D.; MAS-COMA S. Populations, hybrids and the systematic concepts of species and subspecies in Chagas disease triatomine vectors inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA. **Acta Tropica**, v. 110, p. 112-136, 2009.

BARGUES, M. D.; SCHOFIELD, C. J.; DUJARDIN, J. P. Classification and phylogeny of Triatominae. Telleria and M. Tibayrenc (eds.), **American Trypanosomiasis: Chagas disease. One hundred years of research**. Elsevier Inc., Burlington, MA., p. 115–149. In J. 2010.

BORGES, E. C.; DUJARDIN J. P.; SCHOFIELD C. J.; ROMANHA A. J.; DIOTAIUTI L. Dynamics between sylvatic, peridomestic and domestic populations of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae) in Ceará State, Northeastern Brazil. **Acta Tropica**, V. 93, p. 119–126, 2005.

BROWN, W. M. Evolution of animal mitochondrial DNA. **Evolution of genes and proteins**. Sinauer Associates Inc., Massachusetts, p. 62-88, 1985.

BROWN, K. S.; EMMEL, T. C.; ELIAZAR, P. J.; SUOMALAINEN E. Evolutionary patterns in chromosome numbers in neotropical Lepidoptera. I. Chromosomes of the Heliconiini (Family Nymphalidae: Subfamily Nymphalinae). **Hereditas**, v. 117, p. 109-125, 1998.

CARCAVALLO, R.U.; JURBERG, J.; LENT, H. Phylogeny of the Triatominae. A General approach. In: CARCAVALLO, R. U.; GALÍNDEZ-GIRÓN, I.; JURBERG, J.; LENT, H. **Atlas of Chagas Disease Vectors in the Americas**, Ed. Fiocruz, Rio de Janeiro, v.3, p.925-969, 1999.

CARCAVALLO, R. U.; MARTÍNEZ, A. M. Biología, ecología y distribución geográfica de los Triatomos Americanos (excepto *R. prolixus*, *P. megistus*, *T. dimidiata* y *T. infestans*). In: CARCAVALLO, R. U.; RABINOVICH, J. E.; TONN, R. **J. Factores biológicos y ecológicos en la enfermedad de Chagas**. Buenos Aires: Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud., v.1, p.149-208, 1985.

CATALA S.; GORLA D.; JUAREZ P.; PICOLLO M. J.; PANZERA F.; NOIREAU F.; ROJAS C.; DUJARDIN J. P.; ZERBA E.; VASSENA C. **Causas biológicas y ambientales de la estructuración espacial en Triatoma Infestans y sus implicaciones en el control vectorial. Actualización de la Tripanosomiasis Americana**, Taller del Cono Sur, Proyecto SSA-ATU/Comunidad General de Investigación Científica y Tecnológica, y Universidad Nacional de Asunción, Asunción, Paraguay, p. 13-18, 2007.

CHAGAS, C. R. J. Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen. n. esp., agente da nova entidade mórbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159-218, 1909.

COOK, B. D.; BUNN, S. E.; HUGHES, J. M. Molecular evidence for sequential colonization and taxon cycling in freshwater decapod shrimps on a Caribbean island. **Molecular Ecology**, v. 17, p. 1066-1075, 2008.

COSTA, J.; FREITAS-SIBAJEV, M. G. R.; MARCHON-SILVA, V.; PIRES. Isoenzymes detect variation in populations of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, p. 459-464, 1997a.

COSTA, J.; BARTH, O. M.; MARCHON-SILVA, V.; ALMEIDA, C. E.; FREITAS-SIBAJEV, M. G. R.; PANZERA, F. Morphological studies on the *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) Genital structures and eggs of different chromatic forms, **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, p. 493-498, 1997b.

COSTA, J.; SILVA, V.M. Período de Intermuda e Resistência ao jejum de Diferentes Populações de *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Entomologia y Vectores**, v. 5, p. 23-34, 1998a.

COSTA, J.; RIBEIRO-DE-ALMEIDA, C.; BRITTO, R. D.; MARCHON-SILVA, V.; PACHECO, R. S. Ecotopes, natural infection and trophic resources of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, p. 7-13, 1998b.

COSTA, J.; ALMEIDA, C. E.; DOTSON, E. M.; LINS, A.; VINHAES, M.; SILVEIRA, A. C.; BEARD, C. B. The epidemiologic importance of *Triatoma brasiliensis* as a Chagas disease vector in Brazil: a revision of domiciliary captures during 1993-1999. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 443-449, 2003.

COSTA, J.M.; ARGOLLO, A.M.; FELIX, M. Redescription of *Triatoma melanica* Neiva & Lent, 1941, new status (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Zootaxa** v. 1385, p. 47-52, 2006.

COSTA, J.; FELIX, M. *Triatoma juazeirensis* sp. nov. from Bahia State, northeastern Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 87-90, 2007.

COSTA J.; PETERSON A. T.; DUJARDIN J. P. Morphological evidence suggests homoploid hybridization as a possible mode of speciation in the Triatominae (Hemiptera, Heteroptera, Reduviidae). **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, p. 263-270, 2009.

COSTA, J.; CORREIA, N. C.; NEIVA, V. L.; GONÇALVES, T. C. M.; FELIX, M. Revalidation and redescription of *Triatoma brasiliensis macromelasoma* Galvão, 1956 and an identification key for the *Triatoma brasiliensis* complex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 785-789, 2013.

COSTA J.; BARGUES M. D.; NEIVA V. L.; LAWRENCE G. G.; GUMIEL M.; OLIVEIRA G.; CABELLO P.; LIMA M. M.; DOTSON E.; JR D. W. P.; ALMEIDA C. E.; MATEO L.; MAS-COMA S.; DUJARDIN J. P. Phenotypic variability confirmed by nuclear ribosomal DNA suggests a possible natural hybrid zone of *Triatoma brasiliensis* species complex. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 37, p. 77-87, 2016.

CHANDRA, S. B. C.; JENNIFER, L. VLK.; KAPATRAL, V. Comparative insect mitochondrial genomes: Differences despite conserved genome synten. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 1308-1318, 2006.

CLEMENT M.; POSADA D.; CRANDALL K. A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology** 9, 1657–1660, 2000.

DEPAULA A. S.; DIOTAIUTI L.; SCHOFIELD C. J. Testing the sister-group relationship of the Rhodniini and Triatomini (Insecta: Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 35, 712–718, 2005.

DÍAZ S.; PANZERA F.; JARAMILLO-O N.; PEREZ R.; FERNANDEZ R.; VALLEJO G.; SALDAÑA A.; CALZADA J. E.; TRIANA O.; GOMEZ-PALACIO A. Genetic, Cytogenetic and Morphological Trends in the Evolution of the Rhodnius (Triatominae: Rhodniini) Trans-Andean Group. **Plos One**, v. 9, 2014.

DINIZ-FILHO, J. A. F.; BINI, L. M. Modelling geographical patterns in species richness using eigenvector-based spatial filters. **Global Ecology and Biogeography**, v. 14, p. 177–185, 2005.

DIOTAIUTI L. O risco de domiciliação de novas espécies de triatomíneos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.33, n.2, p.31-35, 2000.

DONNELLY P.; FEARNHEAD P.; HARDING R. M.; SCHNEIDER J. A.; MYERS S. Application of Coalescent Methods to Reveal Fine-Scale Rate Variation and Recombination Hotspots. **Genetics**, v. 167, p. 2067-2081, 2004.

DOTSON E.M.; BEARD C.B. Sequence and organization of the mitochondrial genome of the Chagas disease vector, *Triatoma dimidiata*. **Insect Molecular Biology**, v. 10, p. 205–215, 2001.

ESPÍNOLA, H.N. Reproductive isolation between *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 and *Triatoma petrochii* Pinto e Barreto, 1925 (Hemiptera Reduviidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 31, p.278-281, 1971.

FORATTINI, O. P. Biogeography, origin, and distribution of triatominae domiciliarity in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v.14, n.3, 1980.

FUTUYMA D. J.; FARRELL B. D.; MITTER C. Diversification at the insect-plant interface. **BioScience**, v. 42, n. 1, p. 34-42, 1992.

FREITAS, S.; MALET, J. R. S.; COSTA, J.; SOUZA, A. L. B.; SERRÃO, J.; GONÇALVES, T. C. M. A comparative study of testis follicles in species of *Triatoma* (Hemiptera: Triatominae). **Animal Biology**, v. 58, p. 227-233, 2008.

GALTIER N.; ENARD D.; RADONDY Y.; BAZIN E.; BELKHIR K. Mutation hot spots in mammalian mitochondrial DNA. **Genome Research**, v. 16, p. 215-222, 2006.

GALVÃO, F. C. *Triatoma brasiliensis macromelanosoma* n. subsp. (Hemiptera, Reduviidae). **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v.7, p. 455-457, 1955.

GARCIA, B. A.; MORIYAMA, E. N.; POWELL, J. R. Mitochondrial DNA sequences of Triatomines (Hemiptera: Reduviidae): Phylogenetic relationships. **Entomological Society of America**, v. 38, p. 675-683, 2001.

GARCIA, B. A; POWELL, J. R. Phylogeny of species of *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae) based on mitochondrial DNA sequences. **Journal of Medical Entomology**, v. 35, p. 232-238, 1998.

GARDIM, S.; ALMEIDA, C. E.; TAKIYA, D. M.; OLIVEIRA, J.; ARAÚJO, R. F.; CICARELLI, R. M. B.; ROSA, J. A. Multiple mitochondrial genes of some sylvatic Brazilian *Triatoma*: non-monophyly of the *T. brasiliensis* subcomplex and the need for a generic revision of Triatomini. **Infection, Genetic and Evolution**, v. 23, p. 74-79, 2014.

GUMIEL M.; CATALA S.; NOIREAU F.; ARIAS A. R.; GARCIA A.; DUJARDIN J. P. Wing geometry in *Triatoma infestans* (Klug) and *T. melanosoma* Martinez, Olmedo and Carcavallo (Hemiptera:Reduviidae). **Systematic Entomology**, v. 28, p. 173-180, 2003.

GURGEL-GONÇALVES, R.; GALVÃO, C.; COSTA, J.; PETERSON, A. T. Geographic distribution of Chagas disease vectors in Brazil based on ecological niche modeling. **Journal Tropical Medicine**, p. 1-15, 2012.

HYPSA, V.; TIETZ, D. F.; ZRZAVÝ, J.; REGO, R. O.; GALVÃO, C.; JURBERG, J. Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the Asiatic clade. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 23, p. 447-457, 2002.

JURBERG, J. et al. Revalidação de *Triatoma garciabesi* Carcavallo, Cichero, Martinez, Prosen, Ronderos, 1967 (HEMIPTERA-REDUVIIDAE). **Entomologia y Vectores**, v.5, n.3, p.107-122, 1998.

JURBERG, J. Ferramentas Usadas em Taxonomia de Triatomíneos o uso Múltiplo. **Entomologia y Vectores**, v.10 n.4, p.497-509, 2003.

JURBERG, J. et al. **ATLAS ICONOGRÁFICO DOS TRIATOMÍNEOS DO BRASIL (VETORES DA DOENÇA DE CHAGAS)**, 2014.

JURBERG, J.; CUNHA, V.; CAILLEAUX, S.; RAIGORODSCHI, R.; LIMA, M. S.; ROCHA, D. S.; MOREIRA, F.F.F. *Triatoma pintodiasi* sp. nov. do subcomplexo *T. rubrobaria* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 4, p. 43-56, 2013.

JURBERG, J.; LENT, H.; GALVÃO, C. Male genitalia and its importance in taxonomy. In: CARCAVALLO, R. U.; GALÍNDEZ-GIRÓN, I.; JURBERG, J.; LENT, H. (eds.). **Atlas of Chagas Disease Vectors in the Americas**, Fiocruz, Rio de Janeiro, v.1, p.85-106, 1997.

JUSTI S. A.; DALE C.; GALVÃO C. DNA barcoding does not separate South American *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae), Chagas Disease vectors. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 519, 2014.

KIRCHOFF L. V. American trypanosomiasis (Chagas disease): A tropical disease now in the United States. **The New England Journal of Medicine**, v. 329, p. 639-644, 1993.

KUMAR S.; TAMURA K.; PETERSON D.; SANDERFORD M.; LIU L.; STECHER G. MEGA-MD: **Molecular Evolutionary Genetics Analysis software with mutational diagnosis of amino acid variation**, 2014.

LENT, H.; JURBERG, J. O gênero *Panstrongylus* Berg, 1879, com um estudo sobre a genitália externa das espécies (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Revista Brasileira Biologia**, v.35, p.379-438, 1975.

LENT, H.; JURBERG, J. O gênero *Rhodnius* Stål, 1859, com um estudo sobre a genitália das espécies (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Revista Brasileira Biologia**, v.29, p.487-560, 1969.

LENT, H.; JURBERG, J. Estudo morfológico comparativo de *Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1811) e *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) e suas

genitálias externas (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Revista Brasileira Biologia**, v.28, p.499-520, 1968.

LENT H. Novos sinônimos de duas espécies de Triatominae da Venezuela (Hemiptera, Reduviidae). **Entomologia y Vectores**, v. 4, p. 67-70, 1997.

LENT, H.; WYGODZINSKY, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) and their significance as vector of Chagas's disease. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 163, p. 123-520, 1979.

LIU, M. Y.; CAI, Y. X.; TZENG, C. S. Molecular systematics of the freshwater prawn genus *Macrobrachium* Bate, 1868 (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) inferred from mtDNA sequences, with emphasis on East Asian species. **Zoological Studies**, v. 46, p. 272-289, 2007.

LUCENA, D. T. Estudos sobre a doença de Chagas no Brasil. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 22, p.3-173, 1970.

MARTÍNEZ, F. H. et al. Taxonomic study of the *phyllosoma* complex and other triatomíneo (Insecta: Hemiptera: Reduviidae) species of epidemiological importance in the transmission of Chagas disease:Using ITS-2 and mtCytB sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.41, p.279–287, 2006.

MAVAREZ J.; SALAZAR C. A.; BERMINGHAM E.; CHRISTIAN S.; JIGGINS C. D. Speciation by hybridization in *Heliconius* butterflies. **Nature**, v. 441, p. 868–871, 2006.

MENCK C. F. M.; NETTO SOARES L. E. Estabilidade do material genético: mutagênese e reparo. In: MATIOLI S. R. (Org.). **Biologia molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Ed. HOLOS, 2001. p. 40-50.

MENDONÇA V. J. ALEVI K. C. C.; PINOTTI H.; GURGEL-GONÇALVES R.; PITA S.; GUERRA A. L.; PANZERA F.; ARAUJO R. F.; AZEREDO-OLIVEIRA M. T. V.; ROSA J. A. Revalidation of *Triatoma bahiensis* Sherlock and Serafim (1967) and

phylogeny of *T. lenti* Sherlock and Serafim (1967) and *T. bahiensis* (Hemiptera, Reduviidae), new members of the *Brasiliensis* subcomplex. **Parasites & Vectors**. In press, 2015.

MENDONÇA, V. J.; SILVA, M. T. A.; ARAÚJO, R. F.; JUNIOR, J. M.; JUNIOR, M. B.; ALMEIDA, C. E.; COSTA, J.; GRAMINHA, M. A. S.; CICARELLI, R. M. B.; ROSA, J. A. Phylogeny of *Triatoma sherlocki* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) inferred from two mitochondrial genes suggests its location within the *Triatoma brasiliensis* complex. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, p. 858-864, 2009.

MILLER, K. B. On the phylogeny of the Dytiscidae (Insecta: Coleoptera) with emphasis on the morphology of the female reproductive system. *Insect systematics & Evolution*, v. 32, p. 45-89, 2001.

MONTEIRO, F.A.; COSTA, J.; SOLE-CAVA, A. M. Genetic confirmation of the specific status of *Triatoma petrochii* (Hemiptera:Reduviidae:Triatominae). **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 92, p. 897–900, 1998.

MONTEIRO, F. A.; COSTA, J.; BEARD, C. B. High levels of mitochondrial DNA sequence divergence among *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 populations (Hemiptera:Reduviidae:Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 244, 1999.

MONTEIRO, F. A.; ESCALANTE, A. A., BEARD, C. B. Molecular tools and triatomine systematics: a public health perspective. **Trends in Parasitology**, v.17, p. 344–347, 2001.

MONTEIRO F. A.; SCHAMA R.; MARTINS A. J.; GLORIA-SORIA A.; BROWN J. E.; POWELL J. R. Genetic diversity of Brazilian *Aedes aegypti*: patterns following an eradication program. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2014.

MONTEIRO, F. A.; WESSON, D. M.; DOTSON, E. M.; SCHOFIELD, C. J.; BEARD, C. B. Phylogeny and molecular taxonomy of the Rhodniini derived from mitochondrial and nuclear DNA sequences. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 62, p. 460-465, 2000.

MONTEIRO, F. A.; BARRETT, T. V.; FITZPATRICK, S.; CORDÓN-ROSALES, C.; FELICIANGELI, D.; BEARD, C. B. Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 997-1006, 2003.

MONTEIRO, F.A.; DONNELLY, M.J.; BEARD, B.; COSTA, J. Nested clade and phylogeographic analyses of the Chagas disease vector *Triatoma brasiliensis* in northeast Brazil. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 32, p. 46-56, 2004.

MORITZ, C.; DOWLING, T. E.; BROWN, W. M. Evolution of animal mitochondrial DNA. Relevance for population biology and systematics. **Annual Review of Ecology Evolution and Systematics**, v. 18, p. 269-292, 1987.

NEIVA, A. 1911. Contribuição para o estudo dos hematofagos brasileiros e descrição de uma nova espécie de *Triatoma*. **Brazil-Médico**, v. 25, p. 461-462, 1911.

NOBREGA A. A.; GARCIA M. H.; TATTO E.; OBARA M.T.; COSTA E.; SOBEL J; ARAUJO W.N. Oral transmission of Chagas Disease by consumption of açai Palm Fruit, Brasil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, p. 653-655, 2009.

NOIREAU F.; ABAD-FRANCH A.; VALENTE A. S. S.; DIAS-LIMA; LOPES M. C.; CUNHA V.; VALENTE C. V.; PALOMEQUE S. F.; CARVALHO-PINTO C. J.; SHERLOCK I.; AGUILAR M.; STEINDEL M.; GRISARD E. C.; JURBERG J. Trapping Triatominae in Silvatic Habitats. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97(1), p. 61-63, 2002.

NOIREAU, F.; DIOSQUE, P.; JANSEN, A. M. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. **Veterinary Research**, v. 40, p. 26, 2009.

OLIVEIRA, A. W. S.; SILVA, I. G. Distribuição geográfica e indicadores entomológicos de triatomíneos sinantrópicos capturados no Estado de Goiás. **Revista da Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v.40, n.2, p.204-208, 2007.

PACHECO R. S.; ALMEIDA C. E.; KLISIEWICZ D. R.; COSTA J.; PIRES M. Q.; PANZERA F.; BAR M. E.; MAS-COMA S.; BARGUES M. D. Genetic variability of *Triatoma rubrovaria* (Reduviidae: Triatominae) from Brazil, Argentina and Uruguay as revealed by two different molecular markers. **Parasite**, v. 14, p. 231–237, 2007.

PACHECO R. S.; ALMEIDA C. E.; COSTA J.; KLISIEWICZ D. R.; MAS-COMA S.; BARGUES M. D. RAPD analyses and rDNA intergenic-spacer sequences discriminate Brazilian populations of *Triatoma rubrovaria* (Reduviidae: Triatominae). **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 97, p. 757-768, 2003.

PANIZZI, A. R.; GRAZIA, Jocélia. Introduction to True Bugs (Heteroptera) of the Neotropics. In: **True Bugs (Heteroptera) of the Neotropics**. Springer Netherlands, 2015. p. 3-20.

PANZERA, F.; PÉREZ, R.; HORNOS, S.; PANZERA, Y.; CESTAU, R.; DELGADO, V.; NICOLINI, P. Chromosome numbers in the Triatominae (Hemiptera-Reduviidae): a Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, p. 515-518, 1996.

PANZERA, F.; PÉREZ, R.; NICOLINI, P.; HORNOS, P.; COSTA, J.; BORGES, E.; DIOTAIUTI, L.; SCHOLFIELD, J. Chromosome homogeneity in populations of *Triatoma brasiliensis* Neiva 1911 (Hemiptera–Reduviidae–Triatominae). **Cadernos de Saúde Pública**, v. 16, p. 83-88, 2000.

PATTERSON J. S.; GAUNT M. W. Phylogenetic multi-locus codon models and molecular clocks reveal the monophyly of haematophagous reduviid bugs and their evolution at the formation of South America. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 56, n. 2, p. 608-621, 2010.

PENARANDA-CARRILLO, R. et al. Avaliação do impacto das ações de controle vetorial da doença de Chagas através do inquérito sorológico em Mambá/Buritópolis, Goiás. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35, n.4, p.331-338, 2002.

PINTO, C.; BARRETO, J.B. Uma nova espécie de “barbeiro” do Brasil, (*Triatoma petrochii* n.sp.). **Scientia Medica**, v.3, p.769, 1925.

POINAR, J. R. G. *Panstrongylus hispaniolae* sp. n. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), a new fossil triatomine in Dominican amber, with evidence of gut flagellates. **Palaeodiversity**, v. 6, p. 1-8, 2013.

PORTER, C. H.; COLLINS, F. H. Phylogeny of Nearctic members of the *Anopheles maculipennis* species group derived from the D2 variable region of 28S ribosomal RNA. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v 6, p. 178 -188, 1996.

QING-YI, Z.; QI-QUN, C.; WEI-BING, G. Mitochondrial COI Gene Sequence variation and taxonomic status of three *Macrobrachium* species. **Zoological Research**, v. 30, p. 613-619. 2009.

RAWLINGS S.; BABOOLAL S.; PARSAD K.; CHARLES W.; TIWARI T.; HARDY L.; TJON A.; LOI M.; OOSTBURG B. F. J. The prevalence of antibodies to *Trypanosoma cruzi* in Guyana, Suriname and Trinidad and Tobago. **Suriname Medical Bulletin**, v. 16, p. 25-40, 2001.

ROSA, J. A. et al. Sexual distinction between 5th instar nymphs of six species of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.87, p.257-264, 1992.

ROSA, J. A.; BARATA, J. M. S.; CILENCE, M., BELDA NETO, F. M. Head morphology of 1st and 5th instar nymphs of *Triatoma circummaculata* and *Triatoma rubrovaria* (Hemiptera, Reduviidae). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, v.28, p.363-375, 1999.

ROSA, J. A.; MENDONÇA, V. J.; GARDIM, S. ; DE CARVALHO, D. B.; OLIVEIRA, J.; NASCIMENTO, J. D.; PINOTTI, H.; PINTO, M. C.; CILENSE, M.; GALVÃO, C.; BARATA, J. M. Study of the external female genitalia of 14 *Rhodnius* species (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) using scanning electron microscopy. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 17, 2014.

SEVERI-AGUIAR, G. D. C.; LOURENÇO, L. B.; BICUDO, H. E. M. C.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Meiosis aspects and nucleolar activity in *Triatoma vitticeps* (Triatominae, Heteroptera). **Genetica**, v. 126, p. 141-151, 2006.

SHERLOCK; SERAFIM. *Triatoma lenti* sp.n., *Triatoma pessoai* sp.n. e *Triatoma bahiensis* sp.n. do Estado da Bahia, Brasil (Hemiptera, Reduviidae). **Gazeta Médica da Bahia**, v. 67, p. 75–92, 1967.

SCHOFIELD, C. J.; GALVÃO, C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. **Acta Tropica**, v. 110, p. 88-100, 2009.

SCHREIBER, G.; PELLEGRINO, J. Eteropicnosi di autosomi come possible meccanismo di speciazione. **Science Genetics**, v. 3, p. 215-226, 1950.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TARTAROTTI, E.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V., CERON, C. R. Problemática vetorial da Doença de Chagas. **Arquivos de Ciências da Saúde**, v.11, n.1, p.44-7, 2004.

TARTAROTTI E.; CERON C. R. Ribossomal DNA ITS-1 Intergenic Spacer/Polymorfism in triatomines (Triatominae, Heteroptera). **Biochemical Genetics**, v. 43, p. 365-373, 2005.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEAMNOUGIN, F.; HIGGIS, D. G. The CLUSTAL_X Windows Interface: Flexible Strategies for Multiple Sequence Alignment Aided by Quality Analysis Tools. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 4876-4882, 1997.

VERGAMINI, F. G.; PILEGGI, L. G.; MANTELATTO, F. L. Genetic variability of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Caridea, Palaemonidae). **Contributions to Zoology**, v. 80, p. 67-83. 2011.

VINHAES, M. C.; DIAS, J. C. P. **Doença de Chagas no Brasil. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro**, v.16 (Sup. 2), p.7-12, 2000.

WALTON C.; HANDLEY J. M.; TUN-LIN W.; COLLINS F. H.; HARBACH R. E.; BAIMAI V.; BUTLIN R. K. Population structure and population history of *Anopheles dirus* mosquitoes in Southeast Asia. **Molecular Biology and Evolution**, v. 17, p. 962-974, 2000.

WEIRAUCH. C.; MUNRO, J.B. Molecular phylogeny of the assassin bugs (Hemiptera: Reduviidae), based on mitochondrial and nuclear ribosomal genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 53, p.287–99, 2009.

WEIRAUCH. C.; SCHUH, R. T. Systematics and Evolution of Heteroptera: 25 Years of Progress. **Annual Review of Entomology**, v. 56, p. 487–510, 2011.

TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 30/ 03/ 2016

Ana Betécia Guerra

Assinatura do autor