



UNESP
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara



“Análise da relação filogenética entre *Triatoma carcavallo* Jurberg, Rocha; Lent, 1998; *Triatoma circummaculata* Stal, 1859; *Triatoma klugi* Carcavallo, Jurberg, Lent; Galvão, 2001 e *Triatoma rubrovaria* Blanchard, 1843 (Hemiptera, Reduviidae) baseada no sequenciamento de genes do DNA mitocondrial e nuclear.”

CLÁUDIA SOLANO ROCHA

Orientador: Prof. Dr. João Aristeu da Rosa

Araraquara – SP

2012



UNESP
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara



“Análise da relação filogenética entre *Triatoma carcavallo* Jurberg, Rocha; Lent, 1998; *Triatoma circummaculata* Stal, 1859; *Triatoma klugi* Carcavallo, Jurberg, Lent; Galvão, 2001 e *Triatoma rubrovaria* Blanchard, 1843 (Hemiptera, Reduviidae) baseada no sequenciamento de genes do DNA mitocondrial e nuclear.”

CLÁUDIA SOLANO ROCHA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.
Orientador: Prof. Dr. João Aristeu da Rosa

Araraquara – SP

2012

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

R672a Rocha, Cláudia Solano
Análise da relação filogenética entre *Triatoma carcavallo* Jurberg, Rocha; Lent, 1998; *Triatoma circummaculata* Stal, 1859; *Triatoma klugi* Carcavallo, Jurberg, Lent; Galvão, 2001 e *Triatoma rubrovaria* Blanchard, 1843 (Hemiptera, Reduviidae) baseada no sequenciamento de genes do DNA mitocondrial e nuclear / Cláudia Solano Rocha. – Araraquara, 2012
107 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia
Orientador: João Aristeu da Rosa

1. T. Rubrovaria. 2 DNA mitocondrial. 3. DNA nuclear. 4. Filogenia. 5. Espécies crípticas. I. Rosa, João Aristeu, orient. II. Título.

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Parasitologia e Biologia Molecular de Parasitos e Vetores do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus de Araraquara-SP com apoio da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), por meio da concessão de uma bolsa de Doutorado (Processo 2009/52236-2).

Dedicatória

*Aos meus pais, Claudinei e Solange, pela paciência,
carinho, confiança e compreensão
da minha ausência*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por toda força e perseverança dados a mim neste caminho.

Ao Prof. Dr. João Aristeu da Rosa, meu orientador, por todo apoio, incentivo e confiança em mim depositados desde os tempos da Iniciação Científica, fundamentais para meu crescimento científico, profissional e pessoal! Obrigada!

À Profa. Dr. Regina Maria Barretto Cicarelli, pela parceria e por gentilmente ter me recebido em seu Laboratório!

Ao Prof. Dr. Otavio Henrique Thiemann, do Departamento de Física e Informática do Instituto de Física de São Carlos (IFSC-USP), por gentilmente disponibilizar equipamentos e funcionários para que se realizasse as reações de sequenciamento.

À Profa. Dra. Mara Cristina Pinto, da Disciplina de Parasitologia do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara pelo apoio, incentivo e amizade!

À Profa. Dra. Márcia Graminha, da Disciplina de Parasitologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, por todo carinho e amizade, que se tornaram mais presentes nesta jornada!

Ao Dr. Carlos Eduardo de Almeida, pós-doutorando do Laboratório de Parasitologia do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, por todo auxílio, confiança e apoio a mim dispensados.

Aos colegas do Laboratório de Parasitologia, pela amizade, apoio, incentivo e convivência, que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho!

À Dra. Joyce Aparecida Martins pela amizade e conversas durante a graduação e doutoramento!

À Dra. Daniela Luz Ambrósio pelo auxílio, sugestões, confiança e amizade que foram importantes para que este trabalho fosse desenvolvido!

Ao Dr. Marco Túlio Alves da Silva, pela amizade e por prontamente ter me auxiliado nas etapas experimentais deste trabalho!

À Maria Zenaide Tita Fernandes pelo carinho, dedicação e amizade dados a **mim e ao Laboratório de Parasitologia e por ter me "adotado" desde minha** Graduação!

À Isabel Martinez da Disciplina de Parasitologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara,

pela colaboração, amizade e boas risadas, sempre!

Ao amigo Júlio César Miné, pela amizade, carinho e compreensão! Mesmo estando distante fisicamente, sempre esteve (e está) muito presente! Obrigada Amigo!

Aos amigos Marco Aurélio, Hebert e Pedro, pela amizade, carinho e ótimas risadas!

Obrigada pela companhia durante este processo!

Às mais novas amigas, Giamary Giampaolo e Flávia Mello! Obrigada pela amizade e carinho!

Ao Murilo Garbuglio, pela amizade, carinho, companhia e energia dados a mim durante o desenvolvimento desta Tese! Obrigada por compreender as minhas ausências!!

Ao Danilo Cambiaghi, pelo carinho, companhia e apoio dados a mim durante o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pela intensidade que se dedicou a mim!

À Danila Blanco de Carvalho, amiga de graduação e agora Doutoranda do Laboratório, obrigada pelo companheirismo de sempre!

À Sueli Gardim e Paulo Vitor Esposto Curti, meus afilhados! Pela carinho e compreensão!

À Cleonara Bedin, Fernanda de Mello, Guiomar Voit, João Medeiros Soares, Juvenal Augusto Vieira, Mario Brito de Oliveira e Tania Marli Stasiak Wilhelms – membros do Núcleo de Vigilância dos Riscos e Agravos Ambientais Biológicos/DVAS CEVS/SES/RS, que colaboraram na coleta dos Triatomíneos utilizados neste estudo; Ao Cleber Galvão e Dayse da Silva Rocha, que gentilmente enviaram exemplares de *T. carcavalloi*, *T. guasayana* e *T. klugi*.

Às funcionárias Cláudia Lúcia Molina, Daniela Altieri Tita Lockermann Oliveira, Joyce Conceição G. Romero, Laura Rosim, Marcia Regina Buda Adloff e Sônia Ornelas da Seção de Pós-Graduação pela amizade, gentileza e pronto atendimento;

À Margarete Rossi Ferreira, Secretária do Departamento de Ciências Biológicas, pela amizade, carinho, conselhos e ótimas risadas!!

À Profa. Dra. Tais Maria Bauab pela amizade e conselhos dados!

Às amigas dos tempos da Graduação, Ana Paula Iwai e Juliana Miqueleto, pela amizade e acolhimento nos momentos mais difíceis;

A todos, muito obrigada!

“Não há transição que não implique um ponto de partida, um processo e um ponto de chegada. Todo amanhã se cria num ontem, através de um hoje. De modo que o nosso futuro baseia-se no passado e se corporifica no presente. Temos de saber o que fomos e o que somos, para sabermos o que seremos.”

Paulo Freire

RESUMO

ROCHA, C.S. **Análise da relação filogenética entre *Triatoma carcavallo* Jurberg, Rocha; Lent, 1998; *Triatoma circummaculata* Stal, 1859; *Triatoma klugi* Carcavallo, Jurberg, Lent; Galvão, 2001 e *Triatoma rubrovaria* Blanchard, 1843 (Hemiptera, Reduviidae) baseada no sequenciamento de genes do DNA mitocondrial e nuclear.** Tese (Doutorado) - Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara, SP, 2012.

A subfamília Triatominae compreende 146 espécies, agrupadas em 18 gêneros e cinco tribos. O gênero *Triatoma* é o mais representativo da subfamília com 80 espécies descritas, as quais estão agrupadas em oito complexos e oito subcomplexos, sendo essa classificação baseada principalmente em características morfológicas. *Triatoma rubrovaria* é considerado um importante vetor na transmissão da doença de Chagas no Estado do Rio Grande do Sul, uma vez que houve um aumento de sua captura e encontros de colônias intradomiciliares após o programa de combate ao *T. infestans*. Possui hábitos rupestres e é encontrado em buracos e fendas de locais pedregosos, juntamente com *T. carcavallo*, *T. circummaculata* e *T. klugi*, os quais mostram semelhanças morfológicas. Marcadores moleculares pertencentes ao DNA nuclear, como os espaçadores internos transcritos (ITS) apresentam uma evolução mais rápida, permitindo estabelecer relações recentes ao passo que a grande subunidade ribossomal 28S (D2), por ser bem conservado, permite estabelecer relação entre organismos distantemente relacionados. Marcadores mitocondriais (Citocromo B – CytB e Citocromo Oxidase I – COI) apresentam taxa de mudança dez vezes mais rápida que aquelas apresentadas pelo DNA nuclear, sendo, portanto, úteis para estabelecer relações filogenéticas entre organismos que divergiram recentemente. A análise Bayesiana por meio de sequências pertencentes ao mtDNA (CytB e COI) reafirmam o posicionamento de espécies no subcomplexo rubrovaria e indica *T. carcavallo* como espécie irmã do grupo formado por *T. klugi* + *T. rubrovaria* + *T. circummaculata*. A análise bayesiana de seis populações de *T. rubrovaria* mostrou a população coletada em Canguçu isolada das demais, sugerindo que se trata de espécie críptica.

Palavras-chave: *T. rubrovaria*, DNA mitocondrial, DNA nuclear, Filogenia, espécies crípticas

ABSTRACT

ROCHA, C.S. **Phylogenetic relationship among *Triatoma carcavallo* Jurberg, Rocha; Lent, 1998; *Triatoma circummaculata* Stal, 1859; *Triatoma klugi* Carcavallo, Jurberg, Lent; Galvão, 2001 and *Triatoma rubrovaria* Blanchard, 1843 (Hemiptera, Reduviidae) based on sequencing of mitochondrial and nuclear DNA sequences.** Tese (Doutorado) - Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara, SP, 2012.

The subfamily Triatominae comprises 146 species grouped in 18 genera and five tribes. The genus *Triatoma* is the most representative subfamily with 80 described species, which are grouped into eight complex and eight subcomplexes and this classification being based primarily on morphological characteristics. *Triatoma rubrovaria* is considered an important vector in the transmission of Chagas disease in the state of Rio Grande do Sul since it was detected an increase of their capture and meetings colonies household after the program to combat of *T. infestans*. *T. rubrovaria* is found in groves and crevices of rocky areas within *T. carcavallo*, *T. circummaculata* and *T. klugi*, which show morphological similarities. Molecular markers belonging to the nuclear DNA, as the internal transcribed spacers (ITS) have more rapid evolution, establishing recent relationships while the large ribosomal subunit 28S (D2), being well maintained, allows establishing the relationship between distantly related organisms. Mitochondrial markers (Cytochrome B – CytB and Cytochrome Oxidase I - COI) present a rate of change ten times faster than those presented by nuclear DNA, and are therefore useful for establishing phylogenetic relationships between organisms that diverged recently. A Bayesian analysis using mtDNA sequences belonging to (CytB and COI) reaffirmed the positioning of the species and indicates subcomplex rubrovaria and indicates *T. carcavallo* as sister species from the group of *T. klugi* + *T. rubrovaria* + *T. circummaculata*. A Bayesian analysis of six populations of *T. rubrovaria* showed the population collected in Canguçu isolated from the others, suggesting that they are cryptic species.

Key words: *T. rubrovaria*, mitochondrial DNA, nuclear DNA, phylogeny, cryptic species.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

12S – Gene 12S pertencente ao DNA mitocondrial

18S – Gene 18S pertencente ao DNA ribossomal

28S – Gene 28S pertencente ao DNA ribossomal

5,8S – Gene 5,8S pertencente ao DNA ribossomal

AEP – *T. rubrovaria* oriundo de Alegrete – RS, localidade Estrada dos Pinheiros

ARDRA – *Amplified Ribossomal DNA Restriction Analyses*

ASA – *T. rubrovaria* oriundo de Alegrete – RS, localidade Salso

BT – *bootstrap*

CAN – *T. rubrovaria* oriundo de Canguçu – RS

COI – Citocromo Oxidase I

CREBIO - Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica

CTA – Colônia de Triatomíneo de Araraquara

CytB – Citocromo B

D2 – sinônimo de 28S

DGGE – *Denaturing Gradient Gel Eletrophoresis*

DNA – Ácido Desoxiribonucleico

DNAg – DNA genômico

dNTP - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

ETS – Espaçador externo transcrito

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

ITS-1 – Espaçador Interno Transcrito 1

ITS-2 – Espaçador Interno Transcrito 2

Kb – quilobase

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

mtDNA – DNA mitocondrial

ng – nanograma

°C – graus Celsius

pb – Pares de bases

PB – Probabilidades Bayesianas

PM – Peso molecular

QCJ – *T. rubrovaria* oriundo de Quarai – RS, localidade Cerro do Jarau

QMA – *T. rubrovaria* oriundo de Quarai – RS, localidade Macarrão

QRO – *T. rubrovaria* oriundo de Quarai – RS, localidade Rosada

RAPD – *Random Amplified Polymorphism DNA*

rDNA – DNA ribossomal

RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RS – Rio Grande do Sul

UV – Ultra-violeta

WHO – World Health Organization

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 01: Exemplos dos triatomíneos estudados. <i>T. rubrovaria</i> (A), <i>T. circummaculata</i> (B), <i>T. carvalhoi</i> (C), <i>T. klugi</i> (D), <i>T. guasayana</i> (E) e <i>T. platensis</i> (F).....	26
Figura 02: Esquema para desenho dos <i>primers</i> para amplificação da região ITS. Adaptado de Coleman (2003)	34
Figura 03: Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, da extração do DNAg das espécies avaliadas: <i>T. rubrovaria</i> procedente de Quaraí – Cerro do Jarau (1 a 3), <i>T. rubrovaria</i> procedente de Quaraí – Rosada (4 a 6), <i>T. rubrovaria</i> procedente de Quaraí – Macarrão (7 a 9), <i>T. circummaculata</i> (10 a 12), <i>T. klugi</i> (13 a 15), <i>T. platensis</i> (16 a 18) <i>T. carvalhoi</i> (19 a 21), <i>T. rubrovaria</i> procedente de Alegrete – Estrada dos Pinheiros (22 a 24), <i>T. rubrovaria</i> procedente de Alegrete – Salso (25 a 27), <i>T. guasayana</i> (28 a 30) e <i>T. rubrovaria</i> procedente de Canguçu (31 a 33).....	40
Figura 04: Produto de PCR de isolamento do fragmento do gene CytB para as espécies: <i>T. rubrovaria</i> procedente de Quaraí – Cerro do Jarau (1 a 3), <i>T. rubrovaria</i> procedente de Quaraí – Rosada (4 a 6), <i>T. rubrovaria</i> procedente de Quaraí – Macarrão (7 a 9), <i>T. circummaculata</i> (10 a 12), <i>T. klugi</i> (13 a 15), <i>T. platensis</i> (16 a 18) <i>T. carvalhoi</i> (19 a 21), <i>T. rubrovaria</i> procedente de Alegrete – Estrada dos Pinheiros (22 a 24), <i>T. rubrovaria</i> procedente de Alegrete – Salso (25 a 27), <i>T. guasayana</i> (28 a 30) e <i>T. rubrovaria</i> procedente de Canguçu (31 a 33). O peso molecular (PM) utilizado foi O´GeneRuler 1Kb DNA Ladder Plus (Fermentas)	42
Figura 05: Produto de PCR de isolamento do fragmento do gene COI para as espécies: <i>T. rubrovaria</i> procedente de Quaraí – Cerro do Jarau (1 a 3), <i>T. rubrovaria</i> procedente de Quaraí – Rosada (4 a 6), <i>T. rubrovaria</i> procedente de Quaraí – Macarrão (7 a 9), <i>T. circummaculata</i> (10 a 12), <i>T. klugi</i> (13 a 15), <i>T. platensis</i> (16 a 18) <i>T. carvalhoi</i> (19 a 21), <i>T. rubrovaria</i> procedente de Alegrete – Estrada dos Pinheiros (22 a 24), <i>T. rubrovaria</i>	

procedente de Alegrete – Salso (25 a 27), *T. guasayana* (28 a 30). *T. guasayana* (28 a 30) e *T. rubrovaria* procedente de Canguçu (31 a 33). O peso molecular (PM) utilizado foi O´GeneRuler 1Kb DNA Ladder Plus (Fermentas) 43

Figura 06: Produto de PCR de isolamento do fragmento do gene 28S para as espécies: *T. rubrovaria* procedente de Quaraí – Cerro do Jarau (1 a 3), *T. rubrovaria* procedente de Quaraí – Rosada (4 a 6), *T. rubrovaria* procedente de Quaraí – Macarrão (7 a 9), *T. circummaculata* (10 a 12), *T. klugi* (13 a 15), *T. platensis* (16 a 18) *T. carcavalloi* (19 a 21), *T. rubrovaria* procedente de Alegrete – Estrada dos Pinheiros (22 a 24), *T. rubrovaria* procedente de Alegrete – Salso (25 a 27), *T. guasayana* (28 a 30) e *T. rubrovaria* procedente de Canguçu (31 a 33). O peso molecular (PM) utilizado foi O´GeneRuler 1Kb DNA Ladder Plus (Fermentas) 44

Figura 07: Produto de PCR de isolamento do fragmento do ITS-1 para as espécies: *T. rubrovaria* procedente de Quaraí – Cerro do Jarau (1 a 3), *T. rubrovaria* procedente de Quaraí – Rosada (4 a 6), *T. rubrovaria* procedente de Quaraí – Macarrão (7 a 9), *T. circummaculata* (10 a 12), *T. klugi* (13 a 15), *T. platensis* (16 a 18) *T. carcavalloi* (19 a 21), *T. rubrovaria* procedente de Alegrete – Estrada dos Pinheiros (22 a 24), *T. rubrovaria* procedente de Alegrete – Salso (25 a 27), *T. guasayana* (28 a 30) e *T. rubrovaria* procedente de Canguçu (31 a 33). O peso molecular (PM) utilizado foi O´GeneRuler 1Kb DNA Ladder Plus (Fermentas) 45

Figura 08: Produto de PCR de isolamento do fragmento do ITS-2 para as espécies: *T. rubrovaria* procedente de Quaraí – Cerro do Jarau (1 a 3), *T. rubrovaria* procedente de Quaraí – Rosada (4 a 6), *T. rubrovaria* procedente de Quaraí – Macarrão (7 a 9), *T. circummaculata* (10 a 12), *T. klugi* (13 a 15), *T. platensis* (16 a 18) *T. carcavalloi* (19 a 21), *T. rubrovaria* procedente de Alegrete – Estrada dos Pinheiros (22 a 24), *T. rubrovaria* procedente de Alegrete – Salso (25 a 27), *T. guasayana* (28 a 30) e *T. rubrovaria* procedente de Canguçu (31 a 33). O peso molecular (PM) utilizado foi O´GeneRuler 1Kb DNA Ladder Plus (Fermentas) 46

Figura 09: Alinhamento realizado no programa Clustal W das sequências obtidas pela amplificação do fragmento COI (554 pb) e de sequências disponíveis no GenBank. As procedências podem ser verificadas na Tabela 2	48
Figura 10: Alinhamento realizado no programa Clustal W das sequências obtidas pela amplificação do fragmento CytB (444 pb) e de sequências disponíveis no GenBank. As procedências podem ser verificadas na Tabela 2	51
Figura 11: Alinhamento realizado no programa Clustal W das sequências obtidas pela amplificação do fragmento 28S (626 pb) e de sequências disponíveis no GenBank. As procedências podem ser verificadas na Tabela 2	53
Figura 12: Alinhamento realizado no programa Clustal W das sequências obtidas pela amplificação do fragmento ITS-1 (568 pb) e de sequências disponíveis no GenBank. As procedências podem ser verificadas na Tabela 2	55
Figura 13: Alinhamento realizado no programa Clustal W das sequências obtidas pela amplificação do fragmento ITS-2 (340 pb) e de sequências disponíveis no GenBank. As procedências podem ser verificadas na Tabela 2	57
Figura 14: Análise bayesiana da análise combinada dos fragmentos de gene CytB e COI de Triatomíneos, com enfoque em taxons do Estado do Rio Grande do Sul – Brasil. Os valores apresentados nos cladogramas representam PB /BT, respectivamente.....	59
Figura 15: Análise bayesiana dos fragmentos de gene ITS-1, com enfoque em taxons do Estado do Rio Grande do Sul - Brasil. Os valores apresentados indicam PB/BT, respectivamente. As procedências podem ser consultadas na Tabela 2	61

Figura 16: Análise bayesiana do fragmentos de gene ITS-2, com enfoque em táxons do Estado do Rio Grande do Sul - Brasil. Os valores apresentados indicam PB/BT, respectivamente. As procedências podem ser consultadas na Tabela 2 **62**

Figura 17: Análise bayesiana do fragmentos de gene 28S, com enfoque em táxons do Estado do Rio Grande do Sul - Brasil. Os valores apresentados indicam PB/BT, respectivamente. As procedências podem ser consultadas na Tabela 2 **63**

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Espécies e procedência dos Triatomíneos cujo DNA foi extraído e sequenciado os fragmentos dos genes mitocondriais (CytB e COI) e nucleares (ITS-1, ITS-2 e 28S)	32
Tabela 2: Sequencias de DNA utilizadas para estabelecer as relações filogenéticas entre as espécies e populações. “NE”= obtidas neste estudo; “?” =sequências não disponíveis no GenBank®	38

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	Doença de Chagas	20
1.2	Insetos vetores da doença de Chagas – Triatomíneos	22
1.3	Sistemática e métodos moleculares	27
2	OBJETIVOS	29
2.1	Objetivos Gerais	29
2.2	Objetivos Específicos	29
3	MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1	Insetos	30
3.2	Extração e estimativa da concentração do DNA genômico	33
3.3	Iniciadores (<i>Primers</i>)	33
3.4	Amplificação de DNA por PCR (Polymerase Chain Reaction) ..	34
3.5	Purificação dos fragmentos amplificados	36
3.6	Sequenciamento	36
3.7	Forma de Análise dos Resultados	37
4	RESULTADOS	40
4.1	– Extração do DNA genômico	40
4.2	- Isolamento (PCR) e purificação dos fragmentos de interesse	41
4.3	– Sequenciamento	47
4.4	– Análise Filogenética	58
5	DISCUSSÃO	65
6	CONCLUSÃO	69
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

CAPÍTULO II

Artigo - Cryptic species within the <i>Triatoma rubrovaria</i> complex revealed by mitochondrial DNA analysis	85
--	----

CAPÍTULO I

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Doença de Chagas

Carlos Chagas ao descrever o protozoário *Trypanosoma cruzi* e a Tripanossomíase Americana, posteriormente denominada doença de Chagas, desvendou toda a cadeia epidemiológica dessa zoonose, isto é, o mecanismo de transmissão, vetor, agente etiológico, a doença em humanos, bem como os reservatórios silvestres (CHAGAS, 1909). Estima-se que 10 milhões de pessoas, principalmente na América Latina, estejam infectadas com o protozoário *T. cruzi*, transmitido, principalmente, pelas fezes dos triatomíneos (WHO, 2010).

À época da descrição da doença, Chagas já se referia à importância da melhoria das condições de moradia para o controle dos triatomíneos no ambiente doméstico, uma vez que os mesmos vivem em frestas e rachaduras das paredes das casas. Antes da II Guerra Mundial haviam poucas técnicas para o combate do vetor em ambiente doméstico. No início, o combate aos triatomíneos era realizado com querosene e na década de 40, com o advento dos inseticidas sintéticos, o controle ao vetor tornou-se melhor sucedido. As paredes das casas eram borrifadas com organoclorados e houve uma diminuição significativa das populações domiciliares. Nos anos 80 os organoclorados foram substituídos por piretróides devido à sua maior eficiência (DIAS et al., 2000; 2002).

Admite-se que o controle de vetores seja o método mais eficaz para prevenir e combater a propagação da doença, uma vez que não existem vacinas e tratamentos farmacológicos eficazes para curar doentes em fase crônica (DIAS et al., 2002; MILES, 2004; COURA;VINAS, 2010).

A diminuição significativa da taxa de infestação domiciliar por triatomíneos foi acompanhada por uma rápida redução dos casos agudos da doença, fato esse

documentado por estudos realizados nos Estados de Minas Gerais (DIAS, 1982) e de São Paulo (SOUZA et al., 1984). Quadros similares de decréscimo também foram verificados em outros países do Cone Sul, em extensas áreas da Argentina e do Paraguai e no sul da Bolívia (VINHAES, 2000).

Paralelamente ao controle do vetor, observou-se redução da transmissão por outras vias, entre as quais por meio de doadores de sangue e congenitamente (DIAS, 2000).

Contudo, estudos sobre o agente etiológico, assim como sobre os vetores continuam necessários, uma vez que a erradicação de *T. cruzi*, assim como dos seus vetores é praticamente impossível com os conhecimentos atuais. Corrobora essa afirmação o que se tem observado no Estado de São Paulo, onde a transmissão vetorial da doença de Chagas está controlada desde 1965, no entanto, ainda persiste a possibilidade de transmissão natural, pois os vetores podem ser encontrados, mesmo em matas residuais, conforme observações trimestrais feitas no município de Araraquara no período de 1979 a 2007, por Barata et al. (Comunicação Pessoal).

1.2 - Insetos vetores da doença de Chagas – Triatomíneos

Lent e Wygodzinsky (1979) descreveram todas as espécies válidas de Triatominae, perfazendo um total de 110 espécies, estudadas de maneira detalhada, incluindo observações sobre os ciclos de vida e habitats na natureza, além da distribuição por diferentes regiões e países, assim como as informações quanto à infestação pelo parasita *T. cruzi* na natureza e em laboratório (LENT, 1999). As principais espécies vetoradas da doença estão distribuídas desde o sul dos Estados Unidos à Argentina, entre as latitudes 41°N e 46°S (DIAS, 2000).

Desde então, novos gêneros e espécies foram descritos. A subfamília Triatominae compreende 146 espécies, agrupadas em 18 gêneros e cinco tribos (ROSA et al., 2012; OBARA et al., 2012, GALVÃO et al., 2003; FORERO et al., 2004; POINAR, 2005; COSTA et al., 2006; GALVÃO;ANGULO, 2006; COSTA;FELIX, 2007; SANDOVAL et al., 2007; BÉRENGER;BLANCHET, 2007; MARTINEZ et al., 2007, JURBERG et al., 2009). O gênero *Triatoma* é o mais representativo da subfamília com 80 espécies descritas, as quais estão agrupadas em oito complexos e oito subcomplexos, sendo essa classificação baseada principalmente em características morfológicas (SCHOFIELD;GALVÃO, 2009).

Todos os triatomíneos são suscetíveis à infecção por *T. cruzi*, em qualquer de seus estádios evolutivos, a partir da sucção de sangue de um hospedeiro vertebrado infectado (BARRETTO, 1979).

- *Triatoma rubrovaria*

Espécie descrita, em 1843, por Blanchard e que pode ser encontrada no Estado do Rio Grande do Sul (RS) - Brasil, Misiones, Corrientes e Entre Rios (Argentina) e em todas as regiões do Uruguai (ROSA et al., 2000). *T. rubrovaria* era

considerada silvestre e de importância secundária, mas provavelmente devido às alterações ambientais, essa espécie está se domiciliando (SILVEIRA, 1983) e em muitos municípios do Rio Grande do Sul podem ser capturados elevados números de exemplares (ROSA et al., 2000; RUAS-NETO et al., 2002). Segundo Silveira e Rezende (1994), *T. rubrovaria*, encontrado naturalmente infectado por *T. cruzi*, agrupa-se entre as espécies que vêm ocupando nichos deixados vagos pela eliminação do *T. infestans* no RS.

T. rubrovaria possui hábitos rupestres e é encontrado em buracos e fendas de locais pedregosos, onde predominam rochas sobrepostas com características graníticas ou areníticas, alimentando-se do sangue de vários vertebrados principalmente roedores, mantendo assim o ciclo silvestre da tripanossomíase americana (ROSA et al., 2000; ALMEIDA et al., 2002; MARTINS et al., 2006).

Mesmo após o programa de combate ao *T. infestans*, integrante da Iniciativa dos países do Cone Sul (INCOSUL/Chagas), implementada a partir de 1992, verificou-se aumento na captura de *T. rubrovaria* e capacidade de constituir colônias intradomiciliares no Estado do Rio Grande do Sul – Brasil (ALMEIDA et al., 2000; SILVEIRA; DIAS, 2011).

- *Triatoma klugi*

T. klugi, espécie descrita em 2001 por Carcavallo et al., foi encontrada em frestas de rochas no município de Nova Petrópolis, Estado do Rio Grande do Sul, habitat natural semelhante ao de *T. rubrovaria*.

Insetos de cor geral preta, tendo manchas amarelas centrais em cada segmento do conexivo, parte externa do clavo e a base do cório, são escuras as partes distais do cório e acinzentadas as membranas. As fêmeas apresentam

caracteres e proporções semelhantes aos machos (CARCAVALLO et al., 2001). *T. klugi* ocorre em simpatria no mesmo ecótopo de *T. rubrovaria* no Estado do Rio Grande do Sul – Brasil (ALMEIDA et al., 2002; ALMEIDA et al., 2009; SCHOFIELD; GALVÃO, 2009).

- *Triatoma circummaculata*

T. circummaculata (STAL, 1859) encontra-se distribuído por algumas regiões da Argentina, no Estado do Rio Grande do Sul (Brasil) e Uruguai, podendo ser encontrado infectado com *T. cruzi*. Costumam habitar frestas de pedras e sob rochas, sendo frequentemente encontrado com *T. rubrovaria* (LENT; WYGODZINSKY, 1979).

A variação cromática do lobo posterior do pronoto – completamente preto a completamente vermelho em *T. circummaculata* é semelhante àquela que ocorre em *T. rubrovaria*, juntamente com a qual ocorre (LENT; WYGODZINSKY, 1979). Bem como ocorre com *T. klugi*, *T. circummaculata* pode ser encontrado no mesmo ecótopo que *T. rubrovaria* (ALMEIDA et al., 2002; ALMEIDA et al., 2009; SCHOFIELD; GALVÃO, 2009).

- *Triatoma carcavallo*

Espécie descrita por Jurberg et al. em 1998, foi coletada em domicílios de Santana do Livramento, Canguçu, Jaguarão e Dom Feliciano, municípios distantes entre si, que ocupam uma grande área do Rio Grande do Sul.

É encontrado em ecótopo e em simpatria com *T. rubrovaria* (ALMEIDA et al., 2009) e apresenta coloração similar a de *T. rubrovaria* e *T. circummaculata*, sendo classificada como espécie afim de *T. rubrovaria*.

Imagens que evidenciam algumas semelhanças e diferenças morfológicas entre as quatro espécies supracitadas podem ser observadas na Figura 1.

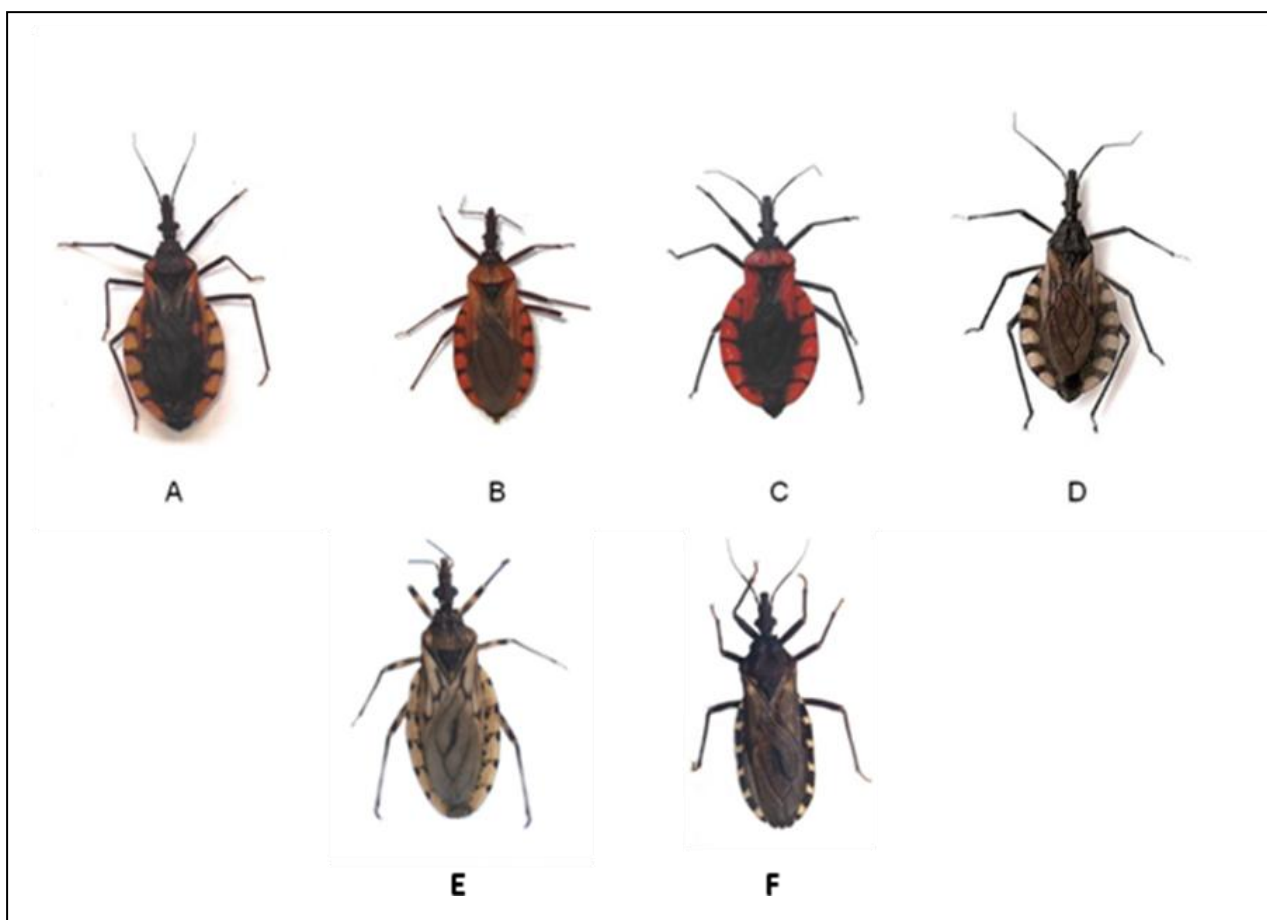
- *Triatoma guasayana*

Espécie descrita por Wygodzinsky e Abalos (1949) é encontrada na Argentina (Buenos Aires, Catamarca, Chaco, Córdoba, Jujuy, La Pampa, La Rioja, Mendoza, Salta, San Juan, San Luis, Santiago Del Estero, Santa Fe, Tucumán), bem como na Bolívia e Paraguai (LENT; WYGODZINSKY, 1979). A espécie foi utilizada no presente estudo para dar suporte às análises filogenéticas realizadas.

- *Triatoma platensis*

Espécie descrita por Neiva (1913) apresenta-se distribuído na Argentina (Buenos Aires, Catamarca, Chaco, Córdoba, Corrientes, Entre Rios, Formosa Jujuy, La Pampa, La Rioja, Mendoza, Rio Negro, San Juan, San Luis, Santa Fé, Santiago Del Estero, Salta, Tucumán), nas regiões sul da Bolívia e do Paraguai (LENT; WYGODZINSKY, 1979). A espécie foi utilizada no presente estudo como grupo externo para as análises filogenéticas.

Figura 01: Exemplares dos triatomíneos estudados. *T. rubrovaria* (A), *T. circummaculata* (B), *T. carcavalloi* (C), *T. klugi* (D), *T. guasayana* (E) e *T. platensis* (F).



Fonte: Autor

Algumas espécies de Triatominae apresentam coloração e características morfológicas semelhantes, o que dificulta a identificação dos exemplares (LENT et al., 1993).

Garcia e Powell (1998), também partilham dessa observação de Lent et al., (1993) e referem que algumas espécies são difíceis de separar taxonomicamente e outras têm seu status taxonômico questionado, sendo assim a morfometria, a citogenética, cruzamentos experimentais e técnicas de biologia molecular são metodologias úteis no processo de identificação dos Triatominae (MONTEIRO et al., 2001).

A biologia molecular fornece informações importantes sobre as relações filogenéticas, uma vez que sequências de aminoácidos e de nucleotídeos apresentam um número muito elevado de caracteres e por isso são muito utilizadas para a reconstrução filogenética (FUTUYMA, 1992).

1.3 – Sistemática e métodos moleculares

Vários marcadores moleculares podem ser explorados para fornecer informações sobre variabilidade genética dos triatomíneos por meio da detecção de polimorfismo de DNA. Para esse propósito existem várias técnicas disponíveis, tais como ARDRA (*Amplified Ribossomal DNA Restriction Analyses*) (VENTURA ET AL., 2001), AFLP (*Amplified Fragment Length Polimorfism*), DGGE (*Denaturing Gradient Gel Eletrophoresis*) (GASER et al., 1996), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (NAEGELE et al., 2006), RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*) (PACHECO et al., 2007), sequenciamento de genes nucleares (MONTEIRO et al., 2000; BARGUES et al., 2002; MARCILLA et al., 2002, DORN et al., 2009) e mitocondriais (GARCÍA;POWELL, 1998; LYMAN et al., 1999; MONTEIRO et al., 2000; 2004; HYPSE et al., 2002, ALMEIDA et al., 2009).

O sequenciamento de determinados genes permite avaliar de forma direta, polimorfismos de DNA, fornecendo informações para inferência filogenética bem como para a avaliação das relações entre organismos e populações. Diferentes porções do DNA mitocondrial e nuclear evoluem em taxas distintas. Regiões que evoluem rapidamente são adequadas para o estudo de organismos muito próximos e aquelas conservadas são mais apropriadas para comparação entre táxons mais distantes (ABAD-FRANCH;MONTEIRO, 2005). O DNA ribossomal (rDNA) é uma região bem conservada e que, recentemente, mostrou-se como um valioso auxílio

para pesquisas de sistemática e filogenia para organismos próximos ou relacionados de forma distante e que não acumulam mutações independentemente – cada unidade de rDNA evolui de forma sincronizada, podendo ser tratada como um único gene (COLEMAN, 2003; NAEGELE et al., 2006).

Os genes ribossomais estão agrupados como unidades repetitivas em *tandem* e nos insetos apresentam de 100 a 1000 cópias por genoma. Cada unidade consiste de regiões conservadas transcritas, nas quais estão os genes para as subunidades 18S, 5,8S e 28S do ribossomo, dois espaçadores internos ITS-1 e ITS-2, mais um espaçador externo (ETS) (COLEMAN, 2003).

A região ITS possui uma taxa de substituição nucleotídica mais célere que a da região 18S, portanto, apresenta evolução mais rápida. A taxa de evolução mais lenta da região 18S permite que relações muito antigas, com aproximadamente 100 milhões de anos, sejam estudadas. A região ITS-2 permite estudos de relações mais recentes (cerca de 50 milhões de anos atrás) e é preferencialmente escolhida para estudos de filogenia e como marcador molecular por possuir sub-regiões mais conservadas (BARGUES, 2000; COLEMAN, 2003).

O DNA mitocondrial (mtDNA) corresponde a um genoma relativamente simples, de herança materna e que apresenta taxa de mudança dez vezes mais rápida que as substituições do DNA nuclear (AVISE et al., 1987). Diferenças nas sequências de nucleotídeos de diferentes regiões do mtDNA também vêm sendo utilizadas para obtenção de informação sobre as relações evolutivas e/ou estrutura populacional de algumas espécies de insetos (XIONG; KOCHER, 1991; GASPARISH et al., 1995; ZHANG et al., 1995; LEHMANN et al., 2000, MONTEIRO et al., 2010).

Diferentes fragmentos de genes mitocondriais que codificam para citocromo-oxidase I (GARCIA;POWELL, 1998), citocromo b e grande subunidade ribossomal (LYMAN et al., 1999; MONTEIRO et al., 2000) foram sequenciados e mostraram-se úteis em estudos filogenéticos de alguns membros (gêneros e espécies) da subfamília Triatominae.

Garcia et al., (2001), utilizaram fragmentos de genes mitocondriais de 18 espécies de *Triatominae*, sendo 11 pertencentes ao complexo infestans e outras sete do gênero *Triatoma*, mas de complexo diferente. Ao analisar os fragmentos de mtDNA de 12S e 16S de genes de rRNA dessas dezoito espécies, bem como o gene da citocromo oxidase I (COI) de nove espécies, foi possível a separação das 18 espécies estudadas em dois grupos, sendo que no grupo do *T. infestans* foi incluído *T. circummaculata*. A inclusão do *T. circummaculata* no complexo *infestans* está em desacordo com a classificação morfológica inicialmente proposta por Lent e Wygodzinsky (1979), mostrando a importância de associar características morfológicas e moleculares para avaliações filogenéticas.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivos gerais

Estudar a relação filogenética entre as espécies *T. carcavalloii*, *T. circummaculata*, *T. klugii* e seis populações de *T. rubrovaria*, por meio do sequenciamento de fragmentos de genes pertencentes ao DNA mitocondrial e nuclear.

2.2 – Objetivos específicos

- Amplificar e sequenciar os fragmentos de genes pertencentes ao DNA mitocondrial COI e CytB;
- Amplificar e sequenciar os fragmentos de genes pertencentes ao DNA nuclear ITS-1, ITS-2 e 28S
- Estabelecer a relação filogenética entre as populações em estudo, de forma isolada e concatenação de sequências, por meio da análise Bayesiana e de Máxima Parcimônia.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

As extrações e amplificações de DNA foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular de Parasitos e Vetores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara.

O sequenciamento foi realizado em dois equipamentos distintos. Parte do procedimento foi realizado no equipamento MegaBACE 1000[®] (GE Healthcare Life Sciences) no Instituto de Física de São Carlos (IFSC-USP), Departamento de Física e Informática. A outra etapa foi realizada no sequenciador automático ABI 3730 XL (Applied Biosystems, Foster City, California (CA)), localizado no CREBIO (Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica) da Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias Campus de Jaboticabal (FCAV/UNESP).

3.1 Insetos

Foram utilizados exemplares de *T. rubrovaria* e *T. circummaculata* coletados em julho de 2008 no município de Quaraí (RS) pela equipe da Secretaria de Saúde do Estado Rio Grande do Sul. Dos exemplares oriundos dessa coleta, conseguiu-se apenas estabelecer colônia de *T. rubrovaria*. Os exemplares mortos de *T. circummaculata* estão acondicionados em frasco com álcool 70% a -20°C, condições essas que tornam viável o estudo desses exemplares com ferramentas de biologia molecular.

T. klugi foi cedido por Dayse da Silva Rocha (IOC). *T. carcavallo* também foi doado pela mesma pesquisadora e é mantido desde 2006 em colônias, à temperatura e umidade relativa do ar ambiente, no “Insetário de Triatominae” da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara. A manutenção das colônias é realizada quinzenalmente, por meio de alimentação com patos (*Anas*

platyrhynchos) ou camundongos albinos (*Mus musculus*), livres de infecção por *T. cruzi*.

Em julho de 2010 foram coletados exemplares de *T. rubrovaria* no município de Alegrete –RS nas localidades de Salso e Estrada dos Pinheiros. A coleta foi realizada pela equipe da Secretaria de Saúde do Estado do Rio Grande do Sul. Os exemplares foram sacrificados momentos antes da extração do DNA genômico.

Triatoma platensis é mantido no “Insetário de Triatominae” da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara, sob o registro CTA 147. É procedente de La Pampa, Argentina, tendo sido coletado em 14/12/1984.

Triatoma guasayana é mantido no “Insetário de Triatominae” da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara, sob o registro CTA 215. É procedente da Província de Tita (Chaco Boliviano), coletado em 2003, sendo cedido por Cleber Galvão (IOC-RJ) em 12/07/2010.

As procedências dos triatomíneos utilizados no presente estudo encontram-se sumarizadas na Tabela 1.

MATERIAL E MÉTODOS

Tabela 1: Espécies e procedência dos Triatomíneos cujo DNA foi extraído e sequenciado os fragmentos dos genes mitocondriais (CytB e COI) e nucleares (ITS-1, ITS-2 e 28S).

Espécie	Ano de coleta	Procedência	Identificação utilizada	CTA (quando aplicável)
<i>T. rubrovaria</i>	2010	Alegrete – RS (Localidade: Estrada dos Pinheiros)	<i>T.rubrovaria</i> AEP	-
<i>T. rubrovaria</i>	2010	Alegrete- RS (Localidade: Salso)	<i>T.rubrovaria</i> ASL	-
<i>T. rubrovaria</i>	2010	Canguçu - RS	<i>T.rubrovaria</i> CAN	-
<i>T. rubrovaria</i>	2008	Quaraí (Localidade: Cerro do Jarau)	<i>T.rubrovaria</i> QCJ	-
<i>T. rubrovaria</i>	2008	Quaraí (Localidade: Macarrão)	<i>T.rubrovaria</i> QMA	-
<i>T. rubrovaria</i>	2008	Quaraí (Localidade: Rosada)	<i>T.rubrovaria</i> QRO	-
<i>T. klugi</i>	2003	Nova Petrópolis – RS	<i>T.klugi</i>	-
<i>T. carcavalloii</i>	2006	São Jerônimo, RS (Localidade: Fernão Dias)	<i>T.carcavalloii</i>	-
<i>T. circummaculata</i>	2008	Quaraí (Localidade: Rosada)	<i>T.circummaculata</i>	-
<i>T. platensis</i>	1984	La Pampa – Argentina	<i>T.platensis</i>	147
<i>T. guasayana</i>	2003	Provincia de Tita – Chaco Boliviano	<i>T.guasayana</i>	215

3.2 Extração e estimativa da concentração do DNA genômico

O tecido de escolha para a extração do DNA genômico foi o da musculatura da perna, por apresentar menor carga microbiana bem como possuir massa muscular significativa. Foram excisadas as seis pernas de cada exemplar adulto com auxílio de instrumentos cirúrgicos previamente esterilizados. A extração foi realizada servindo-se do protocolo proposto por Bargues e Mas-Coma (1997) e para a estimativa da concentração do DNA genômico, utilizou-se o equipamento NanoDrop® 2000 Thermo Scientific®, também disponível no IFSC-USP.

3.3 Iniciadores (*Primers*)

O fragmento do gene que codifica para o citocromo b (CytB) foi amplificado pelos mesmos iniciadores utilizados por Monteiro et al. (2003):

CYTB7432F (5'-GGACG(AT)GG(AT)ATTTATTATGGATC-3')

CYTB7433R (5'- GC(AT)CCAATTCA(AG)GTTA(AG)TAA-3')

Para a amplificação do fragmento citocromo oxidase I (COI) foram utilizados os *primers* descritos por Pfeiler et al. (2006):

LCO1490f (5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3')

HCO2198r (5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3')

A amplificação do fragmento de gene da grande subunidade ribossomal D2 (28S) foi realizada com os mesmos iniciadores utilizados por Porter e Collins (1996).

Forward: 5' – GCG AGT CGT GTT GCT TGA TAG TGC AG – 3'

Reverse: 5' – TTG GTC CGT GTT TCA AGA CGG G – 3'

MATERIAL E MÉTODOS

Para amplificação da região da região ITS foram utilizados os seguintes iniciadores:

Primer 1:

Forward: 5' – TAC ACA CCG CCC GTC GCT ACT A – 3' (JI et al., 2003)

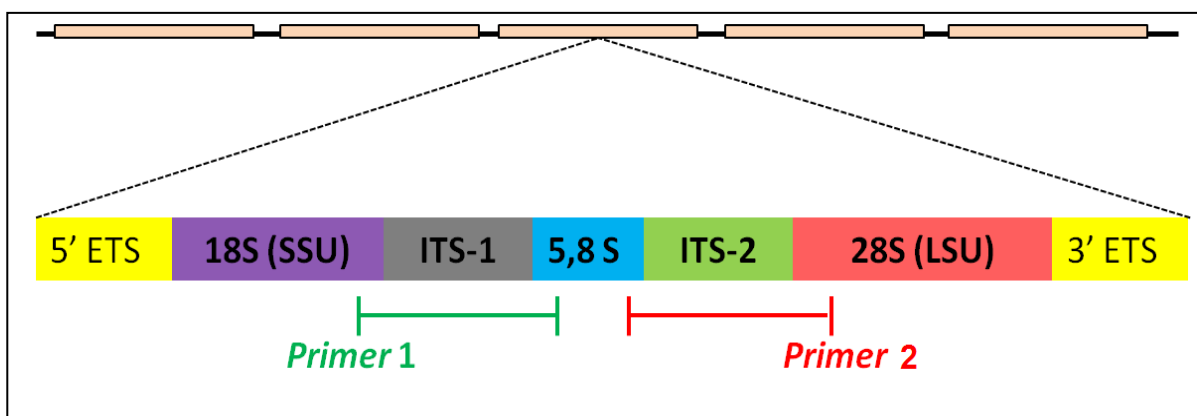
Reverse: 5' – GAG TGA TCC GCC GCT CAG GGT AAT A – 3'

Primer 2:

Forward: 5' –TTC TGT TGG ACA TCA CGT TTT TG– 3'

Reverse: 5' – CTG AGC TTC ACG TAC TCT TG – 3'

Figura 02: Esquema para desenho dos *primers* para amplificação da região ITS. Adaptado de Coleman (2003).



Fonte: Autor

3.4 Amplificação de DNA por PCR (Polymerase Chain Reaction)

As reações de PCR foram realizadas em um termociclador Gene Amp PCR System 9700 Applied Biosystems™, com um volume final de 50µL com os seguintes componentes: aproximadamente 100ng de DNAg (molde), 100µM de dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP), 10 picomoles de cada iniciador (*primer*), 2mM de cloreto de

MATERIAL E MÉTODOS

magnésio, 1U de enzima de alta fidelidade High Fidelity PCR Enzyme Mix[®] (Fermentas) e tampão 10X, parte integrante da enzima.

Todas as reações foram acompanhadas de um controle negativo, formado por todos os compostos da reação, com exceção do DNA genômico, cujo volume foi substituído por água Milli-Q estéril.

As condições para a amplificação do fragmento do gene Citocromo B (MONTEIRO et al., 2003) foram: 94° C por cinco minutos (desnaturação inicial) seguidos por 40 ciclos compreendendo 94°C por 45 segundos (desnaturação), 50°C por 45 segundos (anelamento), 72°C por um minuto (extensão) e finalizando com um ciclo a 72°C por sete minutos (extensão final).

Para o fragmento do gene COI (PFEILER et al., 2006), as condições para a amplificação foram: 94°C por três minutos, seguidos por 30 ciclos contendo 94°C por um minuto (desnaturação), 45°C por um minuto (anelamento) e 72°C por um minuto (extensão), seguidos por uma extensão final de 10 minutos.

Para o 28S (D2) (PORTER;COLLINS, 1996) as condições foram: 94° C por cinco minutos (desnaturação inicial) seguidos por 40 ciclos compreendendo 94°C por 45 segundos (desnaturação), 53°C por 45 segundos (anelamento), 72°C por um minuto (extensão) e finalizando com um ciclo a 72°C por sete minutos (extensão final).

A amplificação do ITS-2 foi realizada nas seguintes condições: 94°C por cinco minutos (desnaturação inicial) seguidos por 40 ciclos compreendendo 94°C por 45 segundos (desnaturação), 56°C por dois minutos (anelamento), 72°C por um minuto (extensão) e finalizando com um ciclo a 72°C por sete minutos (extensão final).

Para a amplificação do ITS-1, foram obedecidas as seguintes condições: 94° C por cinco minutos (desnaturação inicial) seguidos por 40 ciclos compreendendo

94°C por 45 segundos (desnaturação), 53°C por dois minutos (anelamento), 72°C por um minuto (extensão) e finalizando com um ciclo a 72°C por sete minutos (extensão final).

A confirmação da reação de amplificação foi realizada em eletroforese em gel de Agarose a 1.5%, corada por brometo de etídio e observada em luz UV no equipamento Alpha Imager EP Multimage I[®], Alpha Innotech .

3.5 Purificação dos fragmentos amplificados

Os fragmentos amplificados foram purificados com o Kit "Illustra[™] GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit" (GE Health Care Inc.) e com o kit NucleoSpin[®] Extract II Kit (Macherey-Nagel GmbH; Co. KG), ambos de acordo com as instruções do fabricante.

Após a purificação foi realizada eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio com o intuito de verificar a qualidade do produto obtido.

3.6 Sequenciamento

Os produtos de PCR obtidos foram sequenciados a partir das extremidades para gerar sequências consenso (*forward* e *reverse*) aumentando, portanto, a confiabilidade das sequências obtidas. A reação de sequenciamento foi feita com o Kit DYEnamic ET para MegaBACE 1000[®] (GE Healthcare Life Sciences) e com BigDye3.1 (Applied Biosystems), conforme instruções do fabricante.

3.7 Forma de Análise dos Resultados

A qualidade das sequências obtidas foi avaliada por meio da análise do eletroferograma no programa BioEdit Sequence Alignment Editor[®] V. 7.0.9.0 (Hall, 1998).

Após a análise da qualidade, as sequências *forward* e *reverse* de cada exemplar foram alinhadas para obtenção de uma sequência consenso e este produto, posteriormente foi realinhado com todos os demais exemplares. Este procedimento foi realizado com os cinco marcadores em estudo (CytB, COI, 28S, ITS-1 e ITS-2).

Foram utilizadas duas metodologias para inferir a filogenia: a análise bayesiana foi realizada no programa MrBayes 3.1 e a análise de parcimônia máxima no PAUP 4.0.

Para viabilizar a análise filogenética incluíram-se outras espécies de triatomíneos disponíveis no GenBank (Tabela 2).

MATERIAL E MÉTODOS

Tabela 2: Sequencias de DNA utilizadas para estabelecer as relações filogenéticas entre as espécies e populações. “NE”= obtidas neste estudo; “?” =sequências não disponíveis no GenBank®.

Triatomíneos	CytB	COI	ITS-1	ITS-2	28S
<i>T. rubrovaria</i> AEP	NE	NE	NE	NE	NE
<i>T. rubrovaria</i> ASA	NE	NE	NE	NE	NE
<i>T. rubrovaria</i> CAN	NE	NE	NE	NE	NE
<i>T. rubrovaria</i> QCJ	NE	NE	NE	NE	NE
<i>T. rubrovaria</i> QMA	NE	NE	NE	NE	NE
<i>T. rubrovaria</i> QRO	NE	NE	NE	NE	NE
<i>T. klugi</i>	NE	NE	NE	NE	NE
<i>T. carcavallo</i>	NE	NE	NE	NE	NE
<i>T. circummaculata</i>	NE	NE	NE	NE	NE
<i>T. platensis</i>	NE	NE	NE	NE	NE
<i>T. guasayana</i>	NE	NE	NE	NE	NE
<i>P. megistus</i>	AF045722	AF021182	?	?	?
<i>T. dimidata</i>	FN641816	JQ575030	?	?	?
<i>T. longipennis</i>	DQ198815	DQ198804	?	?	?
<i>T. recurva</i>	DQ198812	DQ198803	?	?	?
<i>T. mazzotti</i>	DQ198816	DQ198805	?	?	?
<i>T. rubida</i> sonoraiana	DQ198810	DQ198800	?	?	?
<i>T. sordida</i> 1	HQ333243	AF021216	AJ576063	AJ576063	?
<i>T. sordida</i> 2	HQ333242	AF021210	?	?	?
<i>T. sherlocki</i>	EU489058	?	?	?	?
<i>T. infestans</i> 1	JN006798	HQ437704	HQ437706	AD576054	GQ853396
<i>T. infestans</i> 2	AY702020	HQ437703			
<i>T. brasiliensis</i> haplótipo a *	AY336524	AF021184	?	?	?
<i>T. brasiliensis</i> haplótipo b *	AY494140	AF021184	?	?	?
<i>T. brasiliensis</i> haplótipoD*	AY494166	?	?	?	?
<i>T. brasiliensis</i> haplótipoE*	AY494167	?	?	?	?

Tabela 2: continuação

Triatomíneos	CytB	COI	ITS?1	ITS?2	28S
<i>T. brasiliensis</i> haplótipo H*	AY336527	?	?	?	?
<i>T. brasiliensis</i> haplótipo I *	AY494170	?	?	?	?
<i>T. protracta</i>	?	?	?	?	FJ230603

** Haplótipos de *T. brasiliensis* segundo Monteiro et al (2004), posteriormente redefinido como: D,E = *T. juazeirensis* e H, I = *T. melanica* (COSTA et al., 2006; COSTA;FELIX 2007).

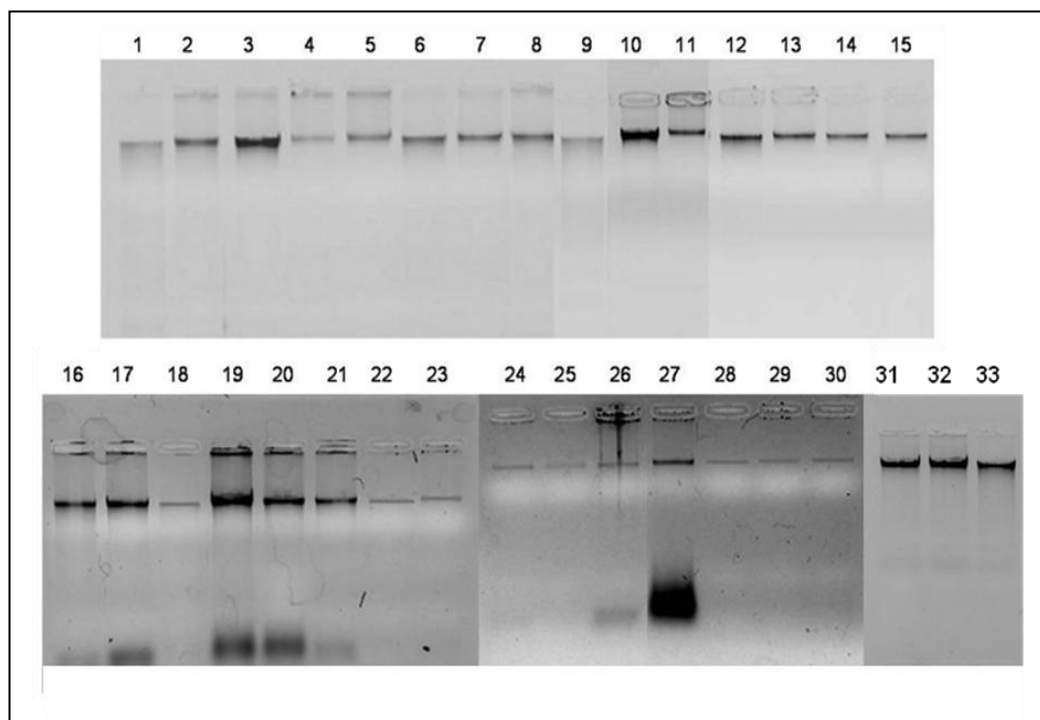
4 – RESULTADOS

4.1 – Extração do DNA total

O DNA total foi extraído de três exemplares adultos de *T. carcavalloii*, *T. circummaculata*, *T. klugi*, *T. rubrovaria*, *T. platensis* e *T. guasayana*, utilizando o protocolo modificado proposto por Bargues e Mas-Coma (1997).

O produto final da extração foi ressuspenso em 100µL de água Milli-Q estéril e então a com 3µl de DNAg realizou-se a eletroforese em gel de agarose 1%, com o intuito de avaliar a integridade e a qualidade do DNAg extraído (Figura 3).

Figura 03: Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, da extração do DNAg de três exemplares de cada população estudada: *T. rubrovaria* procedente de Quaraí – Cerro do Jarau (1 a 3), *T. rubrovaria* procedente de Quaraí – Rosada (4 a 6), *T. rubrovaria* procedente de Quaraí – Macarrão (7 a 9), *T. circummaculata* (10 a 12), *T. klugi* (13 a 15), *T. platensis* (16 a 18) *T. carcavalloii* (19 a 21), *T. rubrovaria* procedente de Alegrete – Estrada dos Pinheiros (22 a 24), *T. rubrovaria* procedente de Alegrete – Salso (25 a 27), *T. guasayana* (28 a 30) e *T. rubrovaria* procedente de Canguçu (31 a 33).



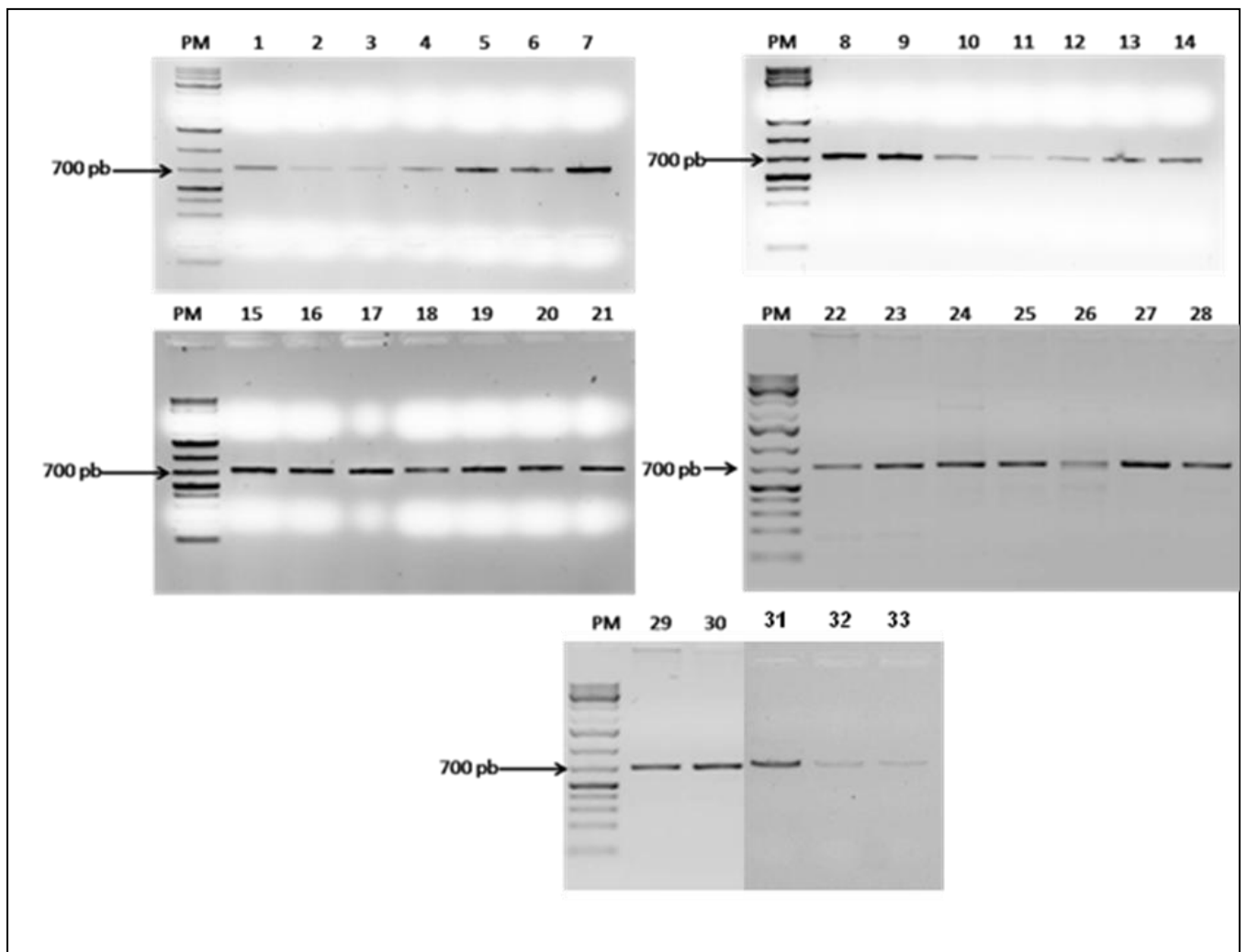
Fonte: Autor

4.2 - Isolamento (PCR) e purificação dos fragmentos de interesse

Os fragmentos amplificados foram purificados e avaliados em gel de agarose a 1%. Os fragmentos relativos aos genes CytB, COI e 28S apresentaram cerca de 700 pares de bases -pb (Figuras 04, 05 e 06, respectivamente), resultados que estão em conformidade com aqueles obtidos pelos autores que desenvolveram os *primers* anteriormente (MONTEIRO et al., 2003; PFEILER et al., 2006; PORTER; COLLINS, 1996). Os fragmentos amplificados para o ITS-1 e ITS-2 apresentam cerca de 1000 pb (Figuras 07 e 08, respectivamente).

RESULTADOS

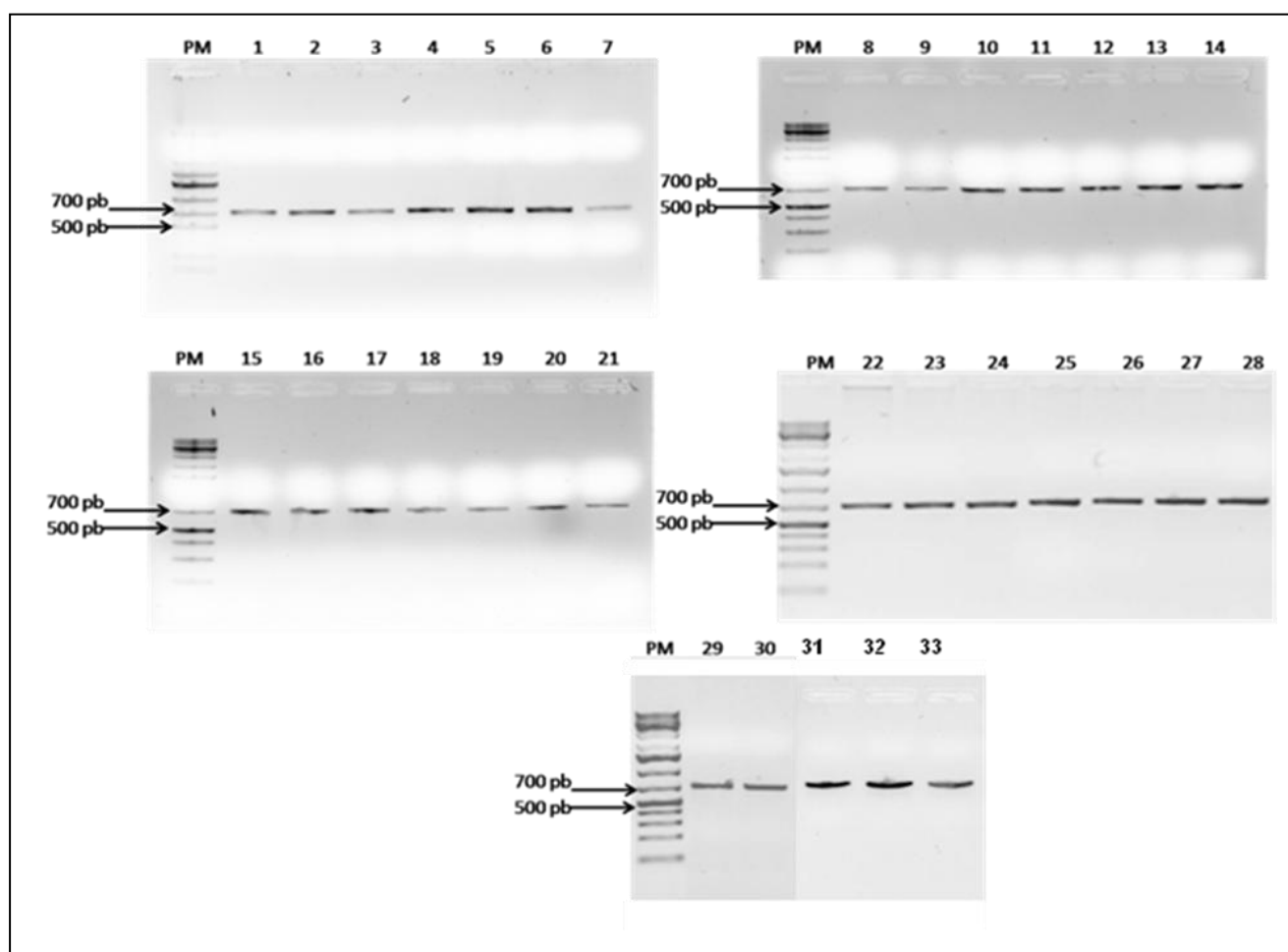
Figura 04: Produto de PCR de isolamento do fragmento do gene CytB para as espécies: *T. rubrovaria* procedente de Quaraí – Cerro do Jarau (1 a 3), *T. rubrovaria* procedente de Quaraí – Rosada (4 a 6), *T. rubrovaria* procedente de Quaraí – Macarrão (7 a 9), *T. circummaculata* (10 a 12), *T. klugi* (13 a 15), *T. platensis* (16 a 18) *T. carcavalloi* (19 a 21), *T. rubrovaria* procedente de Alegrete – Estrada dos Pinheiros (22 a 24), *T. rubrovaria* procedente de Alegrete – Salso (25 a 27), *T. guasayana* (28 a 30) e *T. rubrovaria* procedente de Canguçu (31 a 33). O peso molecular (PM) utilizado foi O'GeneRuler 1Kb DNA Ladder Plus (Fermentas®).



Fonte: Autor

RESULTADOS

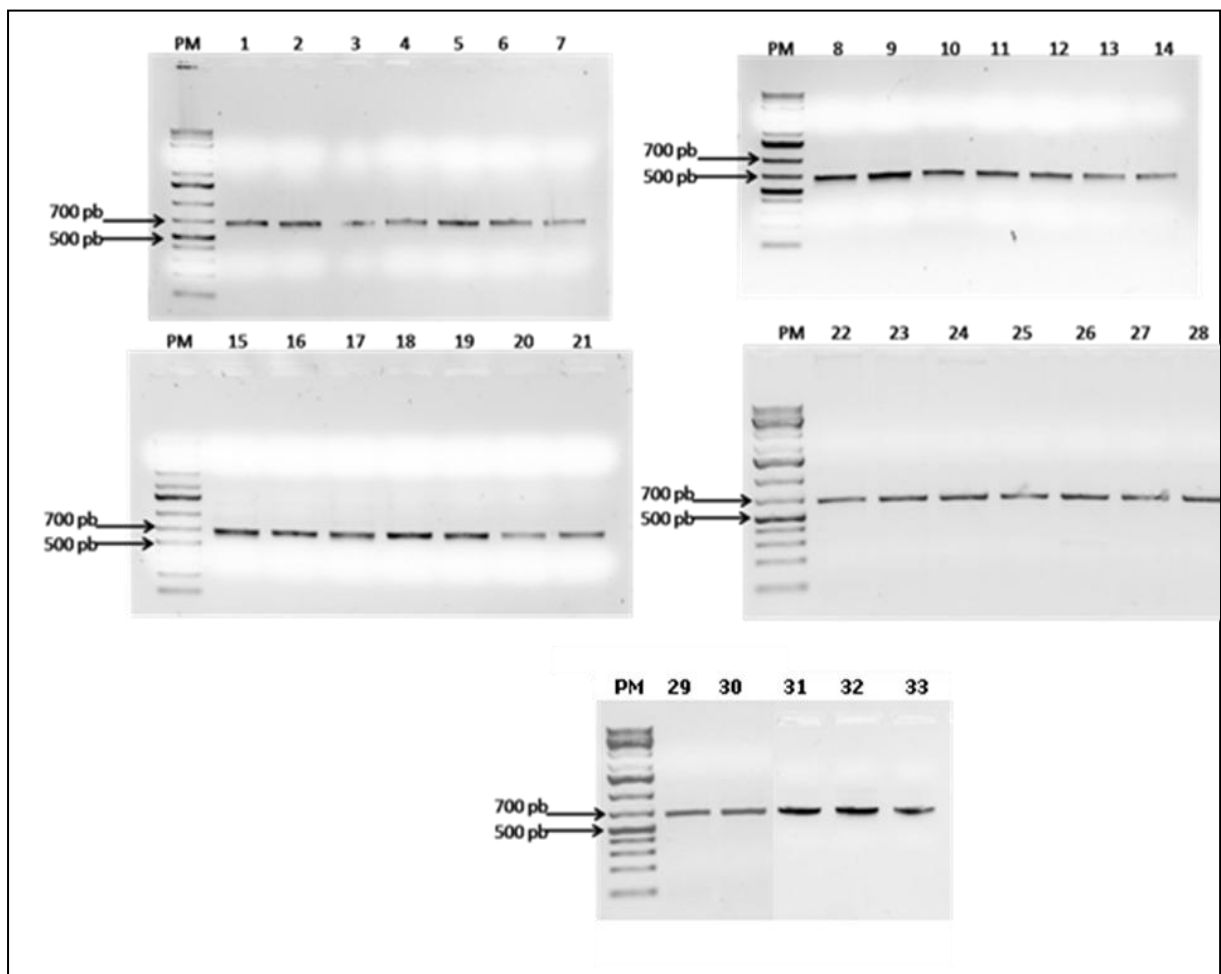
Figura 05: Produto de PCR de isolamento do fragmento do gene COI para as espécies: *T. rubrovaria* procedente de Quaraí – Cerro do Jarau (1 a 3), *T. rubrovaria* procedente de Quaraí – Rosada (4 a 6), *T. rubrovaria* procedente de Quaraí – Macarrão (7 a 9), *T. circummaculata* (10 a 12), *T. klugi* (13 a 15), *T. platensis* (16 a 18) *T. carcavalloi* (19 a 21), *T. rubrovaria* procedente de Alegrete – Estrada dos Pinheiros (22 a 24), *T. rubrovaria* procedente de Alegrete – Salso (25 a 27), *T. guasayana* (28 a 30) e *T. rubrovaria* procedente de Canguçu (31 a 33). O peso molecular (PM) utilizado foi O'GeneRuler 1Kb DNA Ladder Plus (Fermentas®).



Fonte: Autor

RESULTADOS

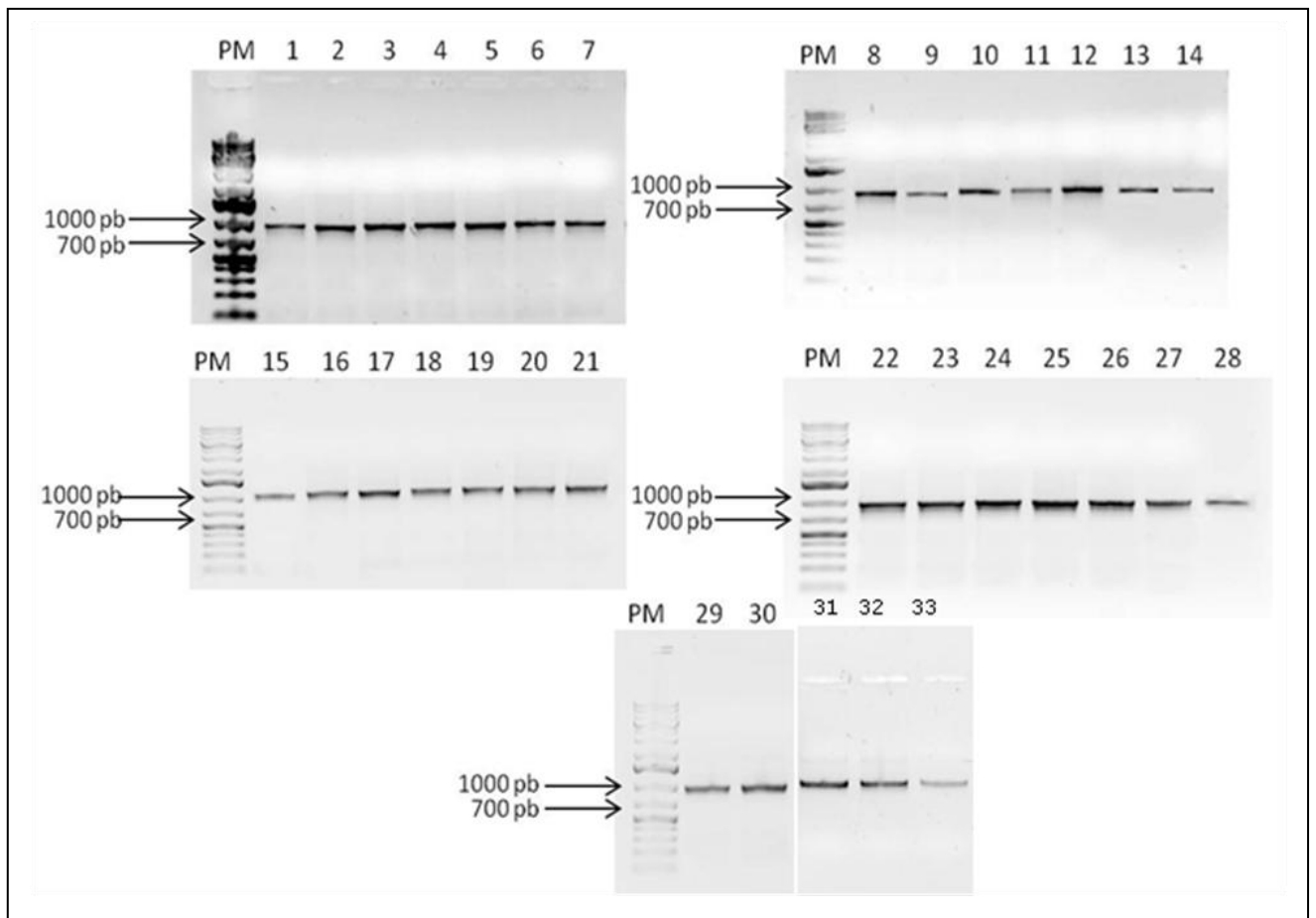
Figura 06: Produto de PCR de isolamento do fragmento do gene 28S para as espécies: *T. rubrovaria* procedente de Quaraí – Cerro do Jarau (1 a 3), *T. rubrovaria* procedente de Quaraí – Rosada (4 a 6), *T. rubrovaria* procedente de Quaraí – Macarrão (7 a 9), *T. circummaculata* (10 a 12), *T. klugi* (13 a 15), *T. platensis* (16 a 18) *T. carcavalloi* (19 a 21), *T. rubrovaria* procedente de Alegrete – Estrada dos Pinheiros (22 a 24), *T. rubrovaria* procedente de Alegrete – Salso (25 a 27), *T. guasayana* (28 a 30) e *T. rubrovaria* procedente de Canguçu (31 a 33). O peso molecular (PM) utilizado foi O'GeneRuler 1Kb DNA Ladder Plus (Fermentas®).



Fonte: Autor

RESULTADOS

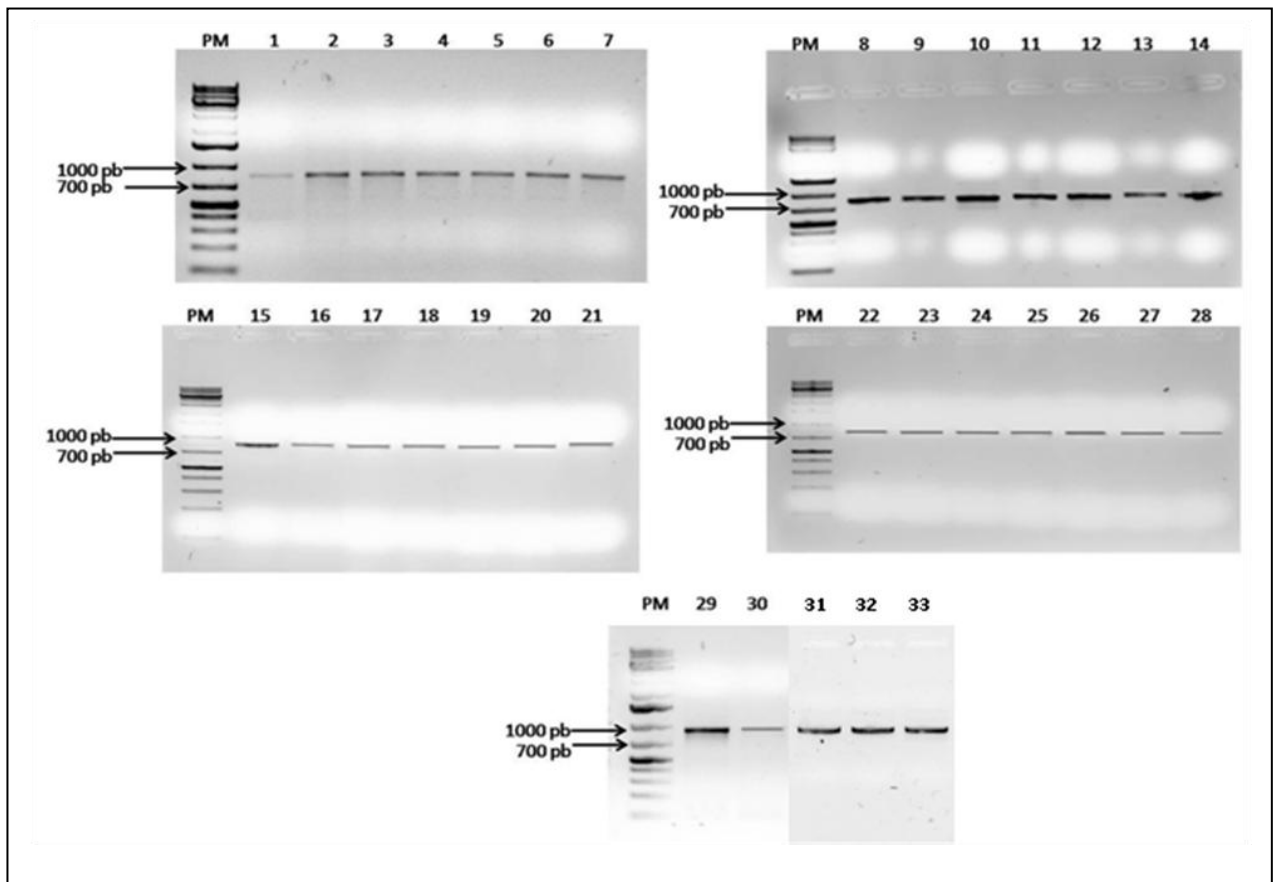
Figura 07: Produto de PCR de isolamento do fragmento do ITS-1 para as espécies: *T. rubrovaria* procedente de Quaraí – Cerro do Jarau (1 a 3), *T. rubrovaria* procedente de Quaraí – Rosada (4 a 6), *T. rubrovaria* procedente de Quaraí – Macarrão (7 a 9), *T. circummaculata* (10 a 12), *T. klugi* (13 a 15), *T. platensis* (16 a 18) *T. carcavalloii* (19 a 21), *T. rubrovaria* procedente de Alegrete – Estrada dos Pinheiros (22 a 24), *T. rubrovaria* procedente de Alegrete – Salso (25 a 27), *T. guasayana* (28 a 30) e *T. rubrovaria* procedente de Canguçu (31 a 33). O peso molecular (PM) utilizado foi O'GeneRuler 1Kb DNA Ladder Plus (Fermentas®).



Fonte: Autor

RESULTADOS

Figura 08: Produto de PCR de isolamento do fragmento do ITS-2 para as espécies: *T. rubrovaria* procedente de Quaraí – Cerro do Jarau (1 a 3), *T. rubrovaria* procedente de Quaraí – Rosada (4 a 6), *T. rubrovaria* procedente de Quaraí – Macarrão (7 a 9), *T. circummaculata* (10 a 12), *T. klugi* (13 a 15), *T. platensis* (16 a 18), *T. carcavalloi* (19 a 21), *T. rubrovaria* procedente de Alegrete – Estrada dos Pinheiros (22 a 24), *T. rubrovaria* procedente de Alegrete – Salso (25 a 27), *T. guasayana* (28 a 30) e *T. rubrovaria* procedente de Canguçu (31 a 33). O peso molecular (PM) utilizado foi O'GeneRuler 1Kb DNA Ladder Plus (Fermentas®).



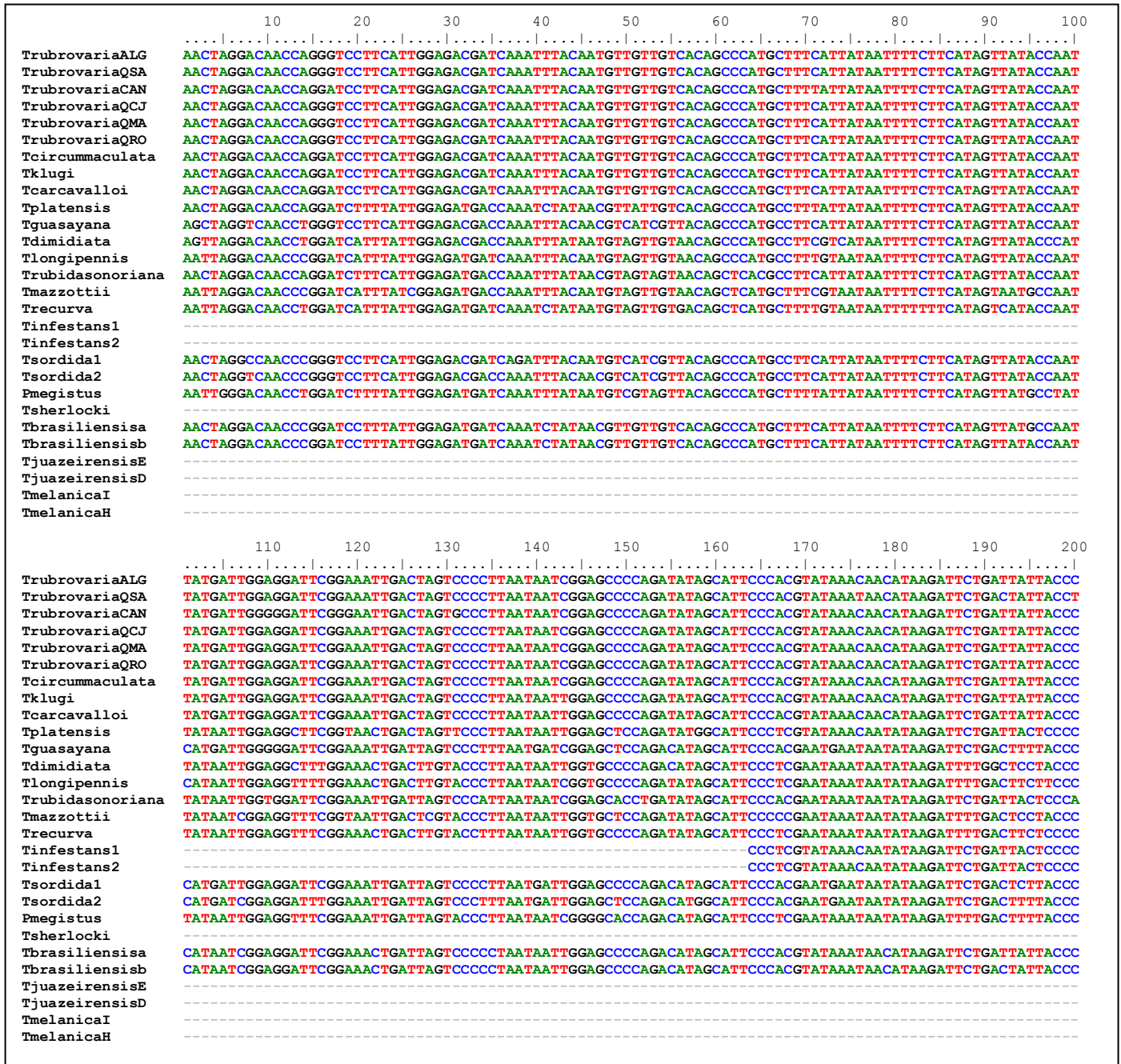
Fonte: Autor

4.3 – Sequenciamento

Os produtos da PCR purificados foram processados nos sequenciadores automáticos MegaBACE 1000® (GE Healthcare Life Sciences) e ABI 3730 XL (Applied Biosystems, Foster City, California - CA). A qualidade das sequências foi avaliada por meio da análise do eletroferograma no programa BioEdit Sequence Alignment Editor® V. 7.0.9.0 (Hall, 1998).

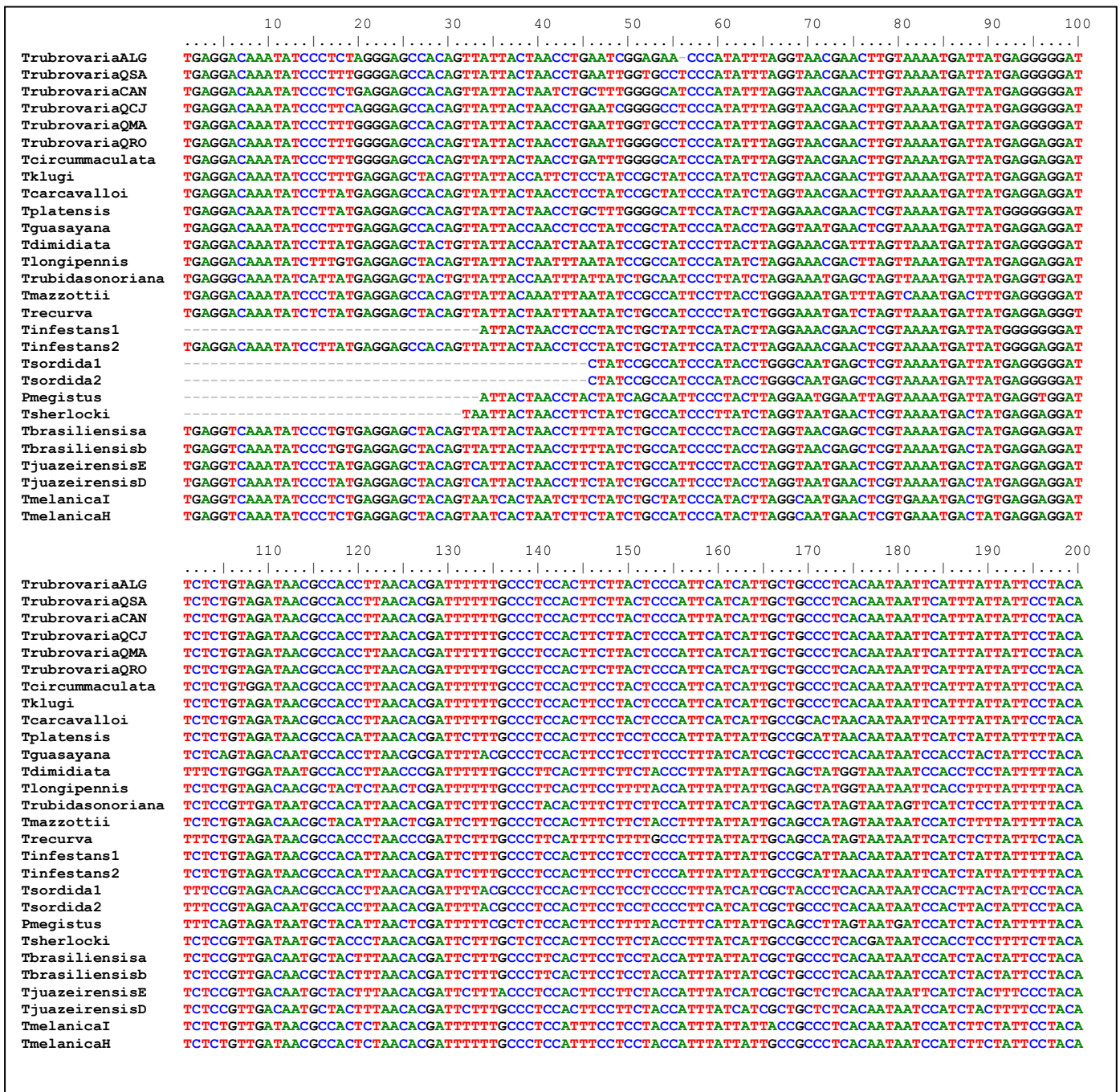
Após a análise da qualidade, as sequências *forward* e *reverse* de cada exemplar foram alinhadas para obtenção de uma sequência consenso. Após o alinhamento, realizou-se novo alinhamento com todos os exemplares analisados para cada fragmento de gene (Figuras 09, 10, 11, 12 e 13).

Figura 09: Alinhamento realizado no programa Clustal W das seqüências obtidas pela amplificação do fragmento COI (554 pb) e de seqüências disponíveis no GenBank. As procedências podem ser verificadas na Tabela 2.



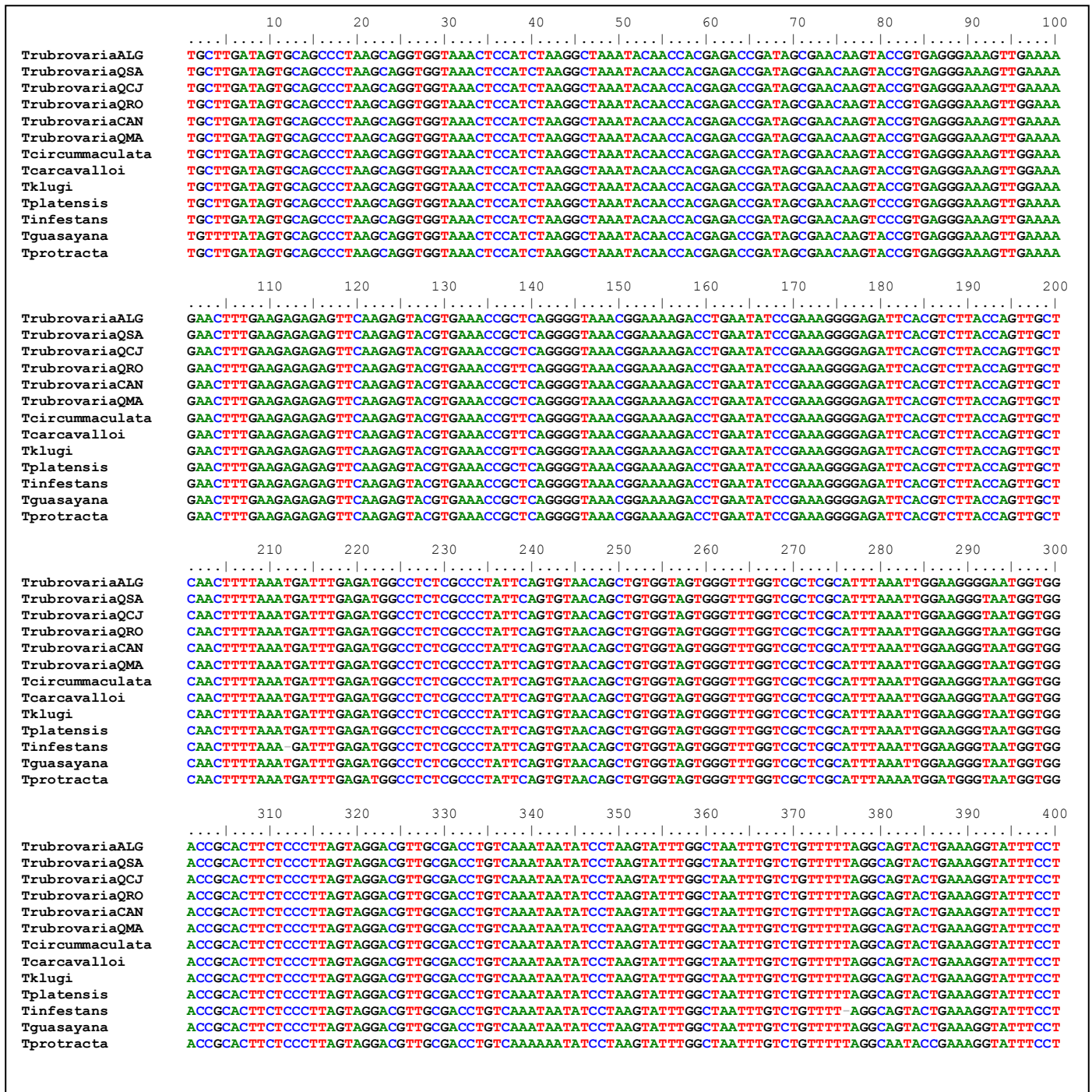
Fonte: Autor

Figura 10: Alinhamento realizado no programa Clustal W das sequências obtidas pela amplificação do fragmento CytB (444 pb) e de sequências disponíveis no GenBank. As procedências podem ser verificadas na Tabela 2.



Fonte: Autor

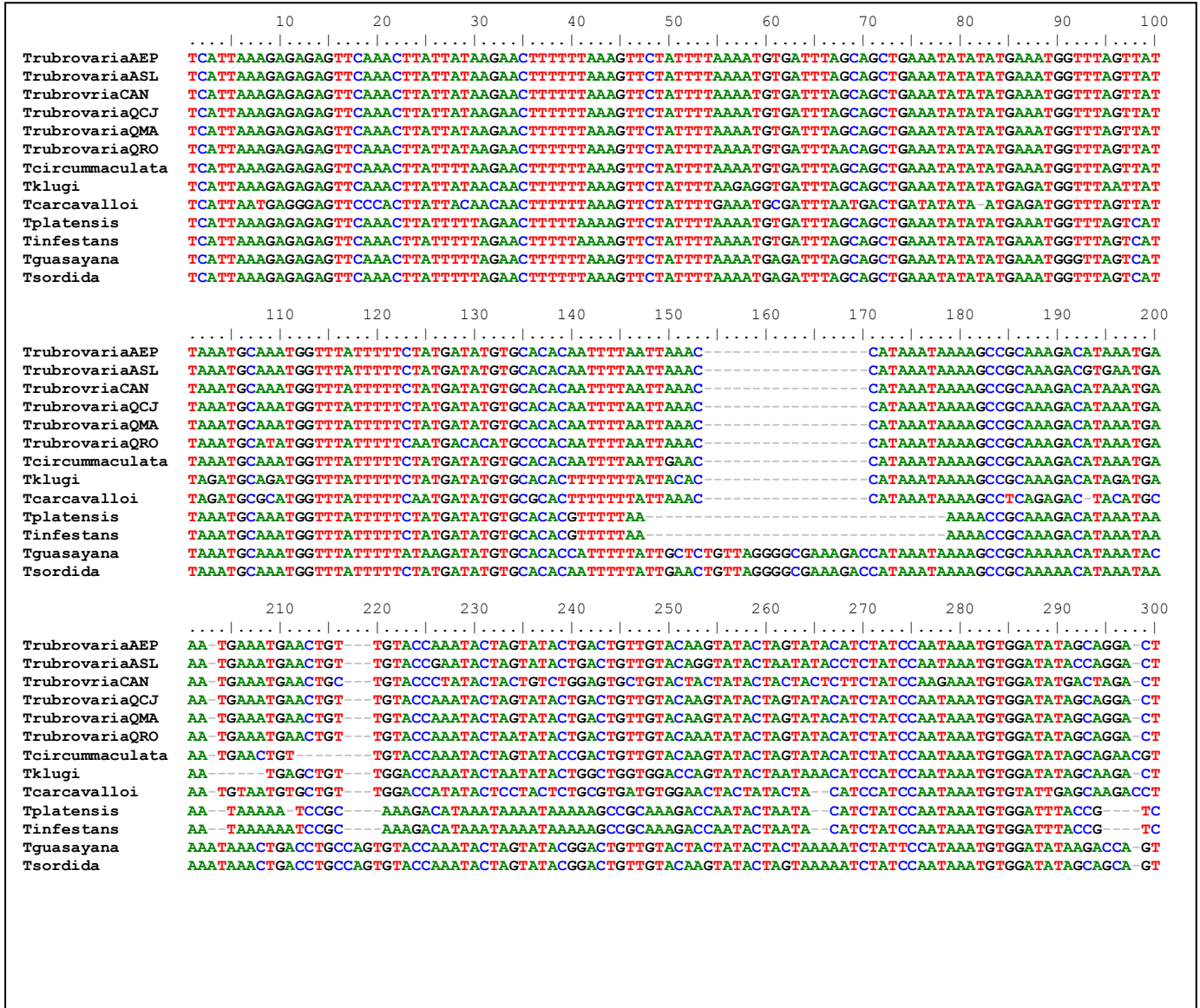
Figura 11: Alinhamento realizado no programa Clustal W das sequências obtidas pela amplificação do fragmento 28S (626 pb) e de sequências disponíveis no GenBank. As procedências podem ser verificadas na Tabela 2.



Fonte: Autor

RESULTADOS

Figura 12: Alinhamento realizado no programa Clustal W das sequências obtidas pela amplificação do fragmento ITS-1 (568 pb) e de sequências disponíveis no GenBank. As procedências podem ser verificadas na Tabela 2.



Fonte: Autor

Figura 12: continuação

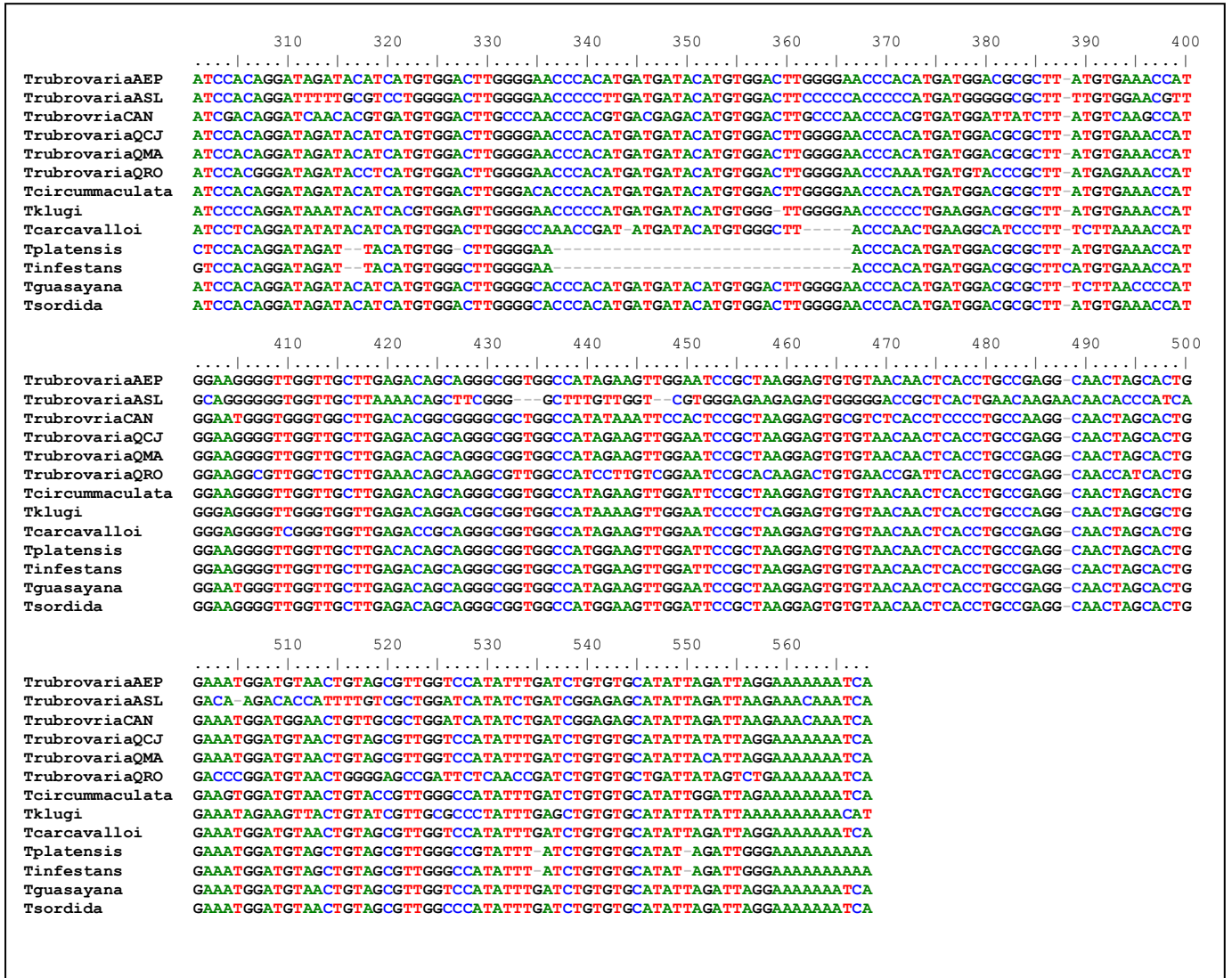
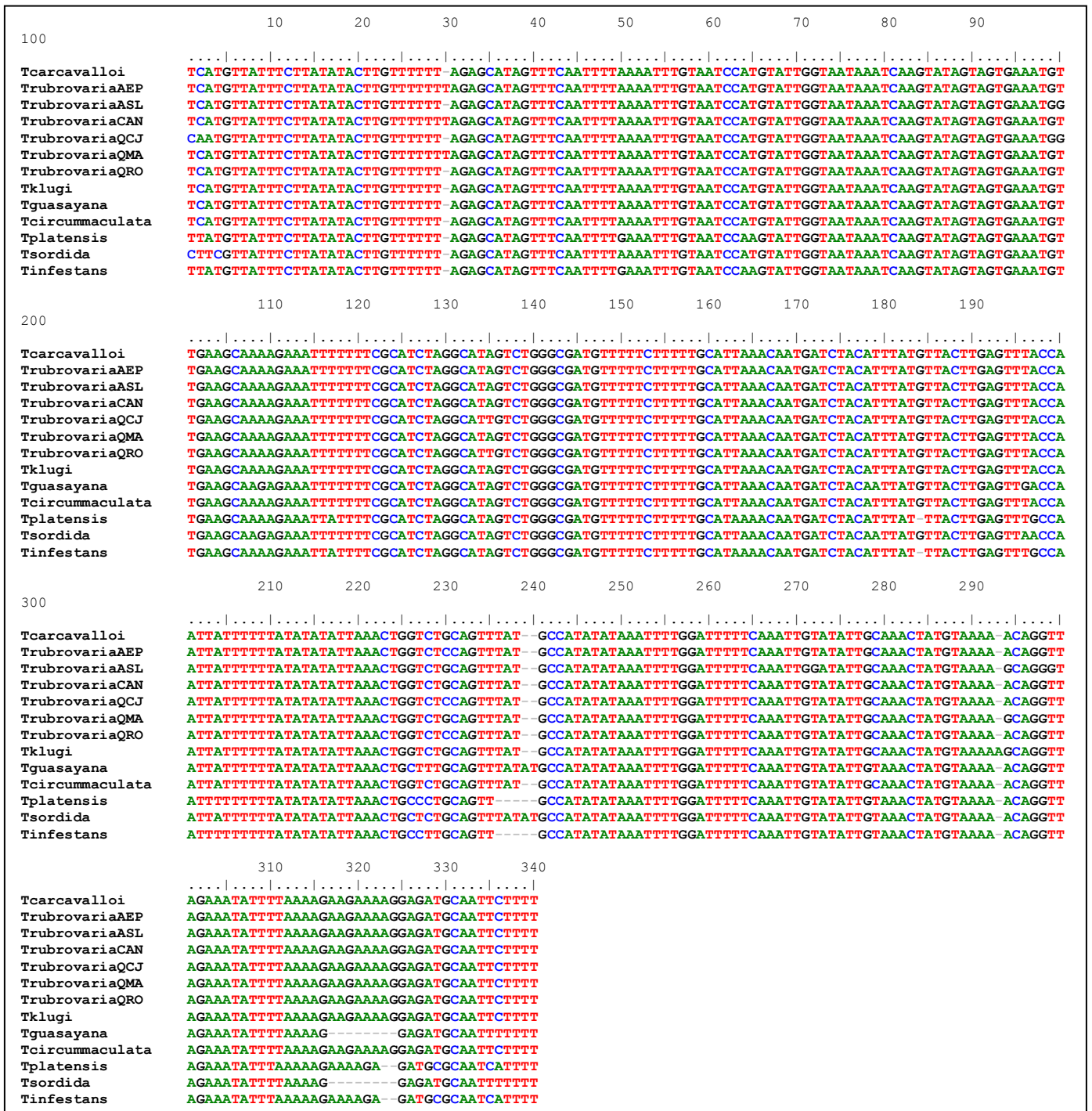


Figura 13: Alinhamento realizado no programa Clustal W das sequências obtidas pela amplificação do fragmento ITS-2 (340 pb) e de sequências disponíveis no GenBank. As procedências podem ser verificadas na Tabela 2.



4.4 – Análise Filogenética

Para realizar a análise Bayesiana e a Máxima Parcimônia, os fragmentos dos genes COI e CytB foram concatenados, o que gerou um alinhamento cujas sequencias possuem 1012 pares de bases, incluindo os *gaps*. O melhor modelo evolutivo indicado pelo MrModeltest (NYLANDER, 2004) foi aplicado, a fim de desenvolver a reconstrução filogenética dos táxons envolvidos no estudo. A análise Bayesiana foi realizada com duas corridas independentes de quatro cadeias de Markov para 1.000.000 gerações de onde 2.000 árvores foram amostradas (amostrado cada geração 500) e, do padrão médio de frequências divididas, exibiu 0,005 no final da corrida.

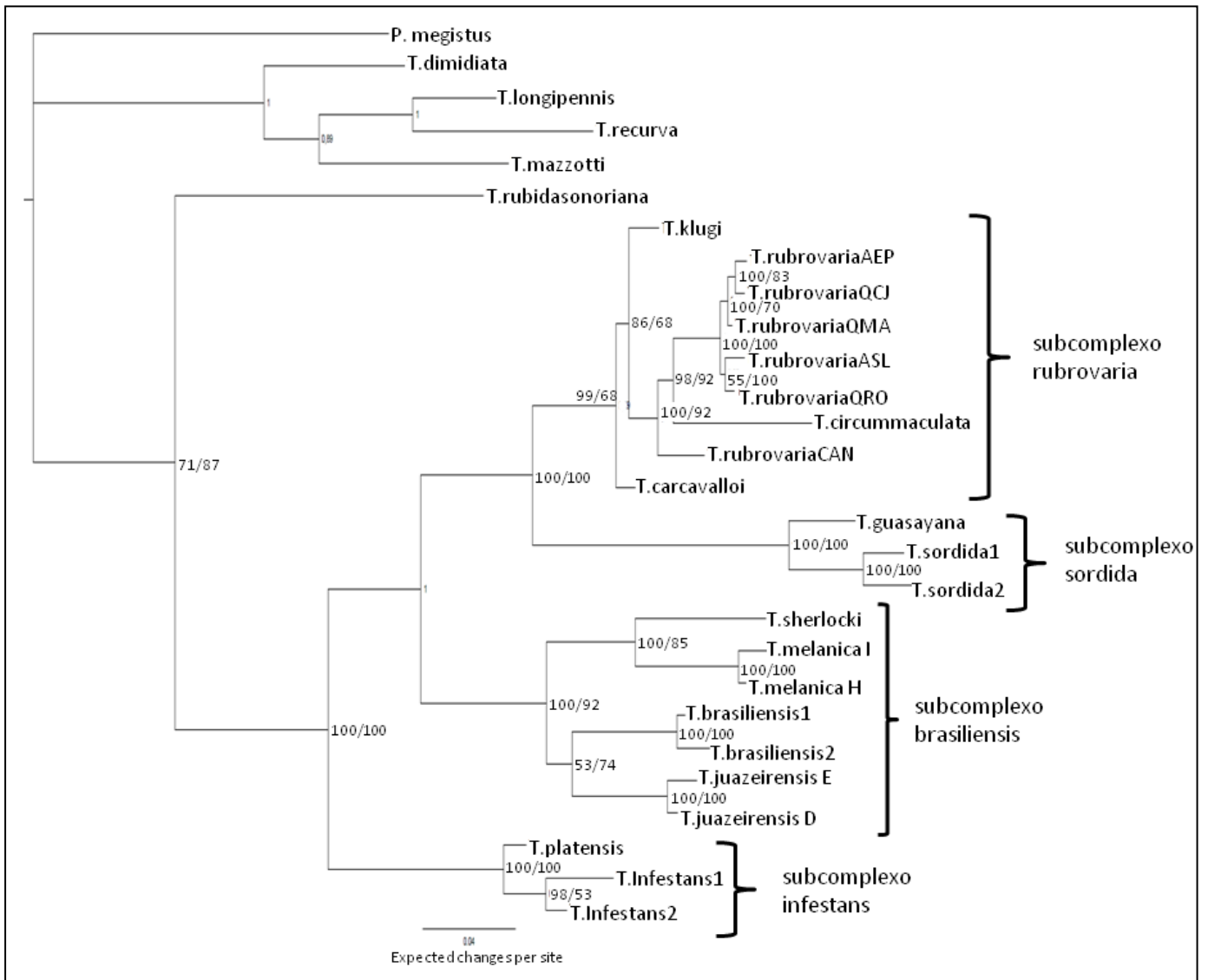
Para resumir as informações foram descartadas aproximadamente as primeiras 25% das amostras obtidas durante as primeiras gerações, que representam as amostragens iniciais obtidas antes da estabilização da análise. *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) foi utilizado como grupo externo para todas as análises. As probabilidades Bayesianas (PB) de clados posteriores foram calculadas utilizando-se o consenso.

A análise por meio da Máxima Parcimônia pela busca Heurística foi utilizada para encontrar a melhor topologia, utilizando 1.000 replicatas. Os valores de Bootstrap foram estimados em 1.000 pseudoreplicatas.

Por meio da análise bayesiana dos dados concatenados de CytB e COI, obteve-se uma árvore cuja topografia é formada por quatro clados bem definidos que agrupam as espécies analisadas nos subcomplexos às quais pertencem. Nela são indicados os valores de probabilidade bayesiana (PB) e de *bootstrap* (BT) (Figura 14).

RESULTADOS

Figura 14: Análise bayesiana do produto da combinação dos fragmentos de gene CytB e COI de triatomíneos, com enfoque em taxons do Estado do Rio Grande do Sul - Brasil. Os valores apresentados nos cladogramas representam PB /BT, respectivamente.respectivamente.



Fonte: Autor

Os exemplares de *T. rubrovaria* oriundos de Alegrete, Cerro do Jarau, Quaraí-Macarrão, Quaraí-Rosada, Quaraí-Salso e Canguçu, bem como os de *T. circummaculata*, *T. carcavalloii* e *T. klugi* compõem um único clado, com elevados valores de credibilidade (PB=97, BT=88), formando o subcomplexo rubrovaria.

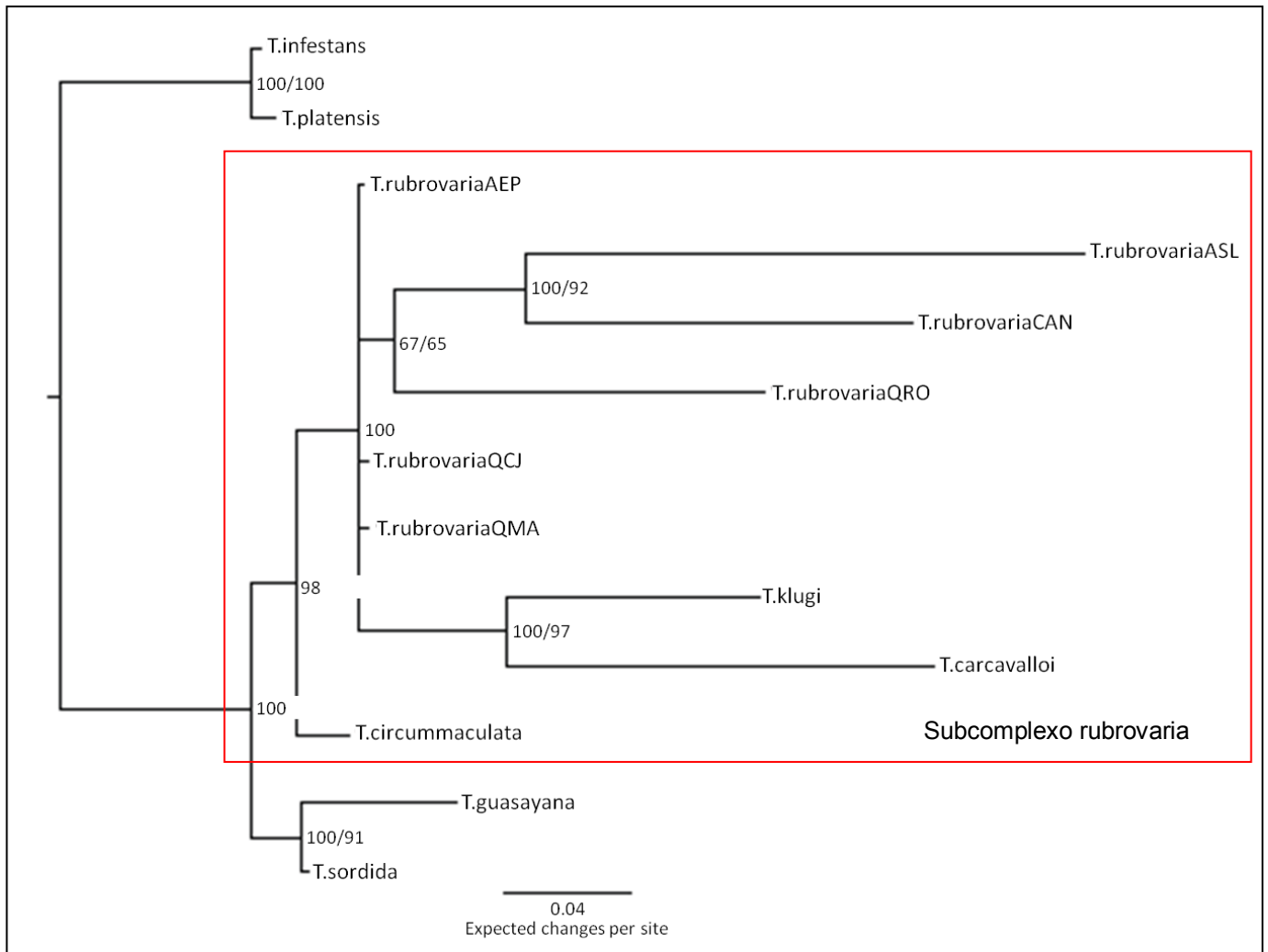
Perfil semelhante de credibilidade se observa entre *T. guasayana* e *T. sordida*, que formam o subcomplexo sordida (PB=100, BT=100); *T. brasiliensis*, *T. brasiliensis melanica*, *T. brasiliensis juazeirensis* e *T. sherlocki* (PB=100, BT=92);, que incluem membros do subcomplexo brasiliensis e entre *T. platensis* e *T. infestans* (PB=100, BT=100), no caso do subcomplexo infestans.

Nesses quatro subcomplexos, de acordo com a topologia apresentada, pode-se sugerir que as espécies em estudo formam grupos monofiléticos.

Também foi realizada a análise bayesiana e de máxima parcimônia para os fragmentos pertencentes ao DNA nuclear ITS-1, ITS-2 e 28S, porém, devido ao baixo número de sequências disponíveis para dar suporte à análise, não foi possível realizar a concatenação desses fragmentos para que se tivesse uma análise mais robusta. A árvore gerada por meio da análise Bayesiana, nas quais são indicados os valores de probabilidade bayesiana (PB) e de bootstrap (BT) estão representadas nas figuras 15, 16 e 17.

RESULTADOS

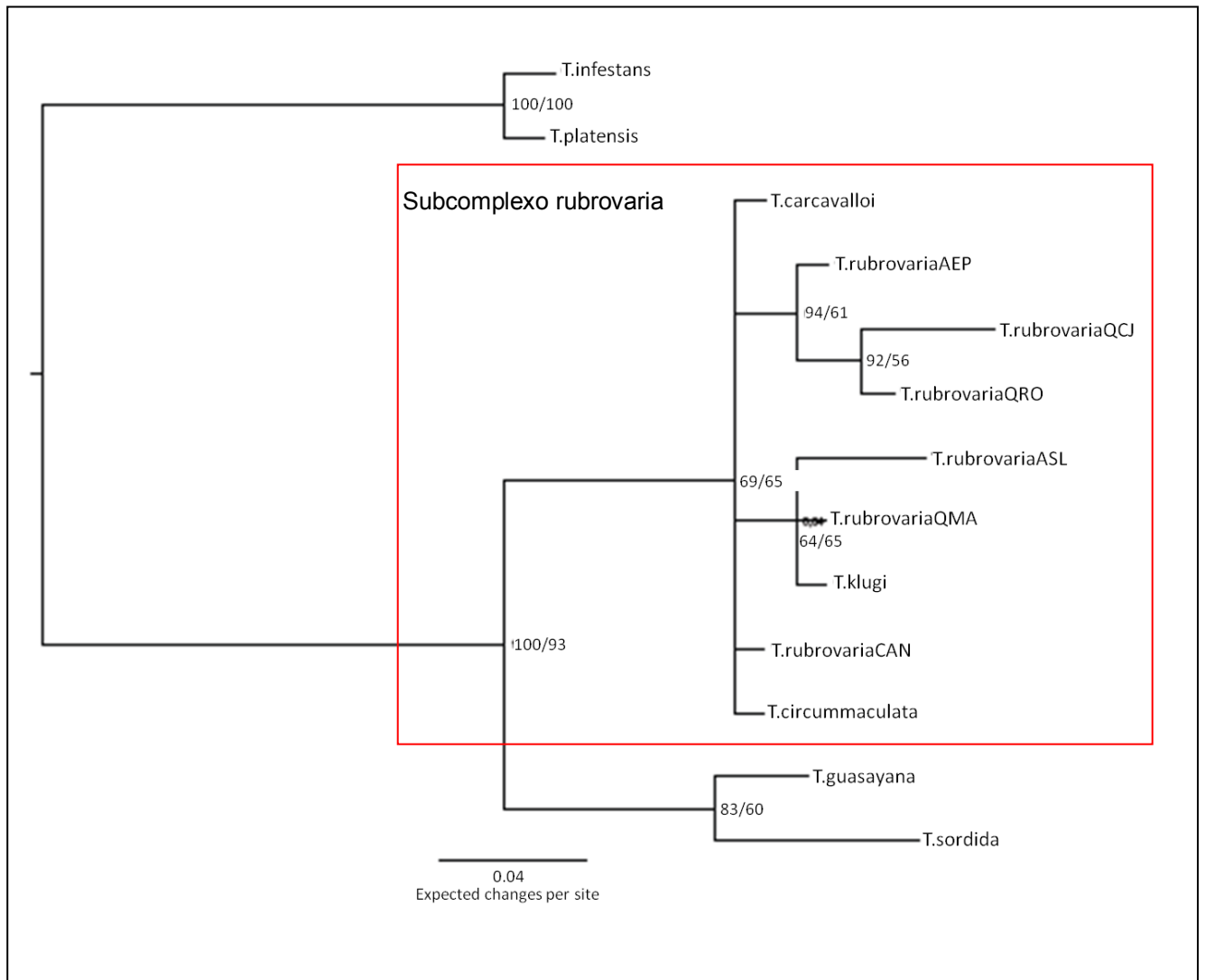
Figura 15: Análise bayesiana dos fragmentos de gene ITS-1 de triatomíneos, com enfoque em táxons do Estado do Rio Grande do Sul - Brasil. Os valores apresentados indicam PB/BT, respectivamente. As procedências estão descritas na Tabela 2.



Fonte: Autor

RESULTADOS

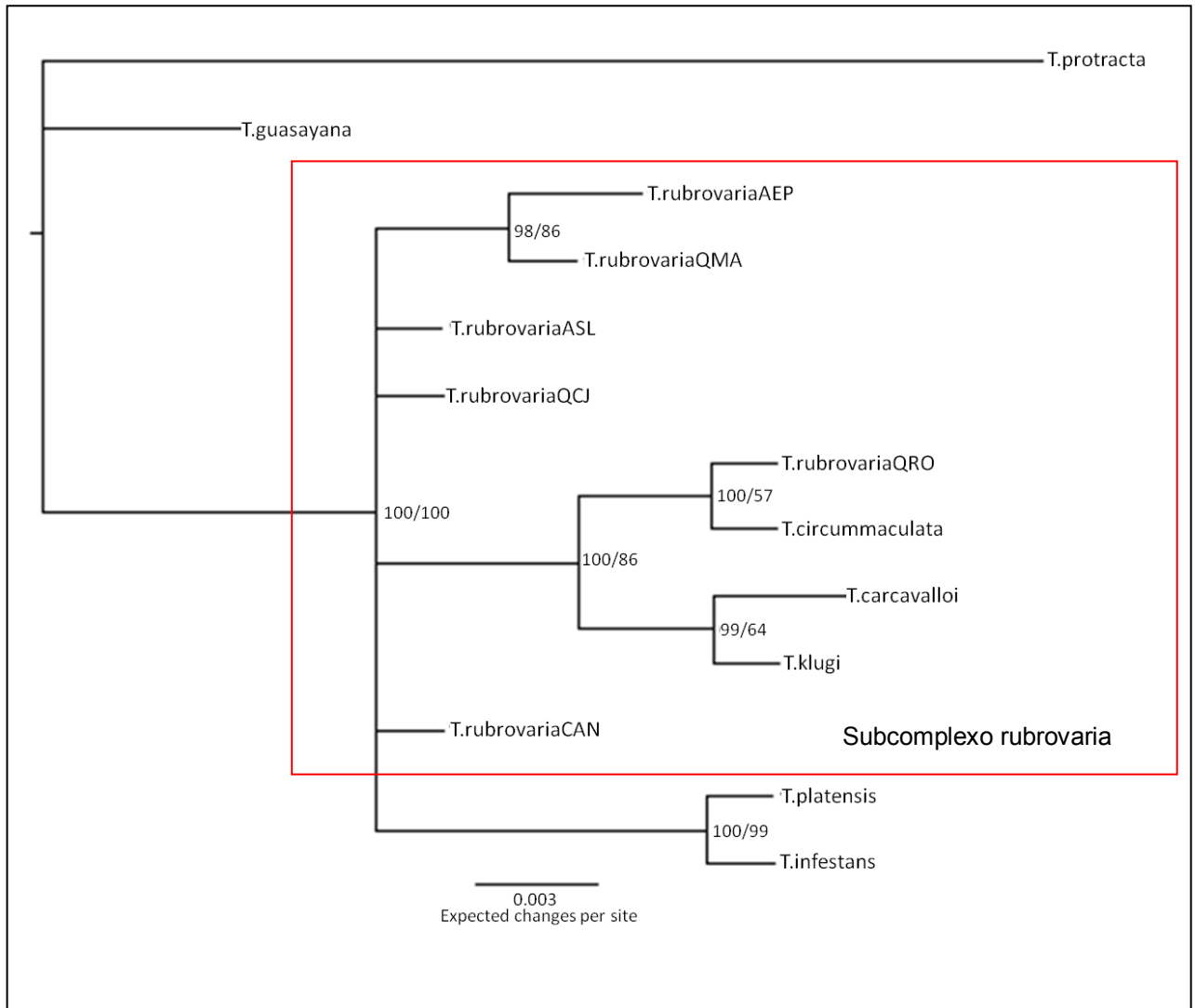
Figura 16: Análise bayesiana dos fragmentos de gene ITS-2 de triatomíneos, com enfoque em táxons do Estado do Rio Grande do Sul - Brasil. Os valores apresentados indicam PB/BT, respectivamente. As procedências estão descritas na Tabela 2.



Fonte: Autor

RESULTADOS

Figura 17: Análise bayesiana dos fragmentos de gene 28S de triatomíneos, com enfoque em táxons do Estado do Rio Grande do Sul - Brasil. Os valores apresentados indicam PB/BT, respectivamente. As procedências estão descritas na Tabela 2.



Fonte: Autor

RESULTADOS

Para os três fragmentos houve o agrupamento das espécies pertencentes ao subcomplexo rubrovaria, porém nem sempre com valores de PB e de bootstrap BT significativos. Isso provavelmente ocorreu devido ao fato de existirem poucas sequências de outros triatomíneos disponíveis no Genbank para dar suporte à análise. Mesmo assim, o resultado está em consonância com os obtidos ao se concatenar o CytB e COI.

5 – DISCUSSÃO

Lent e Wygodzinsky (1979) referem que a subfamília Triatominae é derivada de um predador pertencente à família Reduviidae. Por partir de um ancestral em comum, assumiu-se que pertenciam a um grupo de origem monofilética.

Schaefer (2003) sugere a possibilidade dos triatomíneos terem se originado a partir de diversos predadores pertencentes à família Reduviidae, o que indica a hipótese de origem polifilética ou parafilética.

Schaefer (2005) enfatiza a importância dessa questão, pois isso afeta os parâmetros a serem considerados para se atribuir ou não a existência de uma nova espécie. A hipótese de origem polifilética atualmente é sustentada por diversos autores, como Catalá (1997), Schofield (1988), Ribeiro et al. (1998) e Soares et al. (2000).

Dorn et al (2009), ao utilizar ITS-2 para esclarecer o posicionamento taxonômico de *T. dimidiata*, relata que sua alta taxa de mutação é útil para distinguir espécies e contribui para a descoberta de espécies crípticas, porém a inclusão de vários marcadores moleculares é necessária, como o uso do CytB, para resolver de forma inequívoca inferências taxonômicas.

Garcia et al (2001), ao realizarem análise filogenética com fragmentos de genes pertencentes ao DNA mitocondrial (12S e 16S) de diversas espécies do gênero *Triatoma*, reafirma a monofilia de espécies do complexo infestans juntamente com *T. circummaculata*, baseada em índices de *bootstrap* obtidos por máxima parcimônia.

T. rubrovaria apresenta diversos padrões cromáticos de pronoto, sendo estas variações não relacionadas com a distribuição geográfica (LENT, 1942; LENT;

WYGODZINSKI, 1979). Tal polimorfismo foi reafirmado por Almeida et al (2002) que, ao estudar padrão isoenzimático de populações de *T. rubrovaria*, identificou a existência de indivíduos com diferentes padrões cromáticos provenientes da mesma população geográfica e sem diferenciação genética.

Tal perfil de variação cromática também é observadas em *T. circummaculata* (Stal, 1859) e ambas as espécies são encontradas frequentemente coabitando o mesmo ecótopo (LENT;WYGODZINSKI,1979). Baseado em características morfológicas, *T. circummaculata* foi alocado no "complexo circummaculata", que era composto por *T. circummaculata* e *T. limai*, não apresentando subcomplexo (DUJARDIN et al. 2002). Por meio de análises filogenéticas com fragmentos de genes pertencentes ao DNA mitocondrial, *T. rubrovaria* e *T. circummaculata* aparecem como espécies estreitamente relacionadas (GARCÍA; POWELL, 1998; GARCÍA et al., 2001; SAINZ et al., 2004), o que ressalta a importância da associação de metodologias distintas de estudo para a definição e agrupamento de espécies.

Triatoma carcavallo foi descrita como espécie relacionada à *T. rubrovaria* e *T. circummaculata*, tendo como base seus aspectos cromáticos e distribuição geográfica (JURBERG et al., 2008). A análise filogenética por meio de fragmentos de genes mitocondriais (12S e COI) apresentou um perfil de clados que corroboram tais achados anteriores (ALMEIDA et al., 2009).

Tritoma klugi, ao ser descrita, foi agrupada com base em características morfológicas como membro do complexo oliveirai, sendo posteriormente reposicionada no subcomplexo "rubrovaria", juntamente com *T. carcavallo*, *T. klugi*, *T. limai*, *T. oliverai* e *T.rubrovaria*. O reposicionamento ocorreu após estudo e revisão da classificação e evolução dos triatomíneos feitos por Schofield e Galvão

(2009), que também levou ao reposicionamento de *T. circummaculata* no subcomplexo “rubrovaria”.

Os resultados obtidos no presente estudo corroboram os de Schofield e Galvão (2009) e de Almeida et al., (2009), cuja análise filogenética mostrou o posicionamento de *T. circummaculata* e *T. klugi* no subcomplexo rubrovaria. As avaliações, por meio de análises Bayesiana e de máxima parcimônia, indicam *T. carcavallo* em posição basal no subcomplexo rubrovaria, apresentando-se como espécie irmã do grupo formado por *T. circummaculata*, *T. klugi* e *T. rubrovaria*. Também foi verificado que *T. carcavallo* apresenta-se em posição basal no subcomplexo rubrovaria, sendo na verdade, espécie irmã do grupo formado por *T. klugi* + *T. rubrovaria* + *T. circummaculata*.

Almeida et al. (2002), ao estudar populações de *T. rubrovaria* por meio de isoenzimas e padrão cromático, levantam a hipótese da existência de uma população isolada e distinta das demais estudadas. Como as isoenzimas inicialmente apontaram a população proveniente do município de Santiago como a mais diferenciada, os demais estudos, utilizando outros marcadores (genes nucleares ITS e RAPD) foram direcionados a esclarecer essa variação. Resultados obtidos por Pacheco et al., (2003; 2007), por meio de RAPD com os marcadores ITS-1 e ITS-2, corroboraram os resultados obtidos por isoenzimas. Entretanto, neste estudo a população de *T. rubrovaria* de Canguçu emergiu como a mais diferenciada.

Monteiro et al. (2010), ao levantar e discutir estudos de genética de populações de triatomíneos, definem complexo de espécie como sendo “um grupo de espécies intimamente relacionadas e semelhantes morfológicamente” e espécies crípticas como sendo espécies morfológicamente semelhantes e que se reproduzem isoladamente”. Diante do exposto, a topografia da árvore sugere que *T. rubrovaria*

seja um complexo de espécies, uma vez que exemplares oriundos de Canguçu, apesar de apresentarem morfologia idêntica aos das demais procedências (dados não apresentados), apresenta-se isolado das demais populações de *T. rubrovaria*.

Costa et al. (2003), ao estudarem populações de *T. brasiliensis*, sugere a realização de experimentos de cruzamento entre espécies e populações poderão ser úteis para esclarecer e viabilizar inferências filogenéticas e as compatibilidades para reprodução entre os taxa. Almeida et al., (2009) sugere que se adote o mesmo procedimento para *T. rubrovaria*, *T. carcavalloii* e *T. circummaculata*.

Os resultados obtidos indicam que sejam realizadas novas coletas de populações de *T. rubrovaria* de Canguçu e de outras procedências, permitindo assim verificar se a polifilia e a formação de espécies crípticas são mantidas. Tendo em vista que a utilização de apenas uma metodologia de estudo é insuficiente para a definição de espécies crípticas, sugere-se o aprofundamento dos estudos com exemplares de *T. rubrovaria* coletados em Canguçu por meio de estudos morfológicos, citogenéticos, cruzamento entre populações e análise de marcadores nucleares. Ainda merece ser ressaltado que o sequenciamento e análise de espécies de outros complexos e subcomplexos deverão ser realizados, uma vez que existem poucas sequências disponíveis no Genbank para dar suporte à análise.

O presente estudo reafirma a necessidade de associação de metodologias distintas para que se possa entender melhor a relação entre essas espécies de Triatominae, que coabitam habitats semelhantes, além de termos aqui encontrado uma forte evidência de que *T. rubrovaria* não seria uma espécie única, e sim um conjunto espécies crípticas.

6. CONCLUSÃO

- Os marcadores pertencentes ao DNA mitocondrial CytB e COI, devido ao seu polimorfismo, mostraram-se marcadores eficientes para a concatenação de dados e análise bayesiana;
- Os marcadores pertencentes ao DNA nuclear ITS-1, ITS-2 e 28S são menos polimórficos, o que os tornam menos eficazes para a utilização em análises filogenéticas;
- *T. circummaculata*, *T. klugi* e *T. carcavalloii* foram reconfirmados como espécies pertencentes ao subcomplexo rubrovaria;
- *T. carcavalloii* se posiciona como espécie irmã de *T. klugi*, sendo esta afirmação consistente para os genes 28S e ITS-1.
- *T. rubrovaria* apresenta-se como um conjunto de espécies crípticas, sendo a população oriunda de Canguçu distinta das de Quarai (localidades de Cerro do Jarau, Macarrão e Rosada) e de Alegrete (localidades de Estrada dos Pinheiros e Salso).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD-FRANCH, F.; MONTEIRO, F.A. Molecular research and the control of Chagas disease vectors. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, n.77, v.3, p.437-54, 2005.

ALMEIDA, C.E.; PACHECO, R.S.; NOIREAU, F. COSTA, J. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera: Reduviidae) I: isoenzymatic and chromatic patterns of five populations from the State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n.6, p.829-34, 2002.

ALMEIDA, C.E.; MARCET, P.L.; GUMIEL, M; TAKIYA, D.M.; CARDOZO-DE-ALMEIDA, M.; PACHECO, R.S.; LOPES, C.M.; DOTSON, E.M.; COSTA, J. Phylogenetic and phenotypic relationships among *Triatoma carcavalloei* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) and related species collected in domiciles in Rio Grande do Sul State, Brazil. **Journal of Vector Ecology**, v.34, n.2, p.164- 173, 2009.

AVISE, J.A.; ARNOLD, J.; BALL, R.M.; BERNINGHAM, E.; NEIGEL, J.E.; REEB, C.A.; SAUNDERS, N.C. Intraspecific phylo-geography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v.18, p.489-522, 1987.

BARGUES, M. D.; MAS-COMA, S. Phylogenetic Analysis of Lymnaeid Snails Based on 18S rDNA Sequences. **Molecular Biology and Evolution**, v.14, n.5, 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. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n.1, p.159-164, 2002.

BARRETTO, M. P. Epidemiologia. IN: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A. (eds). **Trypanossoma cruzi e Doença de Chagas**. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan Ed, pp 89-291, 1979.

BÉRENGER, J.M.; BLANCHET, D. A new species of the genus *Panstrogylus* from French Guiana (Heteroptera, Reduviidae, Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, V.102, n.6, p.733-736, 2007.

CHAGAS, C. Nova Tripanozomíase humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.1, p.159 – 218, 1909.

COLEMAN, A. W. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. **Trends in Genetics** v.19, n.7, p. 370-75, 2003.

CARCAVALLO, R.U.; JURBEG, J.L.; HERMAN ET AL. Nova espécie do complexo *oliveirai* - (nova denominação para o complexo *matogrossensis*) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.96, n.1, p.71-79. 2001.

Catalá, S. (1997). Antennal sensilla of Triatominae Hemiptera Reduviidae. A comparative study of five genera. **International Journal of Insect Morphology and Embriology**, v.26, 67–73.

COSTA, J.; ALMEIDA, C.E.; DUJARDIN, J. P.; BEARD, C. B. Crossing Experiments Detect Genetic Incompatibility among Populations of *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, p.637-639, 2003.

COSTA, J.; ARGOLO, A.; FELIX, M. Redescription of *Triatoma melanica* Neiva; Lent, 1941, new status (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Zootaxa**, V.1385, p.47-58, 2006.

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

COURA, J. R. & VINAS, P. A. (2010). Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v.465, n.7301, p.S6–S7.

DIAS, J.C.P.; BORGES DIAS, R. Housing and the control of vectors of human Chagas' disease in the State of Minas Gerais, Brazil. **Bulletin of the Pan American Health Organization**, v.16, p.117-29, 1982.

DIAS, J. C. P. Epidemiologia. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. ***Tripanossoma cruzi e Doença de Chagas***. 2ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 431p., 2000.

DIAS, J. C. P.; PRATA, A.; SCHOFIELD, C. J. Doença de Chagas na Amazônia: esboço da situação atual e perspectivas de prevenção. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35, n.6, p.669-678, 2002.

DORN, P.L., CALDERON, C., MELGAR, S., MOGUEL, B., SOLORZANO, E., DUMONTEIL, E., RODAS, A., DE LA RUA, N., GARNICA, R., MONROY C. (2009). Two distinct *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) taxa are found in sympatry in Guatemala and Mexico. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v.3, n.3, p. e393, 2009.

DUJARDIN, J.P., C.J. SCHOFIELD, AND F. PANZERA. 2002. **Les Vecteurs de la maladie de Chagas**. Recherches taxonomiques, biologiques et génétiques. Académie Royale des Sciences d'Outre Mer. Bruxelles, Belgique. 162 p.

FORERO, D., WEIRAUCH, C.; BAENA, M. Synonymy of the reduviid (Hemiptera: Heteroptera) genus *Torrealbaia* (Triatominae) with *Amphibolus* (Harpactorinae), with notes on *Amphibolus venator* (Klug, 1830) **Zootaxa**, v.670, p.1-12, 2004.

FUTUYMA, D. J. **Biologia evolutiva**, Trad. de Mário Vivo e coord. de Fabio de Melo Sene. 2ª Ed. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética/CNPq, 646p., 1992

GALVÃO, C.; ÂNGULO, V.M. *Belminus corredori*, a new species of Bolboderini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from Santander, Colombia. **Zootaxa**, v.1241, n.61-68, 2006.

GALVÃO, C.; CARCAVALLO, R.; ROCHA, D. S., JURBERG, J. A. Checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. **Zootaxa**, v.202, p.1-36, 2003.

GARCIA, B. A.; MORIYAMA, E. N., POWELL, J. R. Mitochondrial DNA sequences of Triatomines (Hemiptera: Reduviidae): Phylogenetic relationships. **Entomological Society of America**, v.38, n.5, 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.232-8, 1998.

GASSER, R. B., AND H. HOSTE. Genetic markers for closely related parasitic nematodes. **Molecular and Cellular Probes**, v.9, p.315-320, 1996.

GASPARICH, G. E.; SHEPPARD, W. S.; HAN, H. Y.; McPERON, B. A.; STECK, G. J. Analysis of mitochondrial DNA and development of PCR-based diagnostic molecular markers for Mediterranean fruit fly (*Ceratitidis capitata*) populations. **Insect Molecular Biology**, v.4, p.61-67, 1995.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v.41, p.95 – 98, 1999.

HYPSA, V.; TIETZ, D.F.; ZRZAVÝ, J.; REGO, R.O.M.; 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.447-57, 2002.

LEHMANN, T.; BLACKSTON, C. R.; BESANSKY, N. J.; ESCALANTE, A. A.; COLLINS, F. H.; HAWLEY, W. A. The Rift Valley complex as a barrier to gene flow for *Anopheles gambiae* in Kenya: the mtDNA perspective. **Journal of Heredity**, v.91, p.165-8, 2000.

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.

LENT, H. Estudos sobre os Triatomídeos do Estado do Rio Grande do Sul, com descrição de uma espécie nova. **Revista Brasileira de Biologia**, v.2, n.2, p.219-231, 1942.

LENT, H.; JURBERG, J.; GALVÃO, C. *Rhodnius stali* n. Sp. afim de *Rhodnius pictipes* Stal, 1872 (Hemiptera: Reduviidae, Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.88, p.605-14, 1993.

LENT, H. Evolução dos conhecimentos sobre vetores da doença de Chagas 90 anos após sua descoberta. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.94, n.1, p.89-92, 1999.

LYMAN, D. F., MONTEIRO, F.A., ESCALANTE, A.A.; CORDON-ROSALES, C.; WESSON, D.M.; DUJARDIN, J.P.; . BEARD, C.B. Mitochondrial DNA sequence variation among triatomine vectors of Chagas disease. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.60, p.377-386, 1999.

JI, Y.J., Zhang, D.X and He, L.J.. Evolutionary conservation and versatility of a new set of primers for amplifying the ribosomal internal transcribed spacer regions in insects and other invertebrates. **Molecular Ecology**, v.3, p.581-585, 2003.

JURBERG, J.; ROCHA, D. S.; LOROSA, E. S.; VINHAES, M.; LENT, H. . Uma nova espécie de *Triatoma* do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil (Hemiptera, Reduviidae). **Entomologia y Vectores**, v. 5, n. 6, p. 295-310, 1998.

JURBERG, J., GALVÃO, C., SANTOS, C. M. DOS. & RANGEL, M. B. A. Descrição de ovos e estádios ninfais de *Triatoma carcavallo* (Hemiptera, Reduviidae) por meio de microscopia óptica. **Iheringia. Série Zoologia**, v.98, n.4, p.441-446, 2008.

JURBERG, J., ROCHA, D.S., GALVÃO, C. *Rhodnius zeledoni* sp. nov. afim de *Rhodnius paraensis* Sherlock, Guitton; Miles, 1977 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Biota Neotropical**, v.9, n.1, 2009.

LYMAN DF, MONTEIRO FA, ESCALANTE AA, CORDON-ROSALES C, WESSON DM, DUJARDIN JP, BEARD CB. Mitochondrial DNA sequence variation among triatomine vectors of Chagas' disease. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.60, n.3, p.377-386, 1999.

MARCILLA, A., BARGUES, M.D., ABAD-FRANCH F., PANZERA, F., CARCAVALLO, R.U., NOIREAU, F., GALVÃO, C., JURBERG, J., MILES, M.A., DUJARDIN, J.P., MAS-COMA, S. Nuclear rDNA ITS-2 sequences reveal polyphyly of *Panstrongylus* species (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), vectors of *Trypanosoma cruzi*. **Infection, Genetics and Evolution**, v.1, p.225-235, 2002.

MARTÍNEZ, E; CHÁVEZ, T.; SOSSA, D.; ARANDA, R.; VARGAS, B.; VIDAURRE, P. *Triatoma boliviana* sp. n. de los valles subandinos de La Paz, Bolivia (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), similar a *Triatoma nigromaculata* Stål, 1859. **Boletín del Instituto de Investigación em Salud y Desarrollo**, v.3, p.1-10, 2007.

MARTINS, L. P. A., CASTANHO, R. E. P., CASANOVA, C., CARAVELAS, D. T., FRIAS, G. T., RUAS-NETO, A. L.; ROSA, J. A. Triatomíneos rupestres infectados por Trypanosomatidae coletados em Quaraí, Rio Grande do Sul, 2003. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, n.2, p.198-202. 2006.

MILES, M. A. The discovery of Chagas disease: progress and prejudice. **Infectious Disease Clinics of North America**, v.18, n.2, p.247–260, 2004.

MONTEIRO, F. A. WESSON, D.M., DOTSON, E.M., SCHOFIELD, C. J. AND 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.; ESCALANTE, A.; BEARD, C. B. Molecular tools and triatomine systematics: a public health perspective. **Trends in Parasitology**, v.17, n.7, p.344-347, 2001.

MONTEIRO, F.A.; BARRETT, T.V.; FITZPATRICK, S.;CORDON-ROSALES, C.; FELICIANGELI, D.; BEARD, C. B. Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. **Molecular Ecology**, v.12, n.4, p.997-1006, 2003.

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

MONTEIRO, F. A., MARCET, P.L., DORN, P. (2010). **Population Genetics of Triatomines**. In: Telleria; Tibayrenc. (Org.). *American Trypanosomiases, Chagas Disease - One hundred years of research*. Burlington, MA, USA: Elsevier, v.1, p.1-871.

NAEGELE, M. P.; DA COSTA, P. I.; ROSA, J. A. DA . Polymorphism of the ITS-2 region of the Ribosomal DNA of the Triatominae *Rhodnius domesticus*, *R. pictipes*, *R. prolixus* and *R. stali*. **Medical and Veterinary Entomology**, v.20, n.4, p. 353–357, 2006.

NYLANDER, J.A.A., RONQUIST, F., HUELSENBECK, J.P. & NIEVES, ALDREY, J.L. Bayesian phylogenetic analysis of combined data. **Systematic Biology**, v.53, p.47–67, 2004.

OBARA, M. T.; BARATA, J. M. S.; ROSA, J. A.; CERETTI JUNIOR, W.; ALMEIDA, P. S.; GONCALVES, G. A.; DALE, C.; GONCALVES, R. G. Description of the female and new records of *Triatoma baratai* Carcavallo & Jurberg, 2000 (Hemiptera, Reduviidae) from Mato Grosso do Sul, Brazil, with a key to the species of the *Triatoma matogrossensis* subcomplex. **Zootaxa** v. 3151, p. 63-68, 2012.

PACHECO, R.S., ALMEIDA, C.E., KLISIOWICZ, 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 RS, ALMEIDA CE, COSTA J, KLISIEWICZ DR, MAS-COMA S, BARGUES MD. RAPD analyses and rDNA intergenic-spacer sequences discriminate Brazilian populations of *Triatoma rubrovaria* (Reduviidae: Triatominae). **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.97, n.7, p.757-768, 2003.

PFEILER E.; BITLER B.G.; RAMSEY J.M.; PALACIOS-CARDIEL C.; MARKOW T.A. Genetic variation, population structure, and phylogenetic relationships of *Triatoma rubida* and *T. recurva* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the Sonoran desert, insect vectors of the Chagas' disease parasite *Trypanosoma cruzi*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.41, p.209-221, 2006.

POINAR, G. JR. *Triatoma dominicana* sp. n (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) and *Trypanosoma antiquus* sp. n. (Stercovaria, Trypanosomatidae). The first fossil evidence of a triatominae-tripanosomatid vector association. **Vector Borne Zoonotic Diseases**, v.5, p.72–81, 2005.

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, n.2, p.178–188, 1996.

RIBEIRO, J.M., SCHNEIDER, M., ISAIAS, T., JURBERG, J., GALVÃO, C., GUIMARÃES, J.A. Role of salivary antihemostatic components in blood feeding by triatomine bugs (Heteroptera). **Journal of Medical Entomology**, v.35, p.599–610, 1998.

ROSA, J.A. da, BARATA, J.M.S., SANTOS, J.L.F.; CILENSE, M.. Morfologia de ovos de *Triatoma circummaculata* e *Triatoma rubrovaria* (Hemiptera, Reduviidae). **Revista de Saúde Pública**, v.34, n.5, p.538-542, 2000.

ROSA, J. A., ROCHA, C. S., GARDIM, S., PINTO, M. C., MENDONÇA, V. J., FERREIRA FILHO, J. C. R., CARVALHO, E.O.C, CAMARGO, L. M. A., OLIVEIRA, J., NASCIMENTO, J.D., CILENSE, M., ALMEIDA, C.E. Description of *Rhodnius montenegrensis* n. sp. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the state of Rondônia, Brazil. **Zootaxa**, v.3478, p. 62-76, 2012.

RUAS-NETO, A.L.; CORSEUIL, E. Hábitos, distribuição geográfica e potencialidade dos triatomíneos rupestres como vetores da doença de Chagas no Rio Grande do Sul, Brasil (Hemiptera, Reduviidae: Triatominae). **Entomologia y Vectores**, v.9, p.231-249, 2002.

SAINZ, A.C., MAURO, L.V., MORIYAMA, E.N., GARCÍA, B.A. Phylogeny of triatomine vectors of *Trypanosoma cruzi* suggested by mitochondrial DNA sequences. **Genetica**, v.121, p.229–240, 2004.

SANDOVAL, C. M.; PABÓN, E., JURBERG, J.; GALVÃO, C. *Belminus ferroae* n. sp. from the Colombia north-east, with a key to the species of the genus (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Zootaxa**, v.1443, p.55-64, 2007.

SCHAEFER, C.W. Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): systematic questions and some others **Neotropical Entomology**, v.32, p.1–10, 2003.

SCHAEFER, C.W. Why are the subfamily relationships of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) important? **Entomologia y Vectores**, v.12, p.19–35, 2005.

SILVEIRA, A.C. Epidemiologia e controle da doença de Chagas. **Cadernos de Saúde Pública**, v.1, p.212-218, 1983.

SILVEIRA, A. C.; REZENDE, D. F. Epidemiologia e controle da transmissão vetorial da doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.27, p.11-22, 1994.

SILVEIRA, A. C. & DIAS, J. C. P. O controle da transmissão vetorial. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.44, p.52–63, 2011.

SCHOFIELD, C.J. **The biosystematics of Triatominae**. M.W. Service (Ed.), Biosystematics of Haematophagous Insects, Clarendon press, Oxford, UK, **37**, 284–312, 1988.

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

SOARES, R.P., SANT'ANNA, M.R., GONTIJO, N.F., ROMANHA, A.J., DIOTAIUTI, L., PEREIRA, M.H. Identification of morphologically similar *Rhodnius* species (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) by electrophoresis of salivary heme proteins. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.62, p.157–161, 2000.

SOUZA, A. G.; VALÉRIO-WANDERLEY, D. M.; BURALLI, G. M.; ANDRADE, J. C. R. Consolidation of the control of Chagas' disease in the state of São Paulo. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **79**:125-131. 1984.

VENTURA, M.; ELLI, M.; RENIERO, R.; ZINK, R. Molecular microbial analysis of *Bifidobacterium* isolates from different environments by the species-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). **FEMS Microbiology Ecology**, v.36, n.2-3, p.113-121. 2001.

VINHAES, M. C.; DIAS, J. C. P. Doença de Chagas no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.16, n.2, p.7- 12, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease (American tripanosomiasis). Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>>. Acesso em 20 out . 2012.

XIONG, B.; KOCHER, T. D. Comparison of mitochondrial DNA sequences of seven morphospecies of black flies (Diptera: Simuliidae). **Genome**, v.34, p.306-311, 1991.

ZHANG, D. X.; SZYMURA, J. M.; HEWITT, G. M. Evolution and structural conservation of the control region of insect mitochondrial DNA. **Journal of Molecular Evolution**, v.40, p.382-391, 1995.

CAPÍTULO II

**Cryptic species within the *Triatoma rubrovaria* complex revealed by
mitochondrial DNA analysis**

Short title: Cryptic species *T. rubrovaria*

C. S. Rocha¹, C. E. Almeida¹, S. Gardim¹, F. de Mello², R. M. B. Cicarelli¹ and J. A. da Rosa¹

¹Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP), Araraquara, SP, Brazil and

² Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, Instituto de Pesquisas Biológicas-Laboratório Central, Rio Grande do Sul, RS, Brazil.

Abstract

Triatoma rubrovaria is considered an important vector of Chagas disease in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. After the implementation of a program to combat *T. infestans*, more specimens of *T. rubrovaria* were captured and more colonies were found inside homes. It lives in holes and cracks in rocky places along with *T. carcavalloei*, *T. circummaculata* and *T. klugi*. Analysis of fragments of genes belonging to mtDNA has been used in order to establish the genetic structure of populations and the phylogenetic relationships among them, which will make it possible to identify species complexes or cryptic species. Bayesian analysis using CytB and COI sequences reinforces the placement of these species in the *rubrovaria* subcomplex and suggests that *T. rubrovaria* populations from six locations are potential cryptic species, in view of the topology found. This study contributes to the understanding of both the taxonomy of *T. rubrovaria* populations and their phylogeny.

Key words: *T. rubrovaria*, CytB, COI, phylogeny, cryptic species.

Correspondence: Cláudia S. Rocha – UNESP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Campus de Araraquara. Rod. Araraquara-Jau, km 01 – CEP 14801-940. Fax +55(16)3301-6940; E-mail: rochacs26@gmail.com

Introduction

When Chagas described the protozoan *Trypanosoma cruzi* and American trypanosomiasis, later called Chagas disease, he identified all the epidemiological chain of that disease, i.e., its mechanism of transmission, vector, etiologic agent, manifestation in humans, and natural breeding grounds (Chagas, 1909). It is estimated that 10 million people, mostly in Latin America, are infected with *Trypanosoma cruzi*, which is transmitted mainly through triatomine stool (WHO, 2010). It is accepted that vector control is the most efficient means to prevent and combat the spread of the disease, as there is neither a vaccine nor an efficient drug treatment to cure chronic-phase patients (Dias *et al.*, 2002; Miles, 2004; Coura & Vinas, 2010).

The subfamily Triatominae comprises 146 species, divided into 18 genera and five tribes (Lent & Wygodzinsky, 1979; Galvão *et al.*, 2003; Forero *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2006; Costa & Felix, 2007; Schofield & Galvão, 2009; Frías-Lasserre, 2010; Silveira & Dias, 2011; Rosa *et al.*, 2012). The genus *Triatoma* is the most representative with 80 species described, which are grouped into eight complexes and eight subcomplexes, a classification that is based mainly on morphological characteristics (Schofield & Galvão, 2009). One of such species is *Triatoma*

rubrovaria (Blanchard, 1843), which is found in holes and cracks in rocky places where most rocks are granites or arenites. It feeds from the blood of several vertebrates, especially rodents, thus maintaining the sylvatic cycle of the flagellate *T. cruzi* (Rosa *et al.*, 2000; Almeida *et al.*, 2002; Martins *et al.*, 2006).

Even after the implementation of a program to combat *Triatoma infestans*, as part of an initiative from the countries of the Southern Cone (INCOSUL/Chagas) taken in 1992, there was a rise in both the number of *T. rubrovaria* specimens captured and the number of colonies found in homes in the state of Rio Grande do Sul, Brazil (Almeida *et al.*, 2000; Silveira & Dias, 2011).

T. rubrovaria is found along with the species *T. carcavalloei* (Jurberg, Rocha, Lorosa, Vinhaes & Lent, 1998), *T. circummaculata* (Stal, 1859) and *T. klugi* (Carcavallo *et al.*, 2001), all of them belonging to the *rubrovaria* subcomplex and occurring in sympatry in the same ecotope in Rio Grande do Sul, Brazil (Lent & Wygodzinsky, 1979; Almeida *et al.*, 2002; Almeida *et al.*, 2009; Schofield & Galvão, 2009).

Species overlapping in geographic distribution or even those having ill-defined limits are sometimes subjected to ecological pressures, and it is not yet clear if the morphological similarities among them are the result of evolutionary convergences caused by ecological pressures. For that reason, cytochrome b (CytB) and cytochrome oxidase 1 (COI) sequences, which belong to mitochondrial DNA, were used to evaluate the phylogenetic relationships among six *Triatoma* species that occur in Rio Grande do Sul, Brazil.

Material and Methods

Triatomines

T. carcavalloei, *T. circummaculata*, *T. guasayana*, *T. klugi*, *T. platensis*, and *T. rubrovaria* specimens kept at the Triatominae Insectarium of the Faculty of Pharmaceutical Sciences/Unesp/Araraquara were used. Their provenience and the dates when they were collected are shown in Table 1. To enhance the phylogenetic analysis, other triatomine species whose sequences are available at GenBank were used (Table 2).

DNA extraction and sequencing

Genomic DNA extraction was performed as suggested by Bargues & Mas-Coma (1997), and a NanoDrop[®]2000 Thermo Scientific[®] spectrophotometer was used to estimate the concentration. Fragments of CytB and COI genes were amplified using primers under the conditions described by Monteiro *et al.* (2003) and Pfeiler *et al.* (2006), respectively. DNA purification was carried out using NucleoSpin[®] Extract II Kits Macherey-Nagel GmbH & Co. KG.

The purified products were subjected to sequencing reaction with a DYEnamic ET[®] (GE Healthcare Life Sciences) kit and processed on a MegaBACE 1000[®] (GE Healthcare Life Sciences) sequencer.

The sequences were edited and aligned using the BioEdit 7.0.5 and ClustalW softwares, respectively (Hall, 1999). The MrBayes 3.1 software (Huelsenbeck & Ronquist, 2001) was used for the phylogenetic analysis with gene concatenation in Bayesian inference, adopting a mixed approach model. Other species, such as *Triatoma platensis*, were added to the analysis (Table 1 and 2).

Phylogenetic analysis

The best evolutionary model indicated by the MrModeltest software (Nylander, 2004) was applied so as to provide the phylogenetic reconstruction of the taxa under study. Bayesian analysis was carried out with two independent runs of four Markov chains for 1,000,000 generations, from which 2,000 trees were sampled (500/generation), the mean frequency standard at the end of the run being 0.005.

To summarize the information, about the first 25% of the sample obtained during the first generations were discarded. That percentage represents the initial samplings obtained before the analysis stabilization. *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) was used as out group for all analyses. Bayesian probabilities (BP) of later clades were calculated using consensus.

An analysis using maximum parsimony was carried out. One thousand replicates were used, and bootstrap values were estimated in 1,000 pseudoreplicates.

Results

To make the phylogenetic analysis possible, *T. rubrovaria* specimens from six different places in the cities of Alegrete (Pinheiros Highway and Salso), Canguçu and Quaraí (Cerro do Jarau, Macarrão and Rosada), as well as specimens of the populations of *T. carcavalloii*, *T. circummaculata*, *T. guasayana*, *T. klugi*, and *T. platensis*.

A total of 66 sequencing reactions were performed, *forward* and *reverse* reactions being analyzed independently. They were later aligned to confirm the consistency of the data. The products obtained generated a 607pb fragment for CytB and a 624pb fragment for COI.

Sequences obtained from fragments of CytB and COI genes were aligned with sequences of other triatomines available at GenBank® (Table 2), which generated a 444pb fragment for CytB and a 576pb fragment for COI.

By concatenating the fragments of CytB and COI and carrying out a new alignment, 1012 base pairs were obtained, including gaps.

By means of a Bayesian analysis of the concatenated data of CytB and COI, a tree whose topology consists of four well-defined clades that group the species into the subcomplexes they belong to was obtained. In that tree the Bayesian probability (BP) and bootstrap (BT) values are indicated (Figure 1).

T. rubrovaria specimens from Alegrete, Canguçu and Quaraí (Cerro do Jarau, Macarrão, Rosada and Salso), as well as *T. circummaculata*, *T. carcavalloii* and *T. klugi* specimens, were placed in the same clade with high credibility values (PB=99, BT=68), forming the rubrovaria subcomplex.

A similar credibility profile was observed between *T. guasayana* and *T. sordida*, which form the sordida subcomplex (PB=100, BT=100); among *T. brasiliensis*, *T. brasiliensis melanica*, *T. brasiliensis juazeirensis* and *T. sherlocki* (PB=100, BT=92), which include members of the brasiliensis subcomplex; and between *T. platensis* and *T. infestans* (PB=100, BT=100), in the case of the infestans subcomplex.

In those four subcomplexes, according to the topology, it can be suggested that the species under study form monophyletic groups.

Discussion

Lent and Wygodzinsky (1979) refer that the subfamily Triatominae derives from a predator belonging to the family Reduviidae. Because of this common ancestor, it was assumed that they belonged to a group of monophyletic origin.

Schaefer (2003) indicates the possibility of triatomines having originated from various predators belonging to the family Reduviidae, which raises the hypothesis of monophyletic or paraphyletic origin.

Schaefer (2005) points out the importance of the issue, because it affects the parameters to be considered in deciding whether there is a new species or not. The hypothesis of polyphyletic origin is currently supported by many authors, including Catalá (1997); Schofield (1988); Ribeiro *et al.*, 1998 and Soares *et al.*, 2000.

Garcia *et al.* (2001), when carrying out a phylogenetic analysis with fragments of mitochondrial DNA genes (12S e 16S) from various species of *Triatoma*, restate that species of the infestans complex are monophyletic, just as *T. circummaculata*, based on bootstrap indices obtained by maximum parsimony.

T. rubrovaria presents many chromatic patterns in the pronotum, which are not related to its geographic distribution (Lent, 1942; Lent & Wygodzinski, 1979). That polymorphism was also observed by Almeida *et al.* (2002), who studied the isoenzyme pattern of *T. rubrovaria* populations and identified specimens with different chromatic patterns coming from the same geographic population and having no genetic differences.

Chromatic variation is also observed in *T. circummaculata*, and both species are frequently found in the same ecotope (Lent & Wygodzinski, 1979). In view of its morphological characteristics, *T. circummaculata* was placed in the circummaculata

complex, which consisted of *T. circummaculata* and *T. limai*, in subcomplex (Dujardin *et al.*, 2002). Phylogenetic analyses with fragments of mitochondrial DNA genes indicate that *T. rubrovaria* and *T. circummaculata* are closely related species (García & Powell, 1998, García *et al.*, 2001, Sainz *et al.*, 2004), whereupon the importance of combining different methodologies to define and group species.

Triatoma carcavalloi was described as cognate with *T. rubrovaria* and *T. circummaculata* based on its chromatic aspects and geographic distribution (Jurberg *et al.*, 2008). Phylogenetic analysis with fragments of mitochondrial genes (12S and COI) showed a profile of clades that confirm the previous findings (Almeida *et al.*, 2009).

Tritoma klugi, after being described, was grouped into the oliveirai complex based on its morphological characteristics, but later it was placed in the rubrovaria subcomplex, along with *T. carcavalloi*, *T. klugi*, *T. limai*, *T. oliverai* and *T. rubrovaria*. The new placement resulted from a study and review of the classification and evolution of triatomines by Schofield & Galvão (2009), which also led *T. circummaculata* to be placed in the rubrovaria subcomplex.

The results obtained in the present study corroborate those achieved by Schofield & Galvão (2009) and Almeida *et al.* (2009), who placed *T. circummaculata* and *T. klugi* in the rubrovaria subcomplex. Bayesian and maximum-parsimony analyses placed *T. carcavalloi* in the basis of the rubrovaria subcomplex, presenting it as a sister species to the group consisting of *T. circummaculata*, *T. klugi* and *T. rubrovaria*. It was also noted that *T. carcavalloi* is a sister species to *T. rubrovaria*, a fact that had been pointed out by Almeida *et al.* (2009) in a study on the phylogenetic relationship of that species. In this study it was noticed that *T. carcavalloi* is in the

basis of the rubrovaria subcomplex, being in fact a sister species to the group formed by *T. klugi* + *T. rubrovaria* + *T. circummaculata*.

Almeida *et al.* (2002), after studying populations of *T. rubrovaria* using isoenzymes and chromatic pattern, raised the hypothesis of the existence of an isolated population that is different from those studied so far. In that study, at first the isoenzymes indicated the population from the city of Santiago as the most distinct. The results obtained by Pacheco *et al.* (2003) and Pacheco *et al.* (2006) using ITS genes and the RAPD technique confirm the results obtained with isoenzymes.

Nevertheless, in the present study the population of *T. rubrovaria* from Canguçu was the most distinct (Fig. 1).

Monteiro *et al.* (2010) define a species complex as “a group of species that are closely related and morphologically similar”, and cryptic species as “morphologically similar species that are reproductively isolated”. Given the above, the tree topology suggests that *T. rubrovaria* is a species complex, since specimens coming from Canguçu, although having the same morphology of the others (data not presented herein), is isolated from the other populations of *T. rubrovaria*.

Costa *et al.* (2003), having studied populations of *T. brasiliensis*, suggest that carrying out experiments to cross species and populations can clarify phylogenetic inferences and compatibilities for reproduction among taxa. Almeida *et al.* (2009) recommended that the same procedure for *T. rubrovaria*, *T. carcavalloii* and *T. circummaculata* be adopted.

Based on the current results, new populations of *T. rubrovaria* from Canguçu and other places should be collected so that it could be verified if polyphyly and formation of cryptic species persist. Taking into account that using only one research methodology is not enough to state the formation of cryptic species, deeper studies

on specimens from Canguçu should be carried out using nuclear marker analysis along with morphological research and crossing of populations.

Conclusions

This study suggests that *T. rubrovaria* could be a complex of cryptical species, verified by the Bayesian analysis of the combined analysis of fragments of CytB and COI genes of triatomines from Rio Grande do Sul State. Further investigations should be performed, like combination of different methodologies in order to achieve a better understanding of the relationships among such cohabiting species of triatomines. Understanding both their reproductive isolation and epidemiological data can provide proper strategies to deepen the phylogenetic studies of that complex.

Acknowledgments

To Cleonara Bedin, Guiomar Voit, João Medeiros Soares, Juvenal Augusto Vieira, Mario Brito de Oliveira and Tania Marli Stasiak Wilhelms - members of the Núcleo de Vigilância dos Riscos e Agravos Ambientais Biológicos/DVAS CEVS/SES/RS, which enabled the collection of Triatominae used in this study; to Cleber Galvão and Dayse da Silva Rocha, who that sent specimens of *T. carcavallo*, *T. guasayana* and *T. klugi*. Supported by FAPESP (2009/52236-2).

References

Almeida, C.E., Duarte R., Pacheco R.S., Costa J. 2002. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera-Reduviidae-Triatominae) II: trophic resources and ecological observations of five populations collected in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **97**, 1127-1131.

Almeida, C.E., Marcet, P. L., Gumiel, M., Takiya, D.M., Cardozo-de-Almeida, M., Pacheco, R.S., Lopes, C.M., Dotson, E. M., Costa, J. (2009). Phylogenetic and Phenotypic Relationships Among *Triatoma carcavallo* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) and Related Species Collected in Domiciles in Rio Grande do Sul State, Brazil. *Journal of Vector Ecology* **34**(2),164-173.

Almeida, C.E., Vinhaes, M.C., Almeida, J.R., Silveira, A.C., Costa J.(2000). Monitoring the domiciliary and peridomiciliary invasion process of *Triatoma rubrovaria* in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **95**,761-768.

Catalá, S. (1997). Antennal sensilla of Triatominae Hemiptera Reduviidae. A comparative study of five genera. *International Journal of Insect Morphology and Embriology*, **26**, 67–73.

Chagas, C.J.R. (1909) Nova tripanossomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n.sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **1**,159–218.

-
- Costa, J., 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). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **102**, 87–90.
- Costa, J., Almeida, C.E., Dujardin, J.P., Beard, C.B. (2003). Crossing experiments detect genetic incompatibility among populations of *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **98**, 637–639.
- Costa, J., Argolo, A.M. & Felix, M. (2006) Redescription of *Triatoma melanica* Neiva & Lent, 1941, new status (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Zootaxa*, **1385**, 47–58.
- Coura, J. R. & Vinas, P. A. (2010). Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature*, **465** (7301), S6–S7.
- Dias, J. C. P., Silveira, A. C., Schofield, C. J. (2002). The impact of Chagas disease control in Latin America—a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **97**(5), 603–612.
- Dujardin, J.P., C.J. Schofield, and F. Panzera. 2002. Les Vecteurs de la maladie de Chagas. Recherches taxonomiques, biologiques et génétiques. *Académie Royale des Sciences d'Outre Mer. Bruxelles, Belgique*. 162 p.

-
- Forero, D., Weirauch, C. & Baena, M. (2004) Synonymy of the reduviidae (Hemiptera: Heteroptera) genus *Torrealbaia* (Tri-atominae) with *Amphibolus* (Harpactorinae), with notes on *Amphibolus venator* (Klug, 1830). *Zootaxa*, **670**, 1–12.
- Frías-Lasserre, D. (2010). A new species and karyotype variation in the bordering distribution of *Mepraia spinolai* (Porter) and *Mepraia gajardoi* Frías et al (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in Chile and its parapatric model of speciation. *Neotropical Entomology*, **39**(4), 572-583.
- Galvão, C., Carcavallo, R., Rocha, D.S. & Jurberg, J. (2003) Checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa*, **202**, 1–36.
- Garcia, B.A. and Powell. J.R. (1998). Phylogeny of species of *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae) based on mitochondrial DNA sequences. *Journal of Medical Entomology*, **35**, 232–238.
- Garcia, B.A., Moriyama, E.N. & Powell. J.R. (2001). Mitochondrial DNA sequences of triatomines (Hemiptera: Reduviidae): phylogenetic relationships. *Journal of Medical Entomology*, **38**, 675–683.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**, 95 – 98.

-
- Huelsenbeck, J.P. & F. Ronquist. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* **17**, 754–755.
- Jurberg, J., D.S. Rocha, E.S. Lorosa, M.C. Vinhaes, and H. Lent. (1998). Uma nova espécie de *Triatoma* do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Entomologia y Vectores*, **5**, 295–310.
- Jurberg, J., Galvão, C., Santos, C. M. dos.& Rangel, M. B. A.. (2008). Descrição de ovos e estádios ninfais de *Triatoma carcavallo* (Hemiptera, Reduviidae) por meio de microscopia óptica. *Iheringia. Série Zoologia*, **98**(4), 441-446.
- Lent, H. & Wygodzinsky, P. (1979) Revision of the triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas's disease. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, **163** (3), 123–520.
- Lent, H. (1942). Estudos sobre os Triatomídeos do Estado do Rio Grande do Sul, com descrição de uma espécie nova. *Revista Brasileira de Biologia*. **2** (2),219-231.
- Martins, L. P. A., Castanho, R. E. P., Casanova, C., Caravelas, D. T., Frias, G. T., Ruas-Neto, A. L., ROSA, J. A. (2006) . Triatomíneos rupestres infectados por Trypanosomatidae, coletados em Quaraí, Rio Grande do Sul. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **39**(2), 198-202.
- Miles, M. A. (2004). The discovery of Chagas disease: progress and prejudice. *Infectious Disease Clinics of North America*, **18**(2) 247–260.

-
- Monteiro, F. A., Marcet, P.L., Dorn, P. (2010). Population Genetics of Triatomines. In: Telleria; Tibayrenc. (Org.). *American Trypanosomiases, Chagas Disease - One hundred years of research*. Burlington, MA, USA: Elsevier, **1**, 1-871.
- Monteiro, F.A.; Barrett, T.V.; Fitzpatrick, S.;Cordon-Rosales, C.; Feliciangeli, D.; Beard, C. B. (2003). Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. *Molecular Ecology* **12**(4): 997-1006.
- Nylander, J.A.A., Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P. & Nieves, Aldrey, J.L. (2004). Bayesian phylogenetic analysis of combined data. *Systematic Biology*, **53**, 47–67.
- Pacheco, R.S., C.E. Almeida, J. Costa, D.R. Klisiowicz, S. Mas-Coma, and M.D. Bargues. 2003. RAPD analyses and rDNA intergenic-spacer sequences discriminate Brazilian populations of *Triatoma rubrovaria* (Reduviidae: Triatominae). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **97**, 757–768.
- Pacheco, R.S., Almeida, C.E., Klisiowicz, D.R., Costa, J., Pires, M.Q., Panzera, F., Bar, M.E., Mas-Coma, S., Bargues, M.E. (2006). Genetic variability of *Triatoma rubrovaria* (Reduviidae: Triatominae) from Brazil, Argentina and Uruguay as revealed by two different molecular markers. *Parasite*, **14**(3), 231-237.
- Pfeiler, E., Bitler, B.G., Ramsey, J.M., Palacios-Cardiel, C., Markow, T.A.(2006). Genetic variation, population structure, and phylogenetic relationships of *Triatoma rubida* and *T. recurva* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the Sonoran desert, insect vectors of the Chagas' disease parasite *Trypanosoma cruzi*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **41**, 209-221.

-
- Ribeiro, J.M., Schneider, M., Isaias, T., Jurberg, J., Galvão, C., Guimarães, J.A. (1998). Role of salivary antihemostatic components in blood feeding by triatomine bugs (Heteroptera). *Journal of Medical Entomology*, **35**, 599–610.
- Rosa, J. A., Barata, J.M.S., Santos, J. L. F., Cilense, M. (2000). Morfologia de ovos de *Triatoma circummaculata* e *Triatoma rubrovaria* (Hemiptera, Reduviidae). *Revista de Saúde Pública*, **34**(5), 538-542.
- Rosa, J. A., Rocha, C. S., Gardim, S., Pinto, M. C., Mendonça, V. J., Ferreira Filho, J. C. R., Carvalho, E.O.C, Camargo, L. M. A., Oliveira, J., Nascimento, J.D., Cilense, M., Almeida, C.E. (2012). Description of *Rhodnius montenegrensis* n. sp. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the state of Rondônia, Brazil. *Zootaxa*, **3478**, 62-76.
- Sainz, A.C., Mauro, L.V., Moriyama, E.N., García, B.A. (2004). Phylogeny of triatomine vectors of *Trypanosoma cruzi* suggested by mitochondrial DNA sequences. *Genetica* **121**, 229–240.
- Schaefer, C.W. (2003). Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): systematic questions and some others *Neotropical Entomology*, **32**,1–10.
- Schaefer, C.W. (2005). Why are the subfamily relationships of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) important? *Entomologia y Vectores*, **12**,19–35.
- Schofield, C.J. & Galvão, C. (2009) Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Tropica*, **110**, 88–100.

-
- Schofield, C.J. (1988). The biosystematics of Triatominae. M.W. Service (Ed.), *Biosystematics of Haematophagous Insects*, Clarendon press, Oxford, UK, **37**, 284–312.
- Silveira, A. C. & Dias, J. C. P. (2011). O controle da transmissão vetorial. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **44**, 52–63.
- Silveira, A. C. & Dias, J. C. P. (2011). O controle da transmissão vetorial. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **44**, 52–63.
- Soares, R.P., Sant'Anna, M.R., Gontijo, N.F., Romanha, A.J., Diotaiuti, L., Pereira, M.H. (2000). Identification of morphologically similar *Rhodnius* species (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) by electrophoresis of salivary heme proteins. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **62**, 157–161.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease (American Tripanosomiasis). Fact sheet N°340, August 2012.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>.

TABLES

Table 1: Species and origin of Triatominae whose DNA was extracted and sequenced fragments of mitochondrial genes (COI and CytB).

Species	Year of collection	Origin	Identification used	CTA *
<i>T. rubrovaria</i>	2010	Alegrete – RS (Location: Estrada dos Pinheiros)	<i>T.rubrovaria</i> AEP	-
<i>T.rubrovaria</i>	2008	Alegrete- RS (Location: Salso)	<i>T.rubrovaria</i> ASA	-
<i>T.rubrovaria</i>	2010	Canguçu – RS	<i>T.rubrovaria</i> CAN	-
<i>T.rubrovaria</i>	2008	Quaraí (Location: Cerro do Jarau)	<i>T.rubrovaria</i> QCJ	-
<i>T.rubrovaria</i>	2008	Quaraí (Location: Macarrão)	<i>T.rubrovaria</i> QMA	-
<i>T.rubrovaria</i>	2008	Quaraí (Location: Rosada)	<i>T.rubrovaria</i> QRO	-
<i>T. klugi</i>	2003	Nova Petrópolis – RS	<i>T.klugi</i>	-
<i>T.carcavalloi</i>	2006	São Jerônimo, RS (Location: Fernão Dias)	<i>T.carcavalloi</i>	-
<i>T. circummaculata</i>	2008	Quaraí (Location: Rosada)	<i>T.circummaculata</i>	-
<i>T.platensis</i>	1984	La Pampa – Argentina	<i>T.platensis</i>	147
<i>T.guasayana</i>	2003	Provincia de Tita – Chaco Boliviano	<i>T.guasayana</i>	215

* CTA = Triatominae Colonies of Araraquara

Table 2: DNA sequences used to establish the phylogenetic relationships among species and populations. "?" = missing sequences.

Triatomines	CytB	COI
<i>T. rubrovaria</i> AEP	This study	This study
<i>T. rubrovaria</i> ASA	This study	This study
<i>T. rubrovaria</i> CAN	This study	This study
<i>T. rubrovaria</i> QCJ	This study	This study
<i>T. rubrovaria</i> QMA	This study	This study
<i>T. rubrovaria</i> QRO	This study	This study
<i>T. klugi</i>	This study	This study
<i>T. carcavallo</i>	This study	This study
<i>T. circummaculata</i>	This study	This study
<i>T. platensis</i>	This study	This study
<i>T. guasayana</i>	This study	This study
<i>P. megistus</i>	AF045722	AF021182
<i>T. dimidata</i>	FN641816	JQ575030
<i>T. longipennis</i>	DQ198815	DQ198804
<i>T. recurva</i>	DQ198812	DQ198803
<i>T. mazzotti</i>	DQ198816	DQ198805
<i>T. rubida</i> sonoriana	DQ198810	DQ198800
<i>T. sordida</i> 1	HQ333243	AF021216
<i>T. sordida</i> 2	HQ333242	AF021210
<i>T. sherlocki</i>	EU489058	?
<i>T. infestans</i> 1	JN006798	HQ437704
<i>T. infestans</i> 2	AY702020	HQ437703
<i>T. brasiliensis</i> 1	AY336524	AF021184
<i>T. brasiliensis</i> 2	AY494140	AF021184
<i>T. brasiliensis</i> haplotypeD*	AY494166	?
<i>T. brasiliensis</i> haplotypeE*	AY494167	?
<i>T. brasiliensis</i> haplotype H*	AY336527	?
<i>T. brasiliensis</i> haplotype I *	AY494170	?

* Haplotypes of *T. brasiliensis* according to Monteiro et al (2004), later redefined as: D,E = *T. juazeirensis* and H, I = *T. melanica* (Costa et al., 2006; Costa & Felix 2007).

FIGURE

Figure 1: Bayesian Inference consensus of mixed-model analysis of mitochondrial sequences of CytB mtDNA (444bp) and cytochrome oxidase I (576bp). The values indicate the Bayesian posterior credibility of clades/parsimony bootstrap percentages, respectively.

