UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

HELOISA PINOTTI

Estudo molecular e morfométrico de populações silvestres e colônias laboratoriais de *Triatoma rubrovaria* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae)

Araraquara, SP
2016

HELOISA PINOTTI

Estudo molecular e morfométrico de populações silvestres e colônias laboratoriais de *Triatoma rubrovaria* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae)

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, Área de pesquisa em Parasitologia, subárea Entomologia e Malacologia de Parasitos e Vetores, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biociências e Biotecnologia Aplicadas á Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. João Aristeu da Rosa

Araraquara, SP

2016

Ficha Catalográfica
Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Pinotti, Heloisa
P657e Estudo molecular e morfométrico de populações silvestres e colônias laboratoriais de *Triatoma rubrovaria* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) / Heloisa Pinotti. – Araraquara, 2016.
64 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho".
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia, área de pesquisa em Parasitologia, subárea Entomologia e Malacologia de Parasitos e Vetores.

Orientador: João Aristeu da Rosa.

1. *Triatoma rubrovaria*. 2. Morfometria geomorfométrica. 3. Filogenia. 4. Triatominae. 5. *Cyt b*.
6. *COI*. I. Rosa, João Aristeu da, orient. II. Título.

CAPES: 40500005

Dedicatória

A minha mãe, Mirian.
Gratidão por ter me dado a vida e me ensinado a correr atrás do que é importante para mim.

A minha tia, Adriana.
Pelo apoio em todos os momentos difíceis e por compartilhar as alegrias da vida.

Eu não vou mudar não
Eu vou ficar são
Mesmo se for só
não vou ceder
Deus vai dar aval sim,
o mal vai ter fim
e no final assim calado
eu sei que vou ser coroado rei de mim".
Marcelo Camelo

AGRADECIMENTOS

Mãe, a única palavra que sei escrever é GRATIDÃO. Você é a musa que Deus enviou para nortear a minha vida.

Tia Adriana, minha tiririca e ser abençoado, obrigada por todos os momentos já vividos ao seu lado.

Pai, você esteve muito presente na minha mente durante a minha formação. Mesmo sem querer você me ensinou a ser forte e enfrentar a vida.

Aos meus avós, tia Carla e Paulinho, obrigada pelas boas palavras.

Sérgio e Carlos, obrigada pela convivência e pela força.

Ao Prof. Dr. João Aristeu da Rosa pela orientação, paciência e por acreditar no meu potencial.

A Secretária de Saúde do Estado do Rio Grande Sul pela colaboração durante o mestrado.

Vagner José Mendonça, obrigada pelos ensinamentos.

Danila Blanco, obrigada pela oportunidade de poder trabalhar com você e de participar da sua vida.

Sueli Gardim, minha salvadora da molecular, obrigada.

Aos colegas de Departamento pela colaboração e apoio.

Agradeço as minhas amigas Heloisa Messa, Verena Gomes, Isabella Vido, Jussara Miranda, Carla Rocha, Renata Muniz, pela amizade, carinho e paciência.

Ao amigo Reginaldo Soares por me mostrar o quanto a vida pode ser positiva e leve.

Aos amigos que o bar me proporcionou, vocês com certeza fizeram meus dias felizes.

Agradeço os anos a mais que passei na UNIARA, hoje sei o quanto foi necessário esse amadurecimento.

Agradecimento especial ao amigo Tiago Belintani, por toda a ajuda e pelas conversas enriquecedoras.

Aos companheiros do laboratório de Parasitologia, obrigada por estarem comigo em todos os meus momentos acadêmicos.

As meninas da Rep Label, as antigas moradoras e as atuais, vocês fizeram a diferença.

Aos muitos que estiveram comigo nesses dois anos, acredito que as pessoas passam por nossas vidas por algum motivo e se estivemos juntos em algum momento com certeza valeu a pena.

Agradeço a Capes pelos dois lindos anos de bolsa.

Aos membros participantes da banca do exame de qualificação desta dissertação: Dr. Marcos Obara e Drª. Aline Rimoldi, vocês enriqueceram o meu trabalho.

Aos pesquisadores e professores que aceitaram a indicação para banca avaliadora de defesa desta dissertação: Dr. Marcos Obara, Drª Maria Tercília Vilela, Dr. Adriano Mondini, Drª Amanda Piovesan, Drª Danila Blanco de Carvalho, Drª Sueli Gardim e Dr. Vagner José Mendonça.

Amados, o meu eterno

MUITO OBRIGADA!

O desenvolvimento desta dissertação foi financiado pela Capes.
Processo 23038005285/2011-201

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

COI: citocromo oxidase I do mtDNA.

Cytb: citocromo b do mtDNA.

CTA: Colônia de Triatominae de Araraquara.

CREBIO: Centro de Recursos Biológicos e Biologia genômica.

DNA: acido desoxirribonucleico.

DNTP: desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP).

F: *forward*.

Genbank: banco de dados público de sequências de nucleotídeos.

mtDNA: ácido desoxirribonucleico mitocondrial.

PCR: Reação de amplificação em cadeia de polimerase de DNA utilizando um par de iniciadores.

R: *reverse*.

TAE: Tris- Acetato-EDTA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo da transmissão e da interação parasita-hospedeiro do protozoário *T. cruzi*. Os números de 1-6 indicam as etapas do ciclo de transmissão: 1- repasto sanguíneo do triatomíneo; 2 - ato de coçar, o que leva as formas tripomastigotas metacíclicas das fezes à lesão deixada pela picada do vetor; 3-4 – invasão celular e multiplicação das formas amastigotas do T. cruzi; 5- rompimento celular e liberação das formas tripomastigotas sanguíneas; 6- ingestão pelo triatomíneo. Fonte: Google.

Figura 2: Área de captura de *Triatoma rubrovaria* no Estado do Rio Grande do Sul. Fonte: Google Maps.

Figura 3 - Estruturas mensuradas para o estudo morfométrico. A- seis parâmetros da cabeça, B- tórax, C- abdômen

Figura 4**:** Detalhe da cabeça de adulto fêmea de *T. rubrovaria* com marcação dos seis pontos de referência utilizados como coordenadas na morfometria geométrica.

Figura 5: Representação do alinhamento final conduzido pelo programa BioEdit das sequências dos fragmentos COI e Cytb e de sequências disponíveis no Genbank com seus respectivos números de acesso.

Figura 6: Gráfico referente a média das cabeças de fêmeas silvestres e laboratoriais de *Triatoma rubrovaria*. 1: Vila Nova do Sul; 2: Pinheiro Bonito; 3: Forqueta; 4: Rincão Soares; 5: Vila Kremer; 6: Quaraí CTA 162; 7: Alegrete CTA 234; 8: *Triatoma sordida*.

Figura 7: Gráfico referente a média das cabeças de machos das colônias silvestres e laboratoriais de *T. rubrovaria*.. 1: Vila Nova do Sul; 2: Pinheiro Bonito; 3: Forqueta; 4: Rincão Soares; 5: Vila Kremer; 6: Quaraí CTA 162; 7: Alegrete CTA 234; 8: *Triatoma sordida*.

Figura 8**:** Gráfico referente a variação canônica das cabeças de fêmeas silvestres laboratoriais de *T. rubrovaria*. Quaraí CTA 162: vermelho; Alegrete CTA 234: amarelo; Vila Nova do Sul: verde; Pinheiro Bonito: verde claro; Forqueta: azul claro; Rincão Soares: azul escuro; Vila Kremer: roxo; *Triatoma sordida*: rosa.

Figura 9**:** Gráfico referente a variação canônica das cabeças de machos silvestres e laboratoriais de *T. rubrovaria*. Quaraí CTA 162: vermelho; Alegrete CTA 234: amarelo; Vila Nova do Sul: verde; Pinheiro Bonito: verde claro; Forqueta: azul claro; Rincão Soares: azul escuro; Vila Kremer: roxo; *Triatoma sordida*: rosa.

Figura 10: Gráfico correspondente a PCA, detalhando o primeiro e segundo componente principal de fêmeas silvestres e laboratoriais de *T. rubrovaria*. Quaraí CTA 162: vermelho; Alegrete CTA 234: amarelo; Vila Nova do Sul: verde; Pinheiro Bonito: verde claro; Forqueta: azul claro; Rincão Soares: azul escuro; Vila Kremer: roxo; *Triatoma sordida*: rosa.

Figura 11: Gráfico correspondente a PCA, detalhando o primeiro e segundo componente principal de machos silvestres e laboratoriais de *T. rubrovaria*. Quaraí CTA 162: vermelho; Alegrete CTA 234: amarelo; Vila Nova do Sul: verde; Pinheiro Bonito: verde claro; Forqueta: azul claro; Rincão Soares: azul escuro; Vila Kremer: roxo; *Triatoma sordida*: rosa.

Figura 12: Dendograma filogenético por meio da amplificação e sequenciamento do gene COI correspondente a espécies silvestres e laboratoriais de *T. rubrovaria*.

Figura 13: Dendograma filogenético por meio da amplificação e sequenciamento do gene Cytb de espécies silvestres e laboratoriais de *T. rubrovaria*.

Figura 14: Filograma da análise bayesiana com inferência da análise combinada de sequências de triatomíneos utilizados para a reconstrução filogenética. Modelos de evolução para cada partição foram GTR + G para Cytb e GTR + I para o COI.

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Procedência e data de início das colônias silvestres de *T. rubrovaria* estudadas.

Tabela 02: Procedência e data de início das colônias laboratoriais de *T. rubrovaria* estudadas.

Tabela 3: Médias e desvios padrões das mensurações de seis parâmetros da cabeça de machos de *T. rubrovaria.*

Tabela 4: Resultado da diferença entre as médias da razão de aparência do comprimento total da cabeça de machos de colônias silvestres e laboratoriais segundo teste de Tukey

Tabela 5: Resultado da diferença entre as médias da razão de aparência da distância interna dos olhos de machos de colônias silvestres e laboratoriais segundo teste de Tukey.

Tabela 6: Resultado da diferença entre as médias da razão de aparência da distância externa dos olhos de machos de colônias silvestres e laboratoriais segundo teste de Tukey

Tabela 7: Resultado da diferença entre as médias da razão de aparência da distância do tubérculo antenífero de machos de colônias silvestres e laboratoriais segundo teste de Tukey.

Tabela 8: Resultado da diferença entre as médias da razão de aparência das distâncias ante-oculares de machos de colônias silvestres e laboratoriais segundo teste de Tukey.

Tabela 9: Resultado da diferença entre as médias da razão de aparência das distâncias pós-oculares de machos de colônias silvestres e laboratoriais segundo teste de Tukey.

Tabela 10**:** Médias e desvios padrões das mensurações de seis parâmetros da cabeça de *fêmeas de T. rubrovaria.*

Tabela 11: Resultado da diferença entre as médias da razão de aparência do comprimento total da cabeça de fêmeas de colônias silvestres e laboratoriais segundo teste de Tukey.

Tabela 12: Resultado da diferença entre as médias da razão de aparência da distância interna da cabeça de fêmeas de colônias silvestres e laboratoriais segundo teste de Tukey

.

Tabela 13: Resultado da diferença entre as médias da razão de aparência da distância externa da cabeça de fêmeas de colônias silvestres e laboratoriais segundo teste de Tukey.

Tabela 14: Resultado da diferença entre as médias da razão de aparência da distância do tubérculo antenífero da cabeça de fêmeas de colônias silvestres e laboratoriais segundo teste de Tukey.

Tabela 15: Resultado da diferença entre as médias da razão de aparência da distância ante-ocular da cabeça de fêmeas de colônias silvestres e laboratoriais segundo teste de Tukey.

Tabela 16: Resultado da diferença entre as médias da razão de aparência da distância pós-ocular da cabeça de fêmeas de colônias silvestres e laboratoriais segundo teste de Tukey.

Tabela 17**:** Médias e desvios padrões das mensurações do comprimento do tórax de machos de *T. rubrovaria*.

Tabela 18: Resultado da diferença entre as médias das mensurações do comprimento do tórax de machos de colônias silvestres e laboratoriais de *T. rubrovaria* segundo teste de Tukey.

Tabela 19: Médias e desvios padrões das mensurações do comprimento do tórax de fêmeas de *T. rubrovaria*.

Tabela 20: Resultado da diferença entre as médias das mensurações do comprimento do tórax de fêmeas de colônias silvestres e laboratoriais de *T. rubrovaria* segundo teste de Tukey.

Tabela 21: Médias e desvios padrões das mensurações de comprimento do abdômen de machos de *T. rubrovaria*.

Tabela 22: Resultado da diferença entre as médias das mensurações do comprimento do abdômen de machos de colônias silvestres e laboratoriais de *T. rubrovaria* segundo teste de Tukey.

Tabela 23: Médias e desvios padrões das mensurações do comprimento do abdômen de fêmeas de *T. rubrovaria*.

Tabela 24: Resultado da diferença entre as médias das mensurações do comprimento do abdômen de fêmeas de colônias silvestres e laboratoriais de *T. rubrovaria* segundo teste de Tukey.

SUMÁRIO

Capítulo I – Dissertação de Mestrado 18

RESUMO 19

ABSTRACT 20

I. INTRODUÇÃO 21

1.1. Doença de Chagas 21

1.2. Os vetores de *T.cruzi*. 23

1.3. Considerações sobre a espécie estudada. 25

1.3.1. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843). 25

1.4. Uso da biologia molecular no auxílio à sistemática da subfamília triatominae 26

1.5. Uso da morfometria tradicional e morfometria geométrica no auxílio à sistemática dos triatominae. 27

II. OBJETIVOS. 29

2.1. Objetivo Geral. 29

2.2. Objetivos Específicos. 29

III. MATERIAIS E MÉTODOS. 30

3.1. Insetos 30

3.2. Estudos Morfométricos 32

3.3. Análise da Morfometria Geométrica 33

3.4. Estudos Moleculares 34

3.4.1. Extração do DNA 34

3.4.2. Iniciadores (Primers) 34

3.4.3. Amplificação de DNA por PCR (Polymerase Chain Reaction) 35

3.4.4. Purificação dos fragmentos amplificados 35

3.4.5. Sequenciamento do DNA amplificado 36

3.4.6. Análise filogenética 36

3.4.7. Sequências utilizadas 37

IV. RESULTADOS 39

4.1. Análise Morfométrica 39

4.2. Morfometria Geométrica 50

4.3. Estudos Moleculares 56

4.4. Análise Bayesiana 59

V. DISCUSSÃO 60

VI. CONCLUSÃO 63

REFERÊNCIAS 64

CAPÍTULO II 67

Capítulo I – Dissertação de Mestrado

RESUMO

A subfamília Triatominae conta com 18 gêneros e 151 espécies, sendo duas fósseis. As espécies são divididas em cinco tribos: Alberproseniini, Bolboderini, Cavernicolini, Rhodniini e Triatomini sendo essa última tribo agrupada em oito complexos e oito subcomplexos por suas características morfológicas, citogenéticas e moleculares. *Triatoma rubrovaria* pertence à tribo Triatomini e ao complexo *Triatoma infestans* e pode ser encontrada no Estado do Rio Grande do Sul (Brasil), Uruguai e em algumas regiões da Argentina. *Triatoma rubrovaria* possui hábitos rupestres sendo encontrada em buracos e fendas de locais rochosos, onde predominam rochas graníticas ou areníticas. Essa espécie alimenta-se do sangue de mamíferos, dessa maneira mantém o ciclo silvestre de *Trypanosoma cruzi*. No Rio Grande do Sul *Triatoma carcavalloi*, *Triatoma pintodiasi*, *Triatoma circumamculata* e *T. rubrovaria* podem compartilhar os mesmos ecótopos e apresentam coloração e algumas características morfológicas semelhantes, o que dificulta a identificação. Diante dessa constatação e servindo-se de estudos moleculares, geomorfométricos e morfométricos foram feitos estudos de seis populações silvestres e de cinco colônias laboratoriais de *T. rubrovaria* mantidas no Insetário de Triatominae da Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Para o estudo de seis populações silvestres e de cinco colônias laboratoriais de *T. rubrovaria* foram utilizadas sequencias de genes mitocondriais Citocromo b e Citocromo Oxidase I. Também foram conduzidos estudos morfométricos por microscopia óptica em que se mensurou seis parâmetros da cabeça, comprimento do tórax e abdômen de fêmeas e machos adultos. Por meio de morfometria geométrica foram estudados parâmetros da cabeça utilizando pontos de referência previamente determinados. Os resultados obtidos, por meio de morfometria clássica e morfometria geométrica, mostraram diferenças no fenótipo dessas populações, enquanto o estudo molecular revelou que o genótipo não apresentou mudanças significativas.

Palavras-chave: *Triatoma rubrovaria*. Morfometria. Morfometria geomorfométrica. Filogenia. Triatominae. *Cyt b, COI.*

ABSTRACT

Currently, the members of the subfamily Triatominae are represented by 18 genera and 151 species, including two fossils. These species are divided into five tribes: Alberproseniini, Bolboderini, Cavernicolini, Rhodniinie Triatomini which are grouped into eight complexes and eight subcomplexes by their morphological, cytogenetic and molecular characteristics. *Triatoma rubrovaria* belongs to the Triatomine tribe and to the complex Triatoma infestans and can be found in the state of Rio Grande do Sul (Brazil), Uruguay and some regions of Argentina. *Triatoma rubrovaria* has rupestrian habits, being found in holes and crevices of rocky places that are dominated by granite or sandstone rocks. This species feeds on the blood of mammals, maintaining the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi*. In Rio Grande do Sul, *Triatoma carcavalloi*, *Triatoma pintodiasi*, *Triatoma circumamculata* and *T. rubrovaria* can share the same ecotypes, color patterns and some similar morphological characteristics, which often becomes difficult to differentiate these species. For this purpose, geomorphometric and morphometric studies were carried out using two wild populations and five colonies of *T. rubrovaria* from the laboratory which are kept in the Insectarium of Triatominae from the Faculty of Pharmaceutical Sciences. The six wild populations and five colonies of *T. rubrovaria* from the laboratory were used to the study of mitochondrial genes Cytochrome b and Cytochrome Oxidase I sequences. Furthermore, morphometric studies were performed by optical microscopy in order to measure six parameters of the head, length of the chest and abdomen of females and adult males. Through geometric morphometric studies were investigated the head parameters using previously determined reference points. The results obtained by classical morphometric and geometric morphometry methods showed differences in the phenotype of these populations, while the molecular study revealed that the genotype showed no significant changes.

Keywords: *Triatoma rubrovaria*. Morphometry. Geomorphometric morphometry. Phylogeny. Triatomine. *Cyt b*, *COI*.

I. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Chagas

Em 1909 Carlos Chagas descreveu a tripanossomíase americana. A doença foi descrita pautando-se em pesquisas de campo realizadas no município de Lassance no Estado de Minas Gerais, onde encontrou insetos hematófagos com hábitos noturnos, que habitavam casas de paredes de madeira e barro e cobertas com palha (CHAGAS, 1909).

Carlos Chagas examinou as fezes dos insetos coletados e observou um flagelado do gênero *Trypanosoma*, descrevendo assim, não só o ciclo como o agente etiológico da doença de Chagas, um protozoário, pertencente à ordem Kinetoplastida denominado *Trypanosoma cruzi* que se apresenta sob três formas principais: tripomastigota, forma flagelada com membrana ondulante que não apresenta capacidade reprodutiva, o núcleo é geralmente central; epimastigota, forma flagelada, com capacidade reprodutiva (por divisão binária) no trato digestório do vetor (triatomíneos) e que apresenta o cinetoplasto localizado próximo ao núcleo; amastigota, forma arredondada, sem flagelo livre, com habilidade de multiplicação intracelular (ARGOLO et al., 2008; NOIREAU et al., 2009).

Trypanosoma cruzi quando eliminado nas fezes dos barbeiros se apresenta na forma tripomastigota metacíclica (ocorrente no organismo dos barbeiros). Após a entrada no hospedeiro vertebrado ocorre a infecção das células próximas ao local da picada. Já dentro da célula os tripomastigotas assumem uma forma ovóide chamada amastigota, a qual se multiplica rapidamente. O grande número de parasitos provoca o rompimento celular e os tripanossomídeos entram na corrente sanguínea e no sistema linfático (ARGOLO et al., 2008).

Assumem novamente a forma flagelada, chamados de tripomastigotas sanguíneos (tipo ocorrente nos vertebrados), espalham-se pelo organismo e infectam novas células em outros ciclos (ARGOLO et al., 2008).

Figura 1 – Ciclo da transmissão da doença de Chagas.

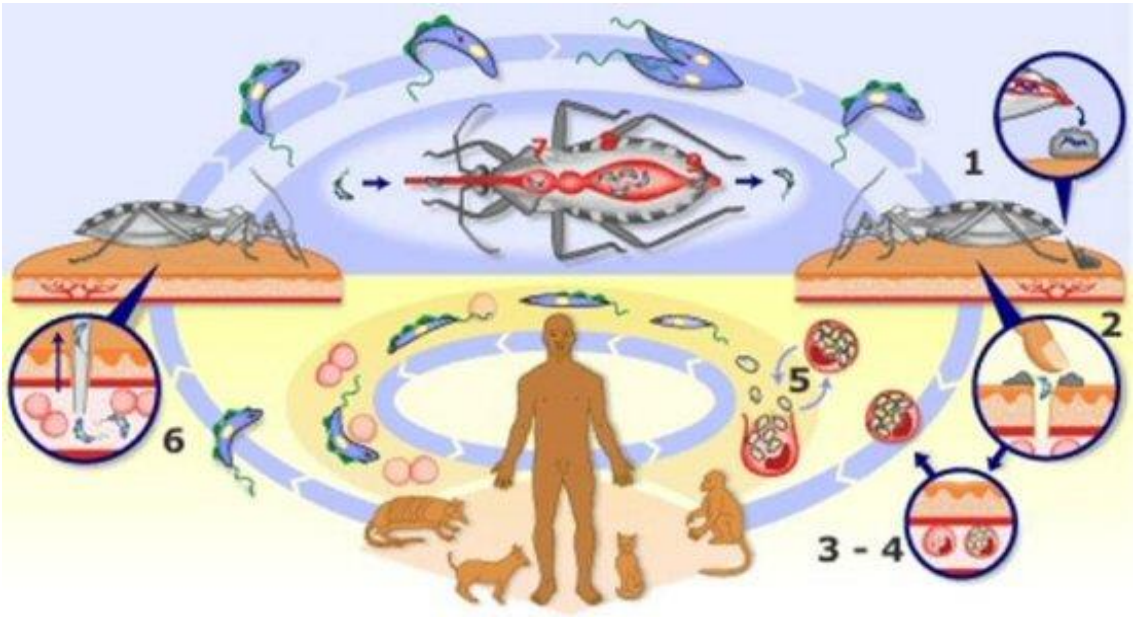

Figura 1: Ciclo da transmissão e da interação parasita-hospedeiro do protozoário *T. cruzi*. Os números de 1-6 indicam as etapas do ciclo de transmissão: 1- repasto sanguíneo do triatomíneo; 2 - ato de coçar, o que leva as formas tripomastigotas metacíclicas das fezes à lesão deixada pela picada do vetor; 3-4 – invasão celular e multiplicação das formas amastigotas de *T. cruzi*; 5- rompimento celular e liberação das formas tripomastigotas sanguíneas; 6- ingestão pelo triatomíneo. Fonte: Google

A transmissão do parasito *T. cruzi* ocorre principalmente por meio de fezes de triatomíneos que se alimentam de sangue, vivem em fendas e buracos de casas construídas em áreas rurais e suburbanas e são mais ativos à noite, pois, saem em busca de alimento. Além dessa forma o protozoário *T. cruzi* pode ser transmitido por: alimentos contaminados, transfusão de sangue, transmissão congênita, transplante de órgãos e por via oral (WHO, 2015).

A transmissão por via oral ocorre pela ingestão de alimentos contaminados com tripomastigotas de *T. cruzi* provenientes das fezes de triatomíneos infectados (LEWINSOHN, 2005). Mesmo acidental essa forma de transmissão é considerada endêmica na Amazônia (PINTO et al., 2008; VALENTE et al., 1999; FRAIHA et al., 1995; JUNQUEIRA et al., 2005,). Na cidade de Navegantes, em Santa Catarina, em 2005, ocorreu a infecção de 24 pessoas pela ingestão de caldo de cana, dessas, três evoluíram a óbito. A mesma linhagem de *T. cruzi* foi isolada do sangue dos pacientes infectados, do vetor *Triatoma tibiamaculata* e dos hospedeiros silvestres, gambás das espécies *Didelphis*

aurita e *Didelphis albiventris*, presentes na mata próxima ao local da infecção (STEINDEL, 2008).

Estima-se que cerca de seis a sete milhões de pessoas estão infectadas em todo o mundo, principalmente na América Latina. Essa doença encontra-se distribuída em áreas endêmicas de vinte e um países latino-americanos onde, determina um dos maiores problemas de saúde pública. Até 30% das pessoas cronicamente infectados desenvolvem alterações cardíacas e até 10% podem desenvolver alterações digestivas, neurológicas ou mistas (WHO, 2015).

Contudo, é notada uma grande dificuldade em controlar a doença pela falta de tratamento eficaz e pela domiciliação dos vetores que persistem em algumas áreas como casas de pau-a-pique (barro e madeira), criação de animais (galinheiros e currais). Essa domiciliação ocorreu devido a ocupação de ecótopos silvestres pelo homem que acarretaram em desequilíbrios ambientais. Dessa maneira, o ciclo doméstico da doença é bem conhecido e circula entre o homem, animais sinantrópicos e triatomíneos. Outro fator que dificulta o controle trata-se do ciclo silvestre em que o agente etiológico *T. cruzi* circula entre os triatomíneos e os hospedeiros mais comuns: roedores, quirópteros, carnívoros, marsupiais e primatas, provavelmente os mamíferos contaminam-se pela mucosa do sistema digestor, ao caçar e ingerir os vetores infectados. (ARGOLO, 2008).

Dessa forma, a melhor maneira de prevenção da doença é o combate intensivo a esses vetores de acordo com a área de transmissão geográfica: em regiões originalmente de transmissão como: Bahia, Minas Gerais, Ceará, Piauí, Rio Grande do Sul, Tocantins, entre outras, a estratégia é combater a formação de colônias do vetor nos domicílios e também dar assistência aos portadores crônicos da doença. Já na Amazônia Legal (Acre, Tocantins, Roraima, Pará, Amapá, Amazonas) a prioridade é na vigilância precoce de casos agudos e surtos. (FIOCRUZ, 2013).

1.2. Os vetores de *T.cruzi*.

Os insetos da subfamília Triatominae recebem nomes que variam de acordo com as regiões ou países onde são encontrados e são popularmente conhecidos como barbeiros (no

Brasil é o nome mais conhecido e provavelmente nomeado pelo seu hábito noturno de picar a parte do corpo que está descoberta, o rosto). Em outras regiões esse inseto hematófago é conhecido por muitos outros nomes como vinchucas, chirimachas, chupões, procotós e pertencem à ordem Hemiptera, subordem Heteroptera, que compreendem insetos da família Reduviidae e da subfamília Triatominae. Esse grupo teve como primeira espécie descrita *Cimex rubrofasciatus*, posteriormente conhecido como *Triatoma rubrofasciata* De Geer, (1773), Laporte (1833) reportadas em (GALVÃO et al., 2014).

Atualmente a subfamília Triatominae conta com 18 gêneros e 151 espécies sendo duas fósseis (GALVÃO, 2014; MENDONÇA et al., 2016). Essa subfamília é dividida em cinco tribos: Alberproseniini, Bolboderini, Cavernicolini, Rhodniini e Triatomini. Nas tribos Rhodniini e Triatomini estão inseridos os três principais gêneros do ponto de vista epidemiológico: *Panstrongylus, Rhodnius* e *Triatoma,* cujas espécies podem ser reagrupadas em "complexos específicos" devido às semelhança apresentadas, porém esse agrupamento não é reconhecido pelo Código Internacional de Nomenclatura Zoológica. O "complexo específico" é um conjunto de espécies e subespécies com semelhanças morfológicas, possíveis hibridizações, proximidade molecular, assim como bioquímicas, como, por exemplo, nas análises iso- enzimáticas e por outras abordagens (CARCAVALLO et al, 2001). A completa identificação do vetor facilita a compreensão da capacidade vetorial dos triatomíneos e suas características biogeográficas (CARCAVALLO e JUBERG, 2000).

O gênero *Triatoma* apresenta 73 espécies e é dividido em oito complexos e oito subcomplexos que agrupam os indivíduos por suas características morfológicas, citogenéticas e moleculares. Os complexos são: "Phyllosoma, Flavida, Rubrofasciata, Protracta, Lecticularia, Dispar, Infestans e Spinolai e os subcomplexos: Dimidiata, Phyllosoma, Brasiliensis, Infestans, Maculata, Matogrossensis, Rubrovaria e Sordida" (SCHOFIELD & GALVÃO, 2009).

A espécie estudada neste projeto pertence ao subcomplexo Rubrovaria que faz parte do complexo Infestans e conta com as seguintes espécies: *T. circummaculata, T. carcavalloi, T.klugi, T. oliverai, T. pintodiasi, T. limai.* (SCHOFIELD & GALVÃO, 2015).

1.3. Considerações sobre a espécie estudada.

1.3.1. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843).

Em 1843, Blanchard descreveu o *Triatoma rubrovaria*, espécie encontrada em 60 municípios do Estado do Rio Grande do Sul (Brasil), nas províncias em Missiones, Corrientes e Entre Rios (Argentina) e em todas as regiões do Uruguai (Rosa *et al*, 2000). *Triatoma rubrovaria* possui hábitos rupestres sendo encontrado em buracos e em afloramentos rochosos, onde predominam rochas graníticas ou areníticas, essa espécie alimenta-se do sangue de roedores, dessa maneira mantém o ciclo silvestre da doença. (ALMEIDA *et al.*, 2000; MARTINS *et al.*, 2006; MELLO & FIGUEIREDO, 2013).

Essa espécie, em geral, é negra com marcações no pescoço, pronoto, cório e conexivo de cor laranja, vermelho ou amarelo. Seu tamanho varia entre os gêneros, macho apresenta de 21 a 24 mm e a fêmea entre 22 a 25 mm. Suas pernas são escuras e delgadas e seu abdome é largo em alguns indivíduos (MELLO & FIGUEIREDO, 2013).

Devido a relevância de *T. rubrovaria* na veiculação de *T.cruzi* ao homem é importante o reconhecimento desse táxon, assim como a correta identificação desse triatomíneo beneficia as estratégias de controle ao vetor em áreas de risco (ROSA et al., 2000).

Segundo CARDOZO-DE-ALMEIDA et al., 2014, no Estado do Rio Grande do Sul são encontradas espécies como o *T. carcavalloi, T. circummaculata* e *T. rubrovaria* que são consideradas espécies simpátricas, habitam os mesmos ambientes e possuem hábitos alimentares variados, com intervalos irregulares na sua alimentação e grande resistência ao jejum. A caracterização de espécies silvestres é importante para avaliar a eficiências desses insetos enquanto vetores de *T. cruzi*, pois, essas espécies invadem constantemente locais onde ocorrem edificações humanas.

Uma nova espécie críptica com relação a *Triatoma circummaculata* foi descrita dentro do complexo *T. rubrovaria*, por meio de análises morfocromáticas, bioquímicas e morfométricas, *Triatoma pintodiasi* que difere nos padrões cromáticos e possui diferenças

morfológicas como coloração do lobo posterior do pronoto e nas estruturas fálicas quando comparado as outras espécies do complexo. A espécie foi encontrada até o momento no Rio Grande do Sul em ambientes pedregosos (JUBERG et al.,2013). Portanto, para a identificação correta de *T. rubrovaria* há que se atentar para não confundi-la com *T. carcavalloi, T. circummaculata, T. klugi* e *T. pintodiasi.*

Triatoma klugi é uma espécie originalmente encontrada em fendas de rochas sem ou com escassa vegetação no Estado do Rio Grande do Sul. Por apresentar características morfológicas semelhantes com *T. oliverai* a espécie foi incluída até então no complexo Oliverai que compreendia as seguintes espécies: *T. matogrossensis, T. oliverai, T. williami, T. guazu e T. jurbergi* (Carcavallo et al, 2001). Posteriormente, SCHOFIELD e GALVÃO, 2009 sugeriram que o complexo Infestans teriam na verdade seis subcomplexos incluindo o "subcomplexo rubrovaria" composto por *T. klugi e T. oliverai.*

1.4. Uso da biologia molecular no auxílio à sistemática da subfamília triatominae

As informações baseadas na genética dos organismos, provenientes de DNA, podem ser úteis para a identificação correta e na geração de conhecimento dos padrões naturais (correta distribuição geográfica de uma espécie e a variabilidade genética de suas populações) que servirão de base para o entendimento de processos evolutivos (formação de barreiras de isolamento reprodutivo, eventos de especiação ou ainda resistência vetorial aos inseticidas) (GALVÃO et al., 2014). O estudo do DNA de populações de *T. rubrovaria* tem o propósito de sanar dúvidas com relação às populações silvestres e laboratoriais.

Os genes mitocondriais são ferramentas eficazes para a avaliação genética de populações intraespecíficas de triatomíneos. O gene citocromo b mostrou-se útil para estudos filogenéticos de Triatominae, possui uma herança materna e sua taxa de mudança é bem mais rápida que o DNA nuclear (LYMAN et al., 1999). O citocromo oxidase I é utilizado por estar entre os genes mais conservadores que codificam genomas mitocondriais de animais invertebrados (FOLMER, 1994).

1.5. Uso da morfometria tradicional e morfometria geométrica no auxílio à sistemática dos triatominae.

A morfometria pode ser definida como o estudo da forma e tamanho e de como essas variáveis se relacionam, a morfometria se tornou uma ferramenta para entender melhor a relação dessas com outras variáveis, como, por exemplo, sexo e as relações históricas entre os organismos estudados (MORAES, 2003).

A morfometria tradicional é o estudo da variação e covariação de medidas de distância, sejam estas entre pares de pontos anatomicamente homólogos, ou entre pontos de tangência ou extremos de estruturas, ou seja, é o estudo de como e quanto estas medidas variam, e de como e quanto estão relacionadas entre si (MORAES, 2003).

Inicialmente os estudos sobre a variação das formas eram feitos um a um por várias medidas, porém, mesmo com as várias medidas não era possível descrever a forma como um todo, já que os organismos são multidimensionais (MORAES, 2003).

Foi por meio dessa necessidade que surgiram métodos multivariados usados atualmente, que levam em consideração, os diferentes níveis de variação e covariação dessas medidas. A crescente facilidade de acesso às técnicas computacionais fez com que as técnicas multivariadas tradicionais fossem amplamente usadas em estudos de ecologia, sistemática e evolução, e incluem técnicas bem estabelecidas, como Análise de Componentes Principais, Análise de Fatores, Regressões Múltiplas e Análises Discriminantes, entre outras (MORAES, 2003).

Uma nova abordagem morfométrica surgiu no início dos anos 90, essa nova metodologia chamada de morfometria geométrica é usada para representar as formas estudadas e localizar, por meio de gráficos, as regiões onde ocorrem as mudanças. A geomorfometria é baseada em pontos de referência, denominados marcos anatômicos ou *landmarks*. Esses marcos são pontos de correspondência presente em cada objeto que coincide com a população estudada (SILVEIRA, 2011).

A morfometria faz parte de uma área completamente nova, sendo reconhecida apenas nos últimos anos e, atualmente, muito usada em análises taxonômicas e sistemáticas, apresentando vantagens com relação à morfometria tradicional (SILVEIRA, 2011).

A maior contribuição da morfometria geométrica é na diferenciação de espécies, a rapidez na captura de imagem, o baixo custo do processo e o material podem ser obtidos tanto de exemplares secos como frescos. A morfometria geométrica é uma ferramenta de baixo custo e permite alto grau de confiança para a diferenciação de espécies (SILVEIRA, 2011).

II. OBJETIVOS.

2.1. Objetivo Geral.

Estudar os caracteres geomorfométricos, morfométricos e moleculares apresentados por cinco populações silvestres e cinco colônias mantidas em laboratório de *T. rubrovaria*.

2.2. Objetivos Específicos.

Analisar os caracteres da cabeça de adultos machos e fêmeas de seis populações silvestres e cinco colônias laboratoriais de *T.rubrovaria*.

Mensurar o comprimento do tórax e do abdômen de cinco populações silvestres e duas colônias de laboratório de *T. rubrovaria*.

Amplificar os genes mitocondriais Citocromo b (*cytb*) e Citocromo Oxidase I (*COI*).

Depositar em banco de dados as novas sequencias encontradas, disponibilizando-as para estudos posteriores sobre *T. rubrovaria*.

Propor hipóteses filogenéticas, relacionando essa espécie aos seus grupos mais próximos, de acordo com a análise de cada um dos genes sequenciados.

III. MATERIAIS E MÉTODOS.

3.1. Insetos

Foram utilizados exemplares de seis populações silvestres de *Triatoma rubrovaria* coletadas em outubro de 2013, em ambiente silvestre, principalmente em muros de cemitérios e ambientes rochosos por Jader de Oliveira (FCF/UNESP), em parceria com equipe da Secretaria de Saúde do Estado Rio Grande do Sul. Os exemplares utilizados foram congelados em álcool absoluto.

Tabela 1 - Procedência e data de início das colônias silvestres de *T. rubrovaria* estudadas.

Espécie	População	Procedência (Localidade/Município)	Início
T. rubrovaria	01	Vila Nova/São Francisco de Assis	20/10/2013
T. rubrovaria	03	Pinheiro Bonito/ São Francisco de Assis	20/10/2013
T. rubrovaria	06	Forqueta/ São Francisco de Assis	20/10/2013
T. rubrovaria	09	Rincão dos Soares/ São Francisco de Assis	20/10/2013
T.rubrovaria	10	Vila Kremer/ São Francisco de Assis	20/10/2013
T. rubrovaria	11	Quaraí	

As colônias de *T. rubrovaria* laboratoriais são mantidas à temperatura e umidade relativa do ar ambiente, no Insetário de Triatominae da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara, sob-responsabilidade do professor Dr. João Aristeu da Rosa. A manutenção das colônias é realizada quinzenalmente, por meio de alimentação com camundongos albinos livres de infecção por *T. cruzi*.

Os espécimes utilizados foram retirados de colônias identificadas e numeradas com algarismos arábicos como "Colônia de Triatomíneos de Araraquara" (CTA).

Tabela 2 - Procedência e data de início das colônias laboratoriais de *T. rubrovaria* estudadas.

Espécie	CTA	Procedência (Município)	Início
T. rubrovaria	162	Quaraí	23/03/2002
T. rubrovaria	165	Caçapava do Sul	22/02/2002
T. rubrovaria	168	Caçapava do Sul	25/10/1984
T. rubrovaria	169	Caçapava do Sul	20/01/1990
T. rubrovaria	234	Alegrete	20/01/2012

Figura 2 - Mapa: Municípios do Rio Grande do Sul onde as colônias de *Triatoma rubrovaria* foram coletadas .

Figura 2: Área de captura de *Triatoma rubrovaria* no Estado do Rio Grande do Sul. Fonte: Google Maps

3.2. Estudos Morfométricos

Foram mensurados oito adultos machos e fêmeas das colônias silvestres e laboratorias: seis parâmetros da cabeça (CT- comprimento total; DE- distância externa entre os olhos; DO- distância interna entre os olhos; AO- ante ocular; PO- pós ocular; AT- Tubérculo antenífero), comprimento total do tórax e do abdômen.

Os dados obtidos foram organizados em forma de gráficos no programa de estatística *GraphPad Prism 5*.

Figura 3 – Estruturas mensuradas para o estudo morfométrico

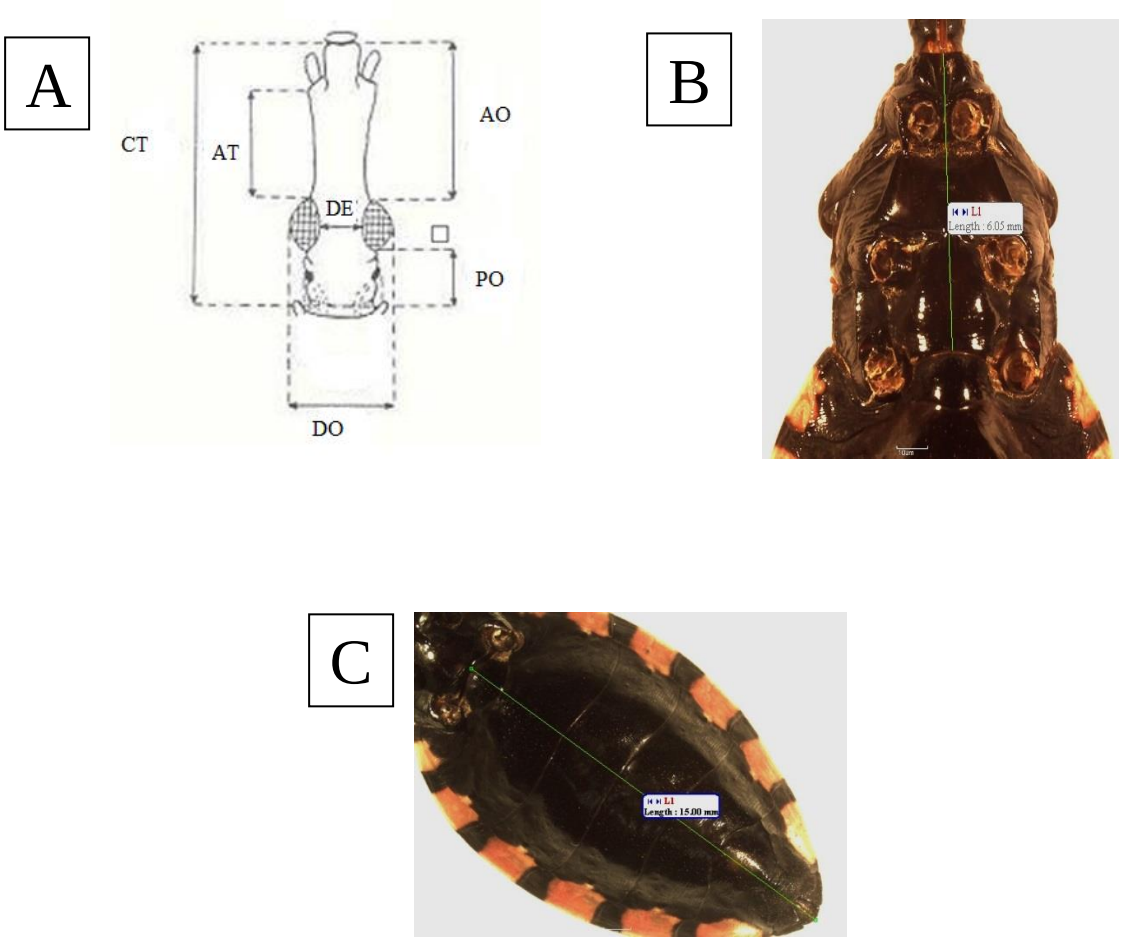

Figura 3 - Estruturas mensuradas para o estudo morfométrico. A- seis parâmetros da cabeça,

B- tórax, C- abdômen.

3.3. Análise da Morfometria Geométrica

Para a análise da geomorfometria da cabeça foram utilizados exemplares adultos de machos e fêmeas de *T. rubrovaria* de cinco populações silvestres e duas colônias laboratoriais com o objetivo de obter as landmarks (pontos de referência) determinando-se um número padrão de pontos para cada estrutura com base em Dujardin et al.,(1999). As imagens foram capturadas em microscópio estereoscópio Leica MZ APO e sistemas de análise de imagem Motic Advanced 3.2 plus, após a captura das imagens foram obtidos sete pontos de referências (landmarks) nas cabeças.

As figuras foram ajustadas no programa MorphoJ por um método ortogonal a fim de colocar as figuras sobre um ponto comum, o centroide, por meio de movimentos de escala, rotação, translação.

Na análise das coordenadas utilizaram-se componentes principais (CP), a partir desses componentes construiu-se um gráfico com os dois componentes principais (CP1 e CP2) para observar a se existe diferenciação entre as espécies silvestres e laboratoriais (Fig. 4).

Figura 4 - Detalhe da cabeça de adulto fêmea de *T. rubrovaria* com marcação dos seis pontos de referência utilizados como coordenadas na morfometria geométrica.

3.4. Estudos Moleculares

Para esse estudo foram utilizados marcadores moleculares oriundos do DNA mitocondrial (mtDNA): citocromo b (*Cyt b*), citocromo oxidase I (*COI*).

3.4.1. Extração do DNA

O DNA genômico dos triatomíneos foi extraído da musculatura da perna segundo protocolo modificado de Bargues e Mas Comas(1997), por ser livre de microrganismos contaminantes e simbiontes. Foram retiradas as seis pernas de cada exemplar adulto com auxílio de pinças entomológicas e posteriormente trituradas com nitrogênio em tubos de Eppendorfs de 1.5ml, adicionando 20µL de proteinase K. Após rompimento das estruturas do exoesqueleto, adicionou-se tampão de lise incubando os tubos a 50ºC em banho maria seco durante 12 horas.

A extração do DNA foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 1%. A corrida do gel foi realizada horizontalmente e orientada por um campo elétrico constante. Cada amostra de DNA correu por aproximadamente 40 minutos a 90V utilizando tampão TAE 1X e foi analisada em luz ultravioleta em transluminador. (SAMBROOK et al., 1989).

3.4.2. Iniciadores (Primers)

O fragmento do gene que codifica para o citocromo b (C*yt b*) foi amplificado pelos mesmos iniciadores utilizados por MONTEIRO et al., 2003:

CYTB7432 F: 5'– GGACG(AT)GG(AT)ATTTATTATTGGATC – 3'

CYTB7433 R: 5' – GC(AT)CCAATTCA(AG)GTTA(AG)TAA – 3'

Para amplificação do fragmento citocromo oxidase I (*COI*) foram utilizados os *primers* descritos por FOLMER, 1994.

LCO1490 F: 5’ – GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG - 3’

HCO2198 R: 5’ – TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA - 3’

3.4.3. 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 magnésio, 1U de enzima Taq DNA polimerase e tampão 10X, parte integrante da enzima.

As condições para a amplificação do gene citocromo b (Monteiro et al., 2003) foram: 94° C por cinco minutos (desnaturação inicial) seguidos por 35 ciclos compreendendo 94°C por um minuto (desnaturação), 45°C por um minuto e trinta segundos (anelamento), 72°C por um minuto e trinta segundos (extensão) e finalizando com um ciclo a 72°C por dez minutos (extensão final).

As condições para a amplificação do gene citocromo oxidase I (*COI*) foram: 94° C por cinco minutos (desnaturação inicial) seguidos por 35 ciclos compreendendo 94°C por um minuto (desnaturação), 45°C por um minuto e trinta segundos (anelamento), 72°C por um minuto e trinta segundos (extensão) e finalizando com um ciclo a 72°C por dez minutos (extensão final).

A confirmação da reação de amplificação foi realizada em eletroforese em gel de agarose a 1%, corada por 1:10 de azul de bromofenol e observada em luz UV.

3.4.4. Purificação dos fragmentos amplificados

O produto da PCR foi purificado utilizando o kit “NucleoSpin@ Gel and PCR Clean – up (Macherey- Nagel), de acordo com as instruções do fabricante e para avaliar a

concentração do DNA purificado, utilizou-se o equipamento Thermo Scientific NanoDrop2000, disponível no CREBIO – UNESP/Jaboticabal – SP.

3.4.5. Sequenciamento do DNA amplificado

O sequenciamento foi realizado no CREBIO – FCAV- UNESP/Jaboticabal, o produto purificado foi utilizado nos sequenciadores da Aplied(Life Technologies) ABI3100 e ABI3730XL, que utilizam a versão BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Por meio da análise do eletroferograma, foi obtida a qualidade das sequências com o auxílio do Programa "Electropherogram quality analysis."

3.4.6. Análise filogenética

A qualidade das sequências foi avaliada pelo eletroferograma e os alinhamentos e as sequências consenso foram gerados com o auxílio dos programas BioEdit Alignment Editor e ClustalW Multiple Alignment.

Os alinhamentos foram realizados em duas etapas: alinhamento inicial, no qual foi extraída uma sequencia consenso a partir das sequencias F e R obtidas para cada fragmento sequenciado; e alinhamento final que se baseia no alinhamento das sequencias com as de Triatominae disponíveis no Genbank.

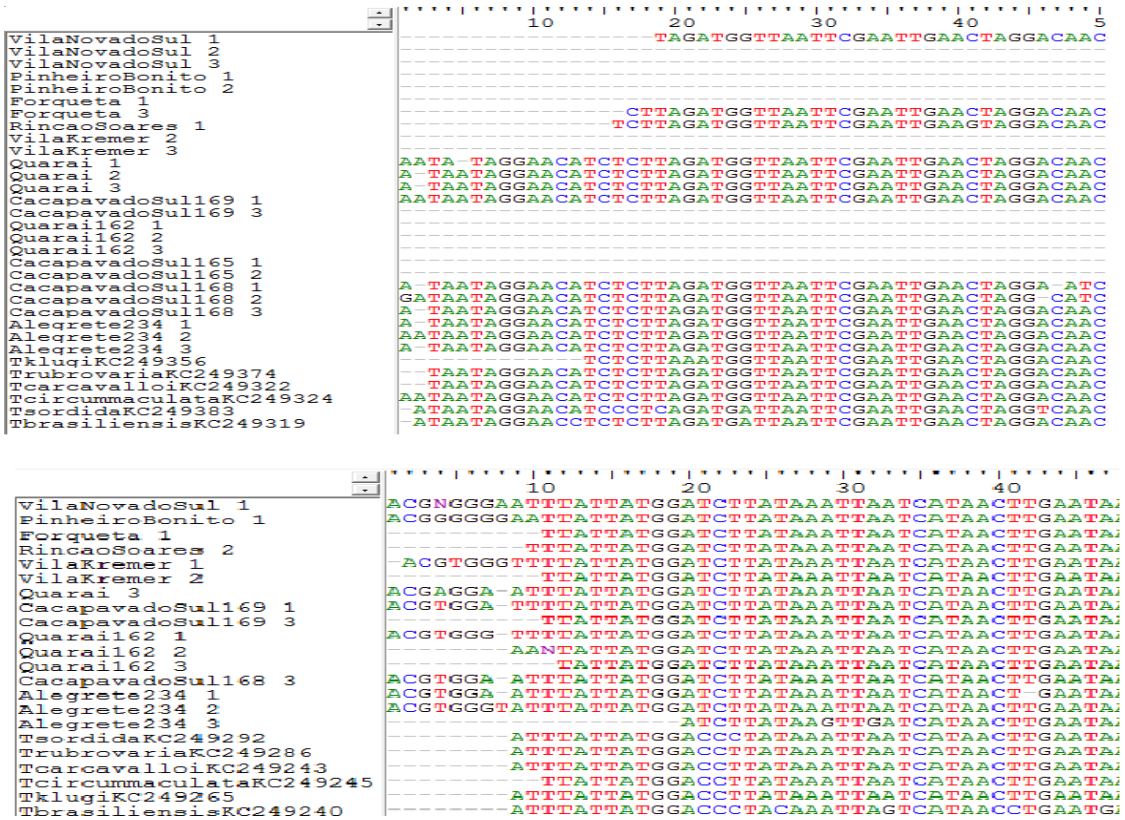

Figura 5 - Representação do alinhamento final conduzido pelo programa BioEdit das sequências dos fragmentos *COI* e *Cytb* e de sequências disponíveis no Genbank com seus respectivos números de acesso.

As análises filogenéticas foram realizadas utilizando-se o programa Mega 7 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) .

3.4.7. Sequências utilizadas

Para este estudo foram sequenciados fragmentos de genes mitocondriais de espécies silvestres e laboratoriais de *T. rubrovaria* e para embasar as análises filogenéticas foram utilizadas sequências dessas e de outras espécies de Triatominae disponíveis no Genbank (Quadro 1).

Quadro 1 - Códigos de acesso no Genbank de genes mitocondriais (*Cyt b, COI*) de triatomíneos utilizados neste estudo. As sequencias que se iniciam com KC foram depositadas por (JUSTI et al., 2014).

Espécies	CYT B	COI
Triatoma klugi	KC249265	KC249356
Triatoma rubrovaria	KC249286	KC249374
Triatoma circummaculata	KC249245	KC249324
Triatoma carcavalloi	KC249243	KC249322
Triatoma sordida	KC249292	KC249383
Triatoma brasiliensis	KC249249	KC249319

IV. RESULTADOS

4.1. Análise Morfométrica

As mensurações de seis parâmetros da cabeça de adultos fêmeas e machos de cinco colônias silvestres e duas laboratoriais de *Triatoma rubrovaria* são apresentadas a seguir na forma de tabelas.

Tabela 3: Médias e desvios padrões das mensurações de seis parâmetros da cabeça de machos de *T. rubrovaria*.

	Machos						
	Silvestre					**Laboratório**	
	Pop.1	**Pop.3**	**Pop.6**	**Pop.9**	**Pop.10**	**CTA 162**	**CTA 234**
CT	5,234	4,798	4,865	5.043	5.006	4.029	4.366
	(0.195)	(0.132)	(0.127)	(0.157)	(0.196)	(0.182)	(0.112)
DE	1.084	1.030	1.046	1.056	0,995	0,893	0,975
	(0.054)	(0.066)	(0.055)	(0.089)	(0.075)	(0.081)	(0.040)
DO	2.470	2.336	2.351	2.413	2.361	2.028	2.196
	(0.101)	(0.072)	(0.093)	(0.140)	(0.101)	(0.152)	(0.079)
AT	1,884	1.796	1.789	1,789	1,826	1.394	1.481
	(0.107)	(0.055)	(0.050)	(0.079)	(0.095)	(0.063)	(0.088)
AO	3.359	2,954	2,966	3.109	3.025	2.870	2.540
	(0.142)	(0.063)	(0.125)	(0.114)	(0.135)	(0.135)	(0.096)
PO	0.926	0.956	0.963	1.040	1.013	0.860	0,941
	(0.071)	(0.085)	(0.061)	(0.041)	(0.091)	(0.078)	(0.047)

CT: comprimento total; DE: distância interna entre os olhos; DO: distância externa dos olhos; AT: tubérculo anterífero; AO: ante- oculares e PO: pós- oculares.

Tabela 4 - Resultado da diferença entre as médias da razão de aparência do comprimento total da cabeça de machos de populações silvestres e colônias laboratoriais segundo teste de Tukey.

	Pop 01	Pop 03	Pop 06	Pop 09	Pop 10	CTA 162	CTA 234
Pop 01		*	*			*	*
Pop 03						*	*
Pop 06						*	*
Pop 09						*	*
Pop 10						*	*
CTA 162							*

Diferença ao nível de significância de 5% (*)

Tabela 5: Resultado da diferença entre as médias da razão de aparência da distância interna dos olhos de machos de *T. rubrovaria* de populações silvestres e colônias laboratoriais segundo teste de Tukey

	Pop 01	Pop 03	Pop 06	Pop 09	Pop 10	CTA 162	CTA 234
Pop 01						*	*
Pop 03						*	
Pop 06						*	
Pop 09						*	
Pop 10							
CTA 162							

Diferença ao nível de significância de 5% (*)

Tabela 6: Resultado da diferença entre as médias da razão de aparência da distância externa dos olhos de machos *T. rubrovaria* de populações silvestres e colônias laboratoriais segundo teste de Tukey.

	Pop 01	Pop 03	Pop 06	Pop 09	Pop 10	CTA 162	CTA 234
Pop 01					*	*	
Pop 03					*		
Pop 06					*		
Pop 09					*	*	*
Pop 10							
CTA 162							

Diferença ao nível de significância de 5% (*)

Tabela 7: Resultado da diferença entre as médias da razão de aparência da distância do tubérculo antenífero de machos de colônias silvestres e laboratoriais segundo teste de Tukey.

	Pop 01	Pop 03	Pop 06	Pop 09	Pop 10	CTA 162	CTA 234
Pop 01						*	*
Pop 03						*	*
Pop 06						*	*
Pop 09						*	*
Pop 10						*	*
CTA 162							

Diferença ao nível de significância de 5% (*)

Tabela 8: Resultado da diferença entre as médias da razão de aparência das distâncias ante- oculares de machos de colônias silvestres e laboratoriais segundo teste de Tukey.

	Pop 01	Pop 03	Pop 06	Pop 09	Pop 10	CTA 162	CTA 234
Pop 01		*	*	*	*	*	*
Pop 03							*
Pop 06							*
Pop 09						*	*
Pop 10							*
CTA 162							*

Diferença ao nível de significância de 5% (*)

Tabela 9: Resultado da diferença entre as médias da razão de aparência das distâncias pós- oculares de machos de colônias silvestres e laboratoriais segundo teste de Tukey.

	Pop 01	Pop 03	Pop 06	Pop 09	Pop 10	CTA 162	CTA 234
Pop 01				*			
Pop 03							
Pop 06							
Pop 09						*	
Pop 10						*	
CTA 162							

Diferença ao nível de significância de 5% (*)

Tabela 10: Médias e desvios padrões das mensurações de seis parâmetros da cabeça de fêmeas de *T. rubrovaria.*

	Fêmeas						
	Silvestre					Laboratório	
	Pop. 1	**Pop.3**	**Pop. 6**	**Pop.9**	**Pop.10**	**CTA 162**	**CTA 234**
CT	5.551	5.149	5.049	5.284	5.449	4.761	4.658
	(0.127)	(0.139)	(0.209)	(0.133)	(0.214)	(0.268)	(0.193)
DE	1.134	1.153	1.160	1.198	1.159	1.088	1.041
	(0.075)	(0.059)	(0.032)	(0.046)	(0.054)	(0.035)	(0.036)
DO	2.501	2.463	2.420	2.510	2.540	2.304	2.223
	(0.122)	(0.119)	(0.116)	(0.117)	(0.102)	(0.135)	(0.095)
AT	2.008	1.923	1.935	2.040	2.036	1.666	1.628
	(0.090)	(0.074)	(0.078)	(0.132)	(0.076)	(0.118)	(0.075)
AO	3.556	3.230	3.125	3.303	3.356	2.870	2.704
	(0.087)	(0.104)	(0.139)	(0.091)	(0.144)	(0.135)	(0.081)
PO	0.991	0.991	0.996	1.024	1.093	0.981	1.060
	(0.077)	(0.041)	(0.066)	(0.111)	(0.048)	(0.049)	(0.096)

CT: comprimento total; DE: distância interna entre os olhos; DO: distância externa dos olhos; AT: tubérculo anterífero; AO: ante- oculares e PO: pós- oculares.

Tabela 11: Resultado da diferença entre as médias da razão de aparência do comprimento total da cabeça de fêmeas de *T. rubrovaria* de populações silvestres e laboratoriais segundo o teste de Tukey.

	Pop 01	**Pop 03**	**Pop 06**	**Pop 09**	**Pop 10**	**CTA 162**	**CTA 234**
Pop 01		*	*			*	*
Pop 03					*	*	*
Pop 06					*		*
Pop 09						*	*
Pop 10						*	*

CTA 162							

Diferença ao nível de significância de 5% (*)

Tabela 12: Resultado da diferença entre as médias da razão de aparência da distância interna da cabeça de fêmeas de colônias silvestres e laboratoriais segundo teste de Tukey.

	Pop 01	**Pop 03**	**Pop 06**	**Pop 09**	**Pop 10**	**CTA 162**	**CTA 234**
Pop 01							*
Pop 03							*
Pop 06							*
Pop 09						*	*
Pop 10							*
CTA 162							

Diferença ao nível de significância de 5% (*)

Tabela 13: Resultado da diferença entre as médias da razão de aparência da distância externa da cabeça de fêmeas de colônias silvestres e laboratoriais segundo teste de Tukey.

	Pop 01	**Pop 03**	**Pop 06**	**Pop 09**	**Pop 10**	**CTA 162**	**CTA 234**
Pop 01						*	*
Pop 03							*
Pop 06							*
Pop 09						*	*
Pop 10						*	*
CTA 162							

Diferença ao nível de significância de 5% (*)

Tabela 14: Resultado da diferença entre as médias da razão de aparência da distância do tubérculo antenífero da cabeça de fêmeas de colônias silvestres e laboratoriais segundo teste de Tukey.

	Pop 01	Pop 03	Pop 06	Pop 09	Pop 10	CTA 162	CTA 234
Pop 01						*	*
Pop 03						*	*
Pop 06						*	*
Pop 09						*	*
Pop 10						*	*
CTA 162							

Diferença ao nível de significância de 5% (*)

Tabela 15: Resultado da diferença entre as médias da razão de aparência da distância ante-ocular da cabeça de fêmeas de colônias silvestres e laboratoriais segundo teste de Tukey.

	Pop 01	Pop 03	Pop 06	Pop 09	Pop 10	CTA 162	CTA 234
Pop 01		*	*	*	*	*	*
Pop 03						*	*
Pop 06				*	*	*	*
Pop 09						*	*
Pop 10						*	*

CTA 162							

Diferença ao nível de significância de 5% (*)

Tabela 16: Resultado da diferença entre as médias da razão de aparência da distância pós-ocular da cabeça de fêmeas de colônias silvestres e laboratoriais segundo teste de Tukey.

	Pop 01	**Pop 03**	**Pop 06**	**Pop 09**	**Pop 10**	**CTA 162**	**CTA 234**
Pop 01							
Pop 03							
Pop 06							
Pop 09							
Pop 10							
CTA 162							

Diferença ao nível de significância de 5% (*)

Tabela 17: Médias e desvios padrões das mensurações do comprimento do tórax de machos de *T. rubrovaria*.

Machos						
Silvestre					**Laboratório**	
Pop. 1	**Pop.3**	**Pop. 6**	**Pop.9**	**Pop.10**	**CTA 162**	**CTA 234**
5,778	**5,929**	**6,265**	**6,220**	**6,245**	**5,768**	**5,615**
(0,308)	**(0,305)**	**(0,207)**	**(0,228)**	**(0,231)**	**(0,41)**	**(0,325)**

Tabela 18: Resultado da diferença entre as médias das mensurações do comprimento do tórax de machos de colônias silvestres e laboratoriais de *T. rubrovaria* segundo teste de Tukey.

	Pop 01	Pop 03	Pop 06	Pop 09	Pop 10	CTA 162	CTA 234
Pop 01			*				
Pop 03							
Pop 06						*	*
Pop 09						*	*
Pop 10						*	*
CTA 162							

Diferença ao nível de significância de 5% (*)

Tabela 19: Médias e desvios padrões das mensurações do comprimento do tórax de fêmeas de *T. rubrovaria.*

Fêmeas						
Silvestre					Laboratório	
Pop. 1	Pop.3	Pop. 6	Pop.9	Pop.10	CTA 162	CTA 234
5,859	6,32	6,263	6,238	6,013	5,775	5,513
(0,300)	(0,347)	(0,184)	(0,266)	(0,241)	(0,190)	(0,313)

Tabela 20: Resultado da diferença entre as médias das mensurações do comprimento do tórax de fêmeas de populações silvestres e colônias de laboratório de *T. rubrovaria* segundo teste de Tukey.

	Pop 01	Pop 03	Pop 06	Pop 09	Pop 10	CTA 162	CTA 234
Pop 01		*					
Pop 03						*	*
Pop 06						*	*
Pop 09						*	*
Pop 10							*
CTA 162							

Diferença ao nível de significância de 5% (*)

Tabela 21: Médias e desvios padrões das mensurações de comprimento do abdômen de machos de *T. rubrovaria.*

Machos						
Silvestre					Laboratório	
Pop. 1	**Pop.3**	**Pop. 6**	**Pop.9**	**Pop.10**	**CTA 162**	**CTA 234**
12,24	11,92	12,41	12,58	12,39	10,95	11,57
(0,659)	(0,807)	(0,499)	(0,326)	(0,419)	(0,631)	(0,993)

Tabela 22: Resultado da diferença entre as médias das mensurações do comprimento do abdômen de machos de populações silvestres e colônias de laboratório de *T. rubrovaria* segundo teste de Tukey.

	Pop 01	**Pop 03**	**Pop 06**	**Pop 09**	**Pop 10**	**CTA 162**	**CTA 234**
Pop 01						*	
Pop 03							
Pop 06						*	
Pop 09						*	*
Pop 10						*	
CTA 162							

Diferença ao nível de significância de 5% (*)

Tabela 23: Médias e desvios padrões das mensurações do comprimento do abdômen de fêmeas de *T. rubrovaria.*

Fêmeas						
Silvestre					**Laboratório**	
Pop. 1	**Pop.3**	**Pop. 6**	**Pop.9**	**Pop .10**	**CTA 162**	**CTA 234**
14,5	13,52	14,08	14,56	14,61	12,58	13,28
(0,760)	(0,925)	(0,332)	(0,680)	(0,720)	(0,378)	(0,761)

Tabela 24: Resultado da diferença entre as médias das mensurações do comprimento do abdômen de fêmeas de populações silvestres e colônias de laboratório de *T. rubrovaria* segundo teste de Tukey.

	Pop 01	**Pop 03**	**Pop 06**	**Pop 09**	**Pop 10**	**CTA 162**	**CTA 234**
Pop 01						*	*
Pop 03					*		
Pop 06						*	
Pop 09						*	*
Pop 10						*	*
CTA 162							

Diferença ao nível de significância de 5% (*)

4.2. Morfometria Geométrica

A figura abaixo representa a variação de tamanho dos centroides de cinco colônias silvestres e duas laboratoriais de *T. rubrovaria*, ou seja, o ponto médio das coordenadas mensuradas. As mensurações de tamanho do centróide foram utilizadas para sumarizar o tamanho das cabeças em uma única variável e mostrar que existe uma diferença significativa nas médias das populações silvestres quando comparada as duas colônias de laboratório, *T.sordida* foi usado como *outgroup* para reforçar a análise.

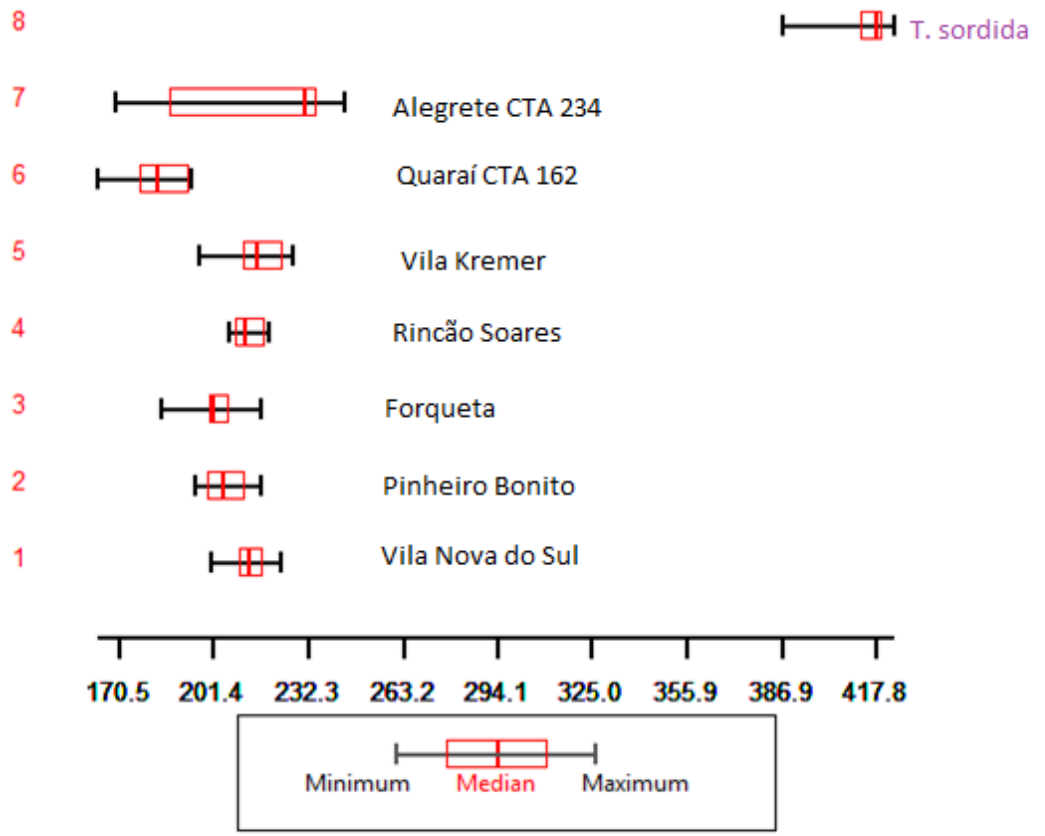

Figura 6: Gráfico referente a média das cabeças de fêmeas silvestres e laboratoriais de *Triatoma rubrovaria*. 1: Vila Nova do Sul; 2: Pinheiro Bonito; 3: Forqueta; 4: Rincão Soares; 5: Vila Kremer; 6: Quaraí CTA 162; 7: Alegrete CTA 234; 8: *Triatoma sordida*.

A figura 7 demonstra a variação de tamanho dos centroides de cinco populações silvestres e duas colônias de laboratório, ou seja, o ponto médio das coordenadas mensuradas. As medições de tamanho do centroide foram utilizadas para sumarizar o tamanho das cabeças em uma única variável. Assim como nas fêmeas existem diferenças nas médias das cabeças de machos e na figura abaixo se observa claramente essa variação quando comparada a população de Vila Nova do Sul com a população de Alegrete, por exemplo.

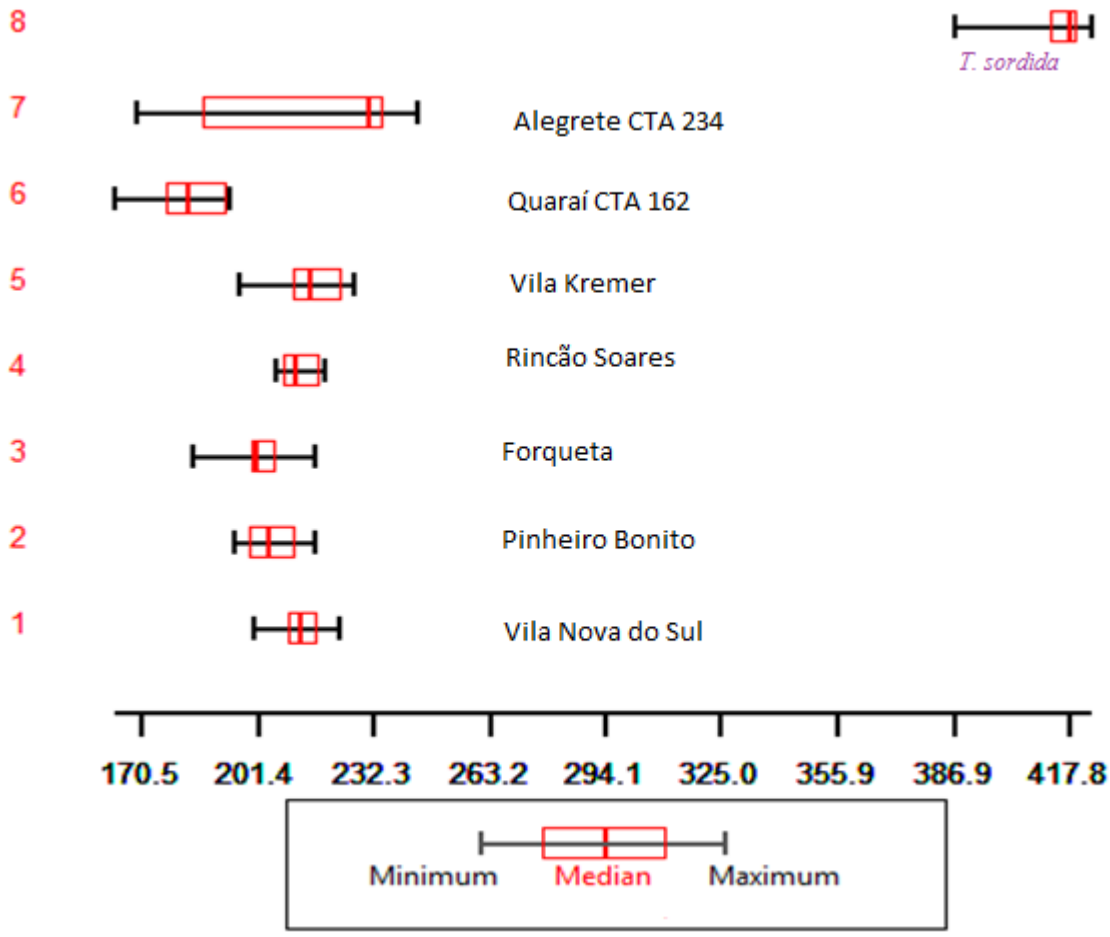

Figura 7: Média das cabeças de machos das populações silvestres e colônias de laboratório de *T. rubrovaria*.. 1: Vila Nova do Sul; 2: Pinheiro Bonito; 3: Forqueta; 4: Rincão Soares; 5: Vila Kremer; 6: Quaraí CTA 162; 7: Alegrete CTA 234; 8: *Triatoma sordida*.

Os resultados obtidos da variação canônica (CV) a fim de verificar as diferenças entre cinco populações silvestres e duas colônias de laboratório de *T. rubrovaria* mostraram que a CV1 representou 41% e a CV2 representou 16%, ou seja, existe uma maior diferença nas populações próximas ao eixo 1 (CV1) quando comparadas ao eixo 2 (CV2). Esse tipo de análise demonstra o índice de variação de cada grupo, fornecendo uma descrição das diferenças entre essas populações especificadas.

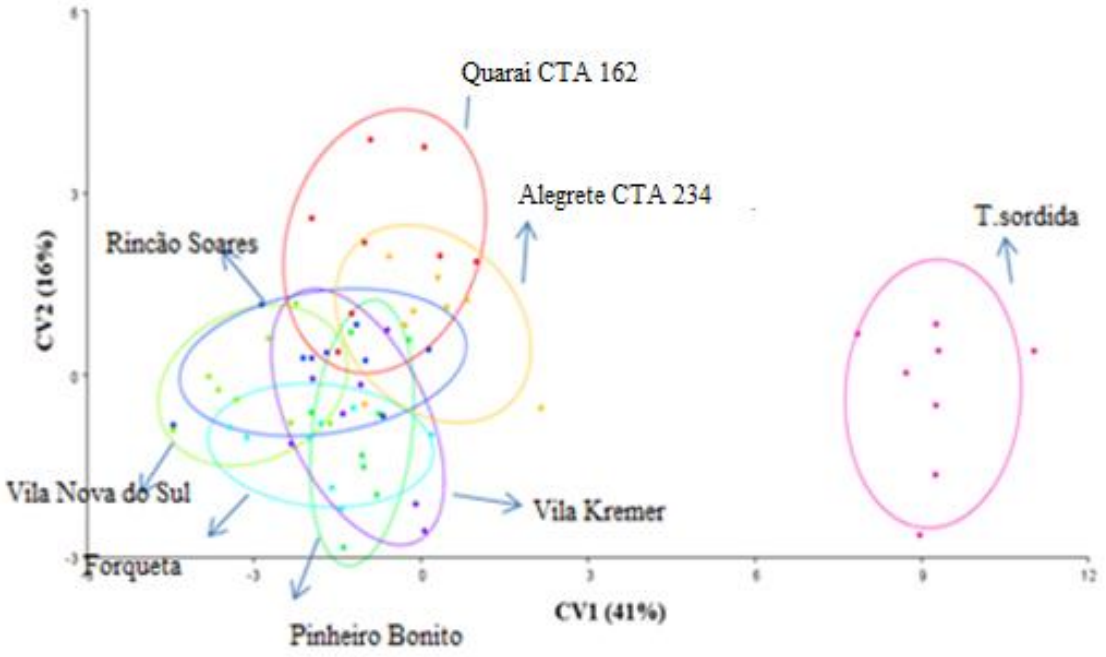

Figura 8**:** Variação canônica das cabeças de fêmeas silvestres e laboratoriais de *T. rubrovaria*. Quaraí CTA 162: vermelho; Alegrete CTA 234: amarelo; Vila Nova do Sul: verde; Pinheiro Bonito: verde claro; Forqueta: azul claro; Rincão Soares: azul escuro; Vila Kremer: roxo; *Triatoma sordida*: rosa.

Os resultados obtidos da variação canônica (CV) a fim de verificar as diferenças entre cinco populações silvestres e duas colônias laboratoriais de *T. rubrovaria* mostraram que a CV1 representou 40% e a CV2 representou 16%. Esse tipo de análise demonstra o índice de variação de cada grupo, fornecendo uma descrição das diferenças entre os grupos especificados na figura 6.

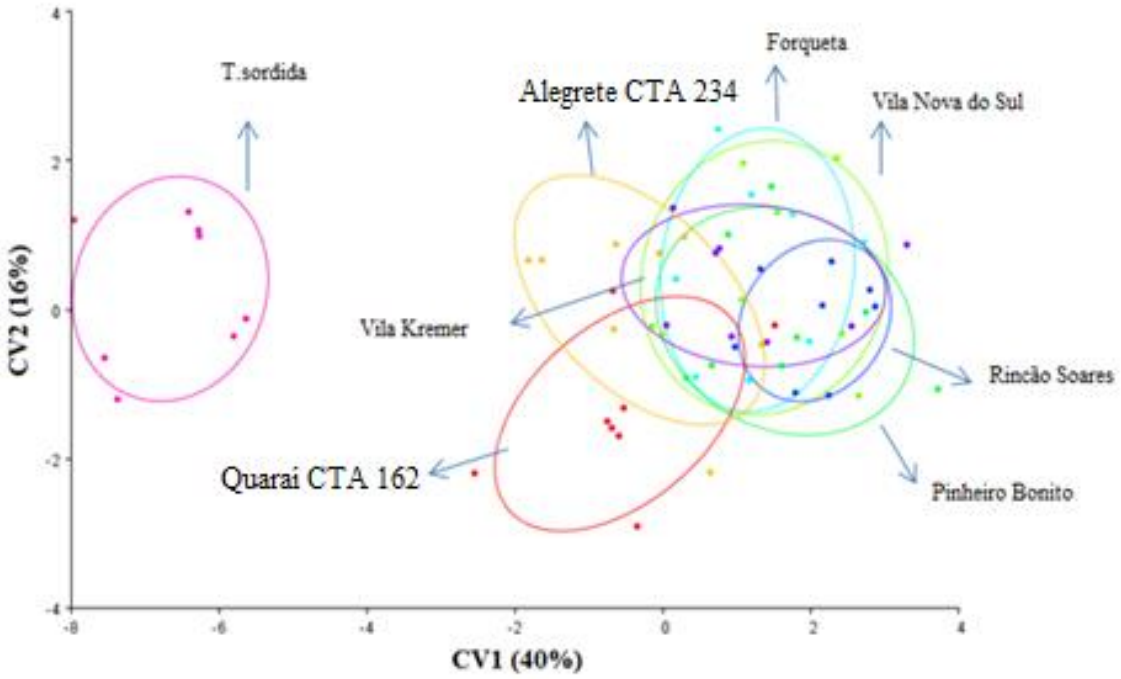

Figura 9**:** Gráfico referente a variação canônica das cabeças de machos silvestres e laboratoriais de *T. rubrovaria*. Quaraí CTA 162: vermelho; Alegrete CTA 234: amarelo; Vila Nova do Sul: verde; Pinheiro Bonito: verde claro; Forqueta: azul claro; Rincão Soares: azul escuro; Vila Kremer: roxo; *Triatoma sordida*: rosa.

Os resultados das análises dos componentes principais (PCA) para comparar as fêmeas silvestres e laboratoriais mostrou que o Componente Principal 1 representou 71% e o Componente principal 2 representou 4%, correspondendo a 74% da variabilidade da forma e do tamanho, ou seja, existe uma maior variabilidade no tamanho das populações do que na forma. Destaque na figura para as duas colônias de laboratório onde se sobressaem quando comparadas as colônias silvestres (Figura 7).

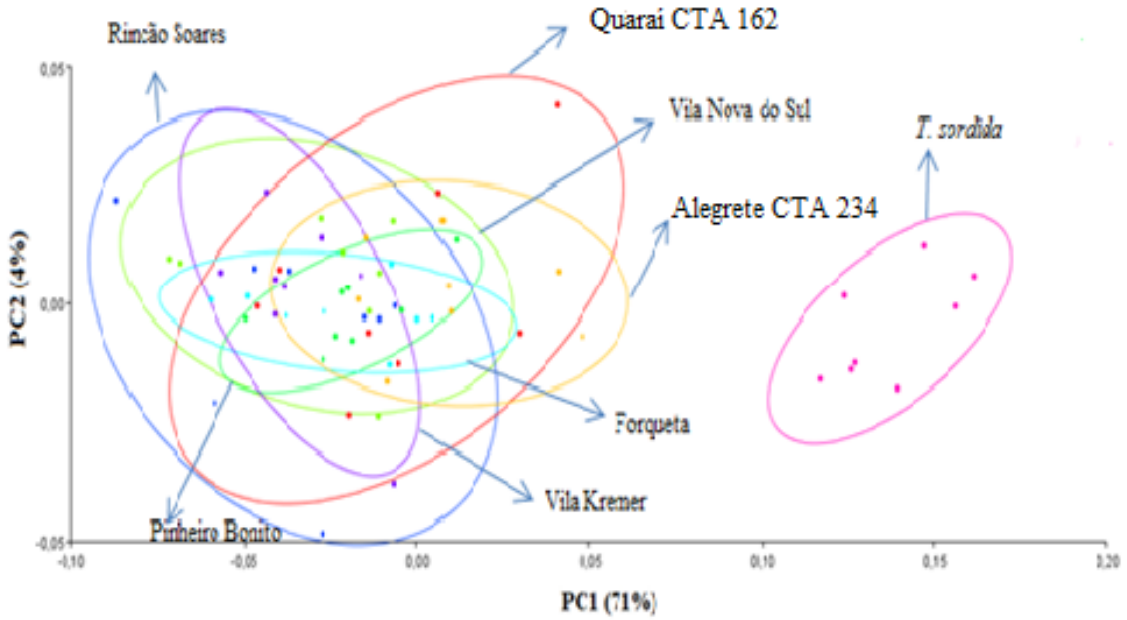

Figura 10: Gráfico correspondente a PCA, detalhando o primeiro e segundo componente principal de fêmeas silvestres e laboratoriais de *T. rubrovaria*. Quaraí CTA 162: vermelho; Alegrete CTA 234: amarelo; Vila Nova do Sul: verde; Pinheiro Bonito: verde claro; Forqueta: azul claro; Rincão Soares: azul escuro; Vila Kremer: roxo; *Triatoma sordida*: rosa.

Os resultados das análises dos componentes principais (PCA) para comparar os machos silvestres e laboratoriais mostrou que o Componente Principal 1 representou 90% de variabilidade no tamanho e o Componente principal 2 representou apenas 4% na variabilidade da forma, ou seja, esses espécimes se diferenciam pelo tamanho e as colônias de laboratório possuem uma maior diferenciação quando comparadas as colônias silvestres (Figura 8).

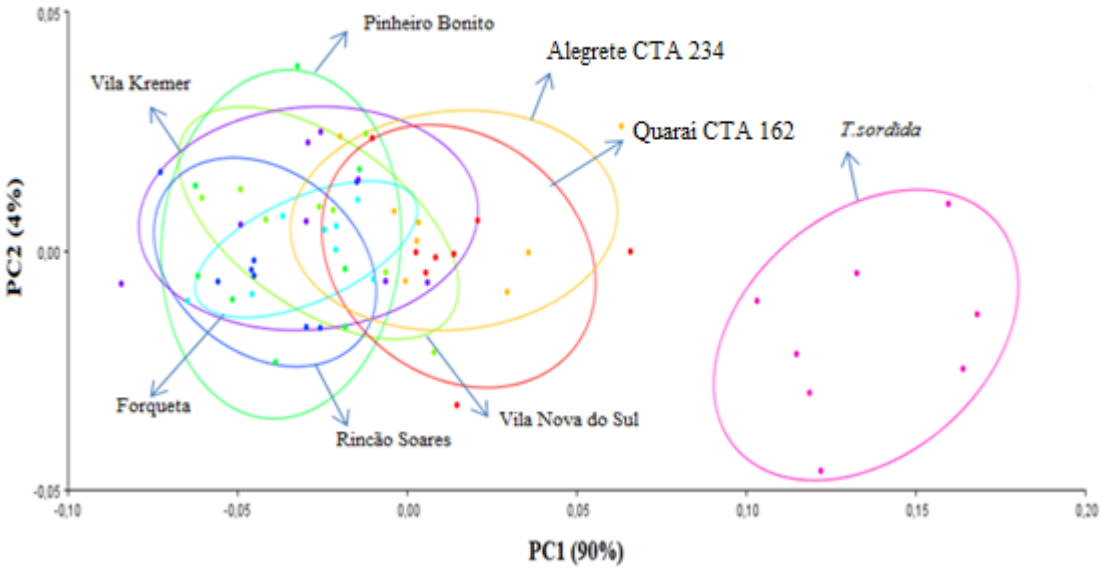

Figura 11: Gráfico correspondente a PCA, detalhando o primeiro e segundo componente principal de machos silvestres e laboratoriais de *T. rubrovaria*. Quaraí CTA 162: vermelho; Alegrete CTA 234: amarelo; Vila Nova do Sul: verde; Pinheiro Bonito: verde claro; Forqueta: azul claro; Rincão Soares: azul escuro; Vila Kremer: roxo; *Triatoma sordida*: rosa.

4.3. Estudos Moleculares

O método usado para gerar a matriz de distância genética necessária foi o algoritmo Kimura de dois parâmetros (Kimura 2). Após a formação das matrizes de distância por esse método, o dendograma foi construído com o auxílio do algoritmo NJ que avalia a matriz e identifica os vizinhos mais próximos, o comprimento dos ramos representa a proporção de nucleotídeos divergentes(distância genética).

Os valores das ramificações são conhecidos como *Bootstrap*, esses valores indicam o grau de confiança da estrutura da árvore, para a construção dos dendogramas os valores de Bootstrap foram suportados por 1000 replicações.

Os resultados correspondentes da verificação e determinação das distâncias genéticas e das diferenças intraespecíficas de populações silvestres e laboratoriais de *T. rubrovaria* por meio da análise *Test Neighbor Joining Tree* (NJ) usando Citocromo Oxidase 1 como gene mitocondrial.

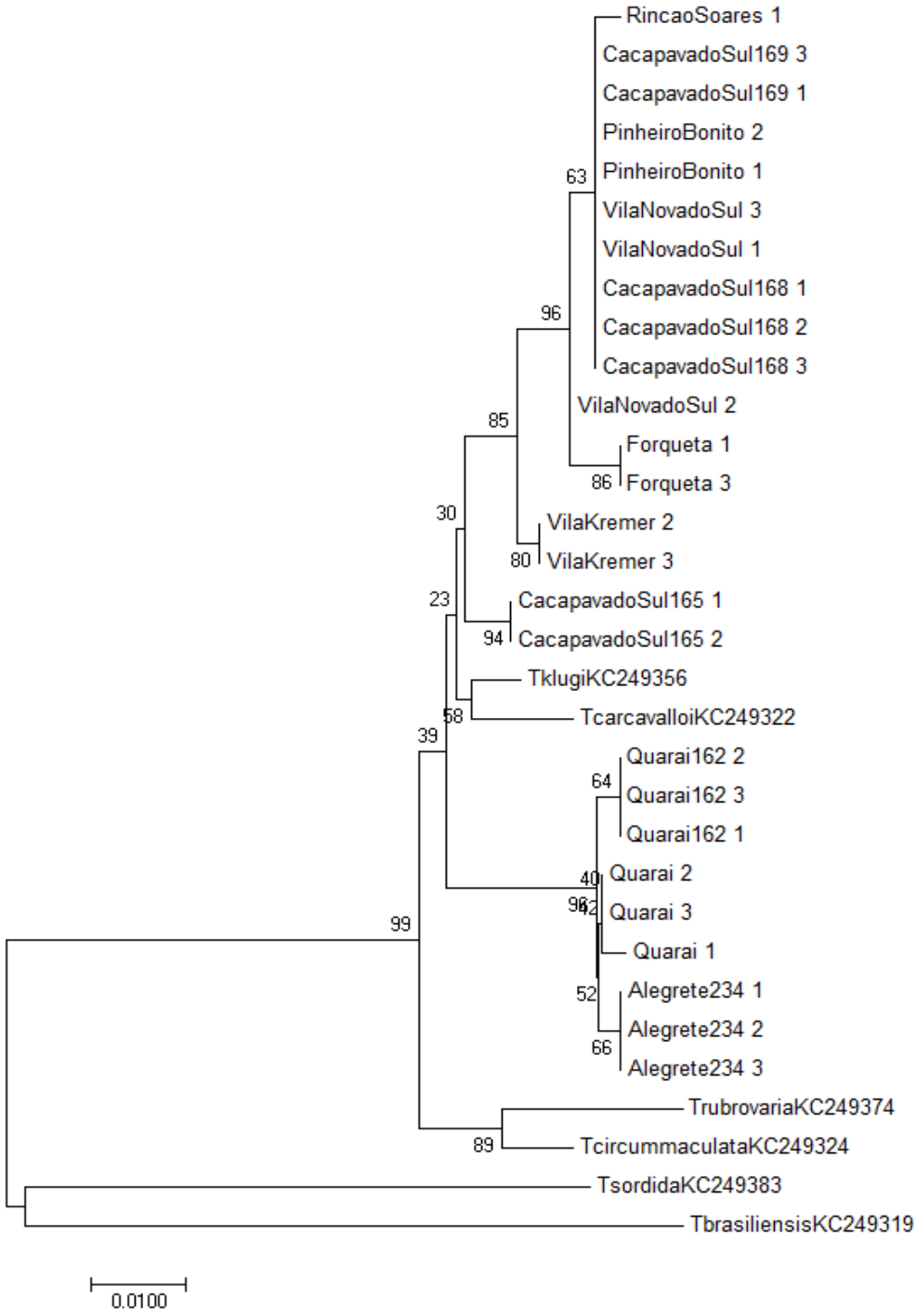

Figura 12: Dendograma filogenético por meio da amplificação e sequenciamento do gene *COI* correspondente a espécies silvestres e laboratoriais de *T. rubrovaria*.

Os resultados correspondentes da verificação e determinação das distâncias genéticas e das diferenças intraespecíficas de populações silvestres e colônias laboratoriais de *T. rubrovaria*, por meio da análise *Test Neighbor Joining Tree* usando Citocromo b como gene

mitocondrial, mostrou que não houve diferenças genéticas significativas entre essas populações. Foram usadas sequências do *genBank* para dar suporte à análise e dois outgroups: *T. sordida* e *T. brasiliensis*.

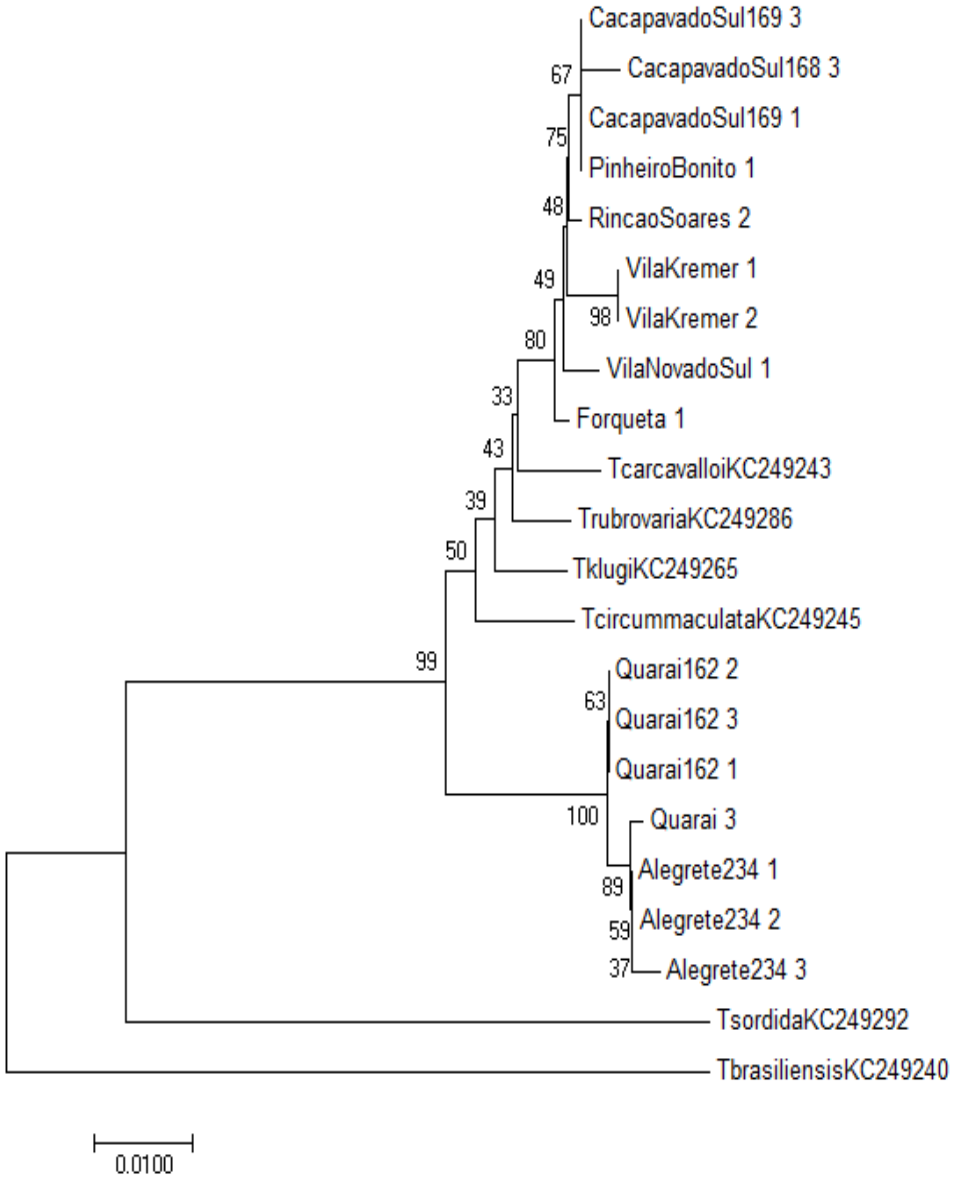

Figura 13: Dendograma filogenético por meio da amplificação e sequenciamento do gene *Cytb* de populações silvestres e colônias laboratoriais de *T. rubrovaria*.

4.4. Análise Bayesiana

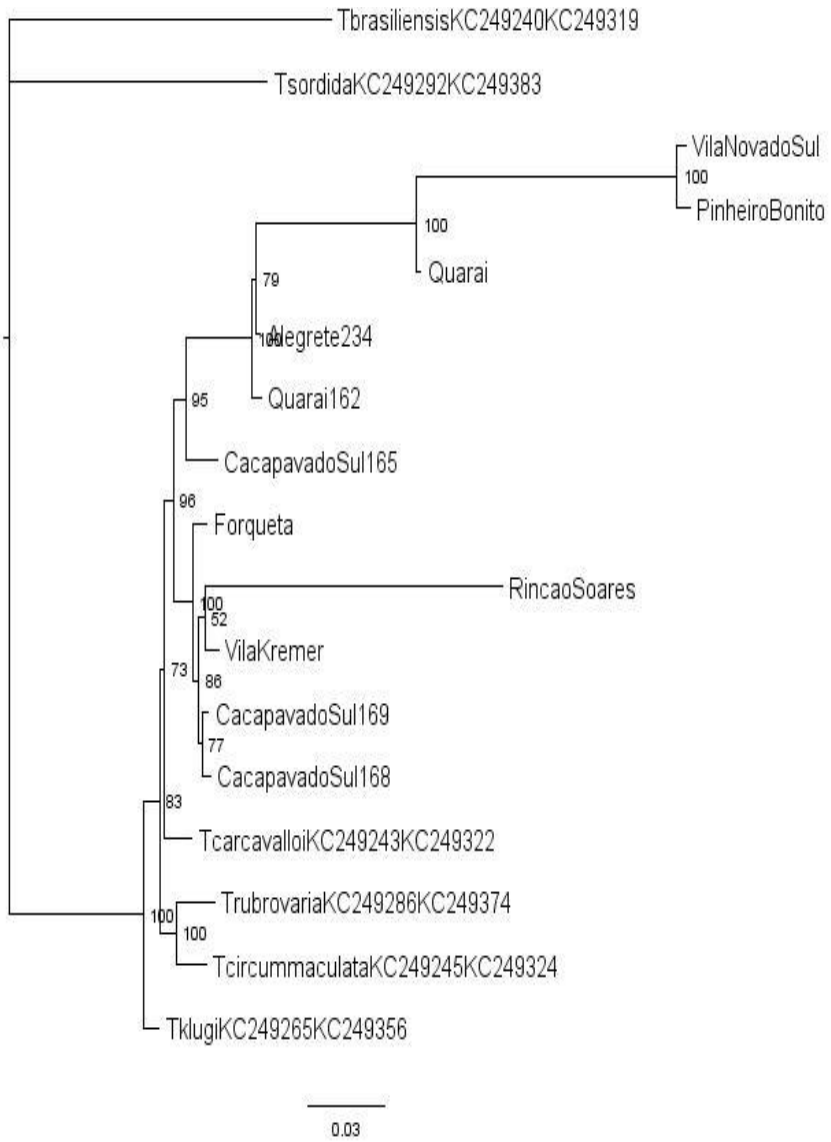

Figura 14: Filograma da análise bayesiana com inferência da análise combinada de sequências de triatomíneos utilizados para a reconstrução filogenética. Modelos de evolução para cada partição foram GTR + G para *Cytb* e GTR + I para o *COI*.

V. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos quanto às mensurações dos seis parâmetros da cabeça (CT, DE, DO, AT, AO, PO) de machos e fêmeas, respectivamente, mostraram diferenças entre colônias silvestres e laboratoriais quando a média e o desvio padrão (Tab. 4, 11). Porém, ao se utilizar o teste de significância de Tukey (Tab. 5 a 10 e 11 a 17) nem todos os parâmetros mostraram uma diferença significativa quando comparadas as colônias silvestres e de laboratório. As diferenciações nas fêmeas são mais aparentes e demonstrou que as estruturas que mais contribuíram para a variabilidade desses espécimes foram CT, AO e AT.

Ao comparar o comprimento do tórax de *T. rubrovaria* machos e fêmeas apresentado pelas cinco populações silvestres e duas de laboratório percebe-se que há diferenciação quanto ao sexo quando se utiliza a média e o desvio padrão (Tabs. 18 e 20), mas quando o teste de significância de Tukey é realizado apenas as colônias silvestres 6 e 9 (Tabs. 19 e 21) se diferenciam das colônias de laboratório CTA 162 e 234.

Por meio do teste de Tukey percebe-se que as populações silvestres 01, 06 e 09 e 10 de *T. rubrovaria* (Tabs. 23 e 25) apresentam diferenças estatísticas com as colônias de laboratório quanto ao comprimento do abdômen de machos e fêmeas de colônias silvestres e de laboratório de *T. rubrovaria* (Tabs. 22 e 245)

As tabelas 22 e 24 mostram respectivamente O comprimento do abdômen de machos e fêmeas de colônias silvestres e de laboratório de *T. rubrovaria* (Tabs. 22 e 245), ao serem comparadas e analisadas avaliadas pelo teste de Tukey percebe-se que as colônias 01, 06 e 09 e 10(tabela 23 e 25) apresentam diferenças estatísticas com as colônias de laboratório.

A morfometria clássica mostrou que há diferenciação entre as espécies silvestres e laboratoriais, principalmente quando machos e fêmeas são comparados. A existência de dimorfismo sexual em Triatominae é bastante conhecida, em média, as fêmeas são maiores que os machos e já foi observado em trabalhos como do Dujardin, 1999. A análise estatística das mensurações de adultos machos e fêmeas de *Triatoma rubrovaria* serviram para confirmar o dimorfismo.

Segundo Dujardin, 2010, a morfometria geométrica permite a comparação quantitativa das formas dos organismos, quando aplicada à sistemática é capaz de marcar mudanças que muitas vezes são indetectáveis pela morfometria clássica. Desse modo a geomorfometria contribuiu para verificar a proximidade de colônias silvestres e de laboratório de *Triatoma rubrovaria* quando comparou-se o centroide, ou seja, ponto médio desses espécimes, variação canônica e componentes principais que ajudam na distinção de forma e tamanho dessas colônias.

O resultado da morfometria geométrica indicou que os pontos médios das populações silvestres e das colônias de laboratório são bem variáveis, entre as quais destacou-se a população 3 (Forqueta) quando comparada com a colônia de Alegrete CTA 234 (Figs. 6 e 7). *Triatoma sordida* foi usado como outgroup para dar suporte à análise e mostrar que realmente há diferenciações desses espécimes.

A variação canônica (Figs. 8 e 9) demonstra o índice de variação de cada grupo, e fornece uma descrição das diferenças entre grupos especificados de antemão em um conjunto de dados multivariaodos (Silveira, 2011). Observa-se que duas colônias de laboratório (Alegrete CTA 234 e Quaraí CTA 162) se destacam das populações silvestres.

Os gráficos dos componentes principais onde se baseiam a análise da forma do corpo em relação ao tamanho através de métodos numéricos mostram que as colônias de laboratório se diferenciam com relação ao tamanho quando comparadas com as populações silvestres (Figs. 10 e 11). *Triatoma sordida* foi usado como outgroup para dar suporte às análises.

A abordagem molecular revelou que os genes mitocondriais se mostraram úteis na análise por apresentar uma taxa maior de mudança (Cytb) e por ser mais conservado (COI) e uma evolução dez vezes mais rápida que o gene nuclear. Quanto maior a taxa evolutiva do gene, maior é a capacidade de avaliar a divergência de organismos próximos (MARTINEZ et al.,2006).

Para gerar as árvores filogenéticas foi utilizado o algoritmo Neighnor – Joining, com base na distância genética das colônias avaliadas e se baseia em calcular a distância genética entre as sequências (PINTEIRO et al., 2005).

As análises de distância são realizadas com base em uma matriz de dados, que pode ser gerada a partir de vários parâmetros. Assim, utilizou-se um método para gerar a matriz de distância genética necessária para a construção do dendograma. O método a ser utilizado foi o algoritmo Kimura de dois parâmetros (Kimura 2) para gerar a matriz de distância genética necessária para a construção da árvore filogenética (KIMURA, 1980; PINTEIRO et al., 2005).

Para os dois fragmentos houve o agrupamento de seis populações silvestres e de cinco colônias de laboratório (Figs. 12 e 13), porém nem sempre com valores de bootstrap significativos, mesmo assim o resultado está em consonância com os obtidos ao se concatenar o COI e Cytb (Fig. 14).

VI. CONCLUSÃO

- A morfometria clássica mostrou que há diferença entre machos e fêmeas das colônias silvestres e de laboratório

- A morfometria geométrica apresenta diferenciações de colônias silvestres para colônias de laboratório nos três aspectos analisados: centroide, variação canônica e dos componentes principais.

- 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.

- Pelas análises feitas, não foram observadas mudanças no genótipo das colônias silvestres e de laboratório.

REFERÊNCIAS

ARGOLO, A. M.; FELIX, M.; PACHECO, R.; COSTA, J. **Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil**. Rio de Janeiro: Imperial Novo Milênio Gráfica e Editora, 2008. 63 p.

BARGUES, M. D.; MAS-COMA, S. Phylogenetic Analysis of Lymnaeid Snails Based on 18s rDNA Sequences. **Mol. Biol**. **Evol.** v. 14, n. 5, p. 569-577, 1997.

CARCAVALLO, R.U. et al. Nova espécie do complexo oliverai (nova denominação para o complexo matogrossensis) (*Hemiptera, Reduvidae, Triatominae*) do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, n.1,p.71-79,2001.

CARCAVALLO, R.U.; JUBERG, J. T. baratai sp.n. do Estado do mato Grosso do Sul, Brasil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Entomol. Vectors**, v.7, p. 373-387, 2000.

CARDOZO DE ALMEIDA, M.; NEVES, S.C.; ALMEIDA, C.E.; LIMA, N.R.; OLIVEIRA, L.M.; SANTOS MALLET, J.R.; GONÇALVES, T.C. Biology of Triatoma carcavalloi Juberg, Rocha & Lent 1998 under laboratory conditions. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**. v.47, n.3, p.307-312, 2014.

CHAGAS, C.J.R. Nova tripanossomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n.sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.1, p.159-218, 1909.

DUJARDIN, J.P. et al. Changes in the sexual dimorphism of Triatominae in the transition from natural to artificial habitats. **Mem.Inst. Oswaldo Cruz**, v.94, p.565-569, 1999.

FIOCRUZ. **Doença de Chagas.** Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: http://agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7a-de-chagas. Acesso em: 11 jan. 2016.

FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH,W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c ocidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Mol Mar Biol Biotechnol**, 1994.

FRAIHA NETO, H.; VALENTE, S.A.S.; VALENTE, V.C.; PINTO, A.Y.N. Doença de Chagas - Endêmica na Amazônia. **An. Acad. Med.** (Pará), v. 6, p. 53-57, 1995.

JUBERG, JOSÉ ET AL. Triatoma pintodiasi sp. Nov. do subcomplexo T. rubrovaria(Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Rev. Pan-Amaz Saúde**, v. 4, n.1, p.43-56, 2013.

JUNQUEIRA, C. V.; DEGRAVE, W.; BRANDÃO, A. Minicircule organizarion and diversity in T*rypanosoma cruzi* populations. **Trends. Parasitol**., v. 21(6), p. 270-272, 2005.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substituions through comparatative studies of nucleotide sequences**. J Mol Evol** v16, n.2, p. 111-20, Dec 1980. ISSN 0022-2844.

LEWINSOHN R 2005. Do caldo de cana ao suco de açaí. **Jornal da Unicamp** *283*: 2p.

LYMAN, D. F. et al. Mitochondrial DNA sequence variation among triatomine vectors of Chagas disease. ***Am. J. Trop. Med. & Hyg***. v. 60, p. 377-386, 1999.

MARTINS, P. A. M., 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. ***Rev. Soc. Bras. Med. Trop***. *v. 39, n.* 2, p. 198-202, 2006.

MELLO, FERNANDA DE & FIGUEIREDO, MARIA ISABEL. **Guia de Identificação de Triatomíneos do Rio Grande do Sul**, 2013.

MONTEIRO FA, BARRETT TV, FITZPATRICK S, CORDÓN- ROSALES C, FELICIANGELI D BEARD CB 2003. Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. ***Mol Ecol*** *12*: 997-1006.

NOIREAU, F.; DIOSQUE, P., JANSEN, A. M. Trypanosoma cruzi: adaptation to 32 its vectors and its hosts. **Veterinary Research**, v.40, n.2, p.26, 2009.

PINTEIRO,L.C. et al. Técnicas Algorítmicas para Construção de Árvores Filogenétticas. **Revista Científica da Faculdade Lourenço Filho**, v.4, n.1, 2005.

PINTO AYN, VALENTE SAS, VALENTE VC, FERREIRA-JUNIOR AG, COURA JR 2008. Fase aguda da doença de Chagas na Amazônia brasileira. Estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 2005. ***Rev Soc Bras Med Trop*** *41*: 602-614.

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). **Rev. Saúde Pública** v. 34, n.5, p. 538-542, 2000.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2 nd ed. Cold Soring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Vol 1,2 and 3, 1989

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

STEINDEL, M.; PACHECO, L.K.; SCHOLL, D.; SOARES, M.; MORAES, M.H.; EGER, I.; KOSMANN, C.; SINCERO, T.C.M.; STOCO, P.H.; MURTA, S.M.F.; PINTO, C.J.C. & GRISARD, E.C. Characterization of Trypanosoma cruzi isolated from humans, vectores, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis**. 2008.

VALENTE SAS, VALENTE VC, FRAHIA NETO H 1999. Considerations on the epidemiology and transmission of Chagas`disease in the Brazilian Amazon. ***Mem Inst Oswaldo Cruz*** *94*: 395-398.

WHO. Doença de Chagas (tripanossomíase americana). **Geneva, 2016**. Disponível em: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html. Acesso em: 03 Ago. 2015.

CAPÍTULO II

Zootaxa 4107 (2): 239–254

ISSN 1175-5326 (print edition)

ZOOTAXA

ISSN 1175-5334 (online edition)

http://zoobank.org/urn:lsid:zoobank.org:pub:CDB726E6-8EA8-4034-B1A5-8417B2F497D5

Revalidation of Triatoma bahiensis Sherlock & Serafim, 1967 (Hemiptera: Reduviidae) and phylogeny of the T. brasiliensis species complex

VAGNER JOSÉ MENDONÇA[1,#], KAIO CESAR CHABOLI ALEVI[2], HELOISA PINOTTI[3], RODRIGO GURGEL-GONÇALVES[1], SEBASTIÁN PITA[4], ANA LETÍCIA GUERRA[2], FRANCISCO PANZERA[4], RENATO FREITAS DE ARAÚJO[5], MARIA TERCÍLIA VILELA DE AZEREDO-OLIVEIRA[2] & JOÃO ARISTEU DA ROSA[3]

[1]Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores, Área de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte. Brasília, Distrito Federal, Brasil. CEP: 70910-900, Tel: +55 61 31071746. E-mail: vag.mendoca@gmail.com

[2]Laboratório de Biologia Celular, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE/UNESP São José do Rio Preto/SP. E-mail: kaiochaboli@hotmail.com

[3]Laboratório de Parasitologia, Depto. Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – FCF/UNESP Araraquara/SP. E-mail: joaoaristeu@gmail.com

[4]Sección Genética Evolutiva, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. E-mail: fcopanzera@gmail.com

[5]Secretaria Estadual de Saúde da Bahia – SESAB/Divisão de Entomologia, Salvador/BA. E-mail: birdeagle01@yahoo.com.br

[#]Corresponding author: E-mail: vag.mendoca@gmail.com

Abstract

Triatoma bahiensis Sherlock & Serafim, 1967, T. lenti Sherlock & Serafim, 1967, and T. pessoai Sherlock & Serafim,

1967 were described based on material collected in the Brazilian state of Bahia. These species were later included in the T. brasiliensis complex based on their geographic distribution. Triatoma

bahiensis and T. pessoai were subsequently syn- onymized with T. lenti. However, the phylogenetic position of T. lenti within the T. brasiliensis complex has remained doubtful. This study aims to assess the taxonomic status of T. bahiensis and to infer the phylogenetic relationships between T. lenti, T. bahiensis and the other members of the T. brasiliensis species complex. The identities of the species in concern were confirmed by comparisons with high resolution photos of the respective type materials; lectotypes are designated for T. pessoai and T. bahiensis. Morphological, morphometric, molecular, and cytogenetic approaches as well as experimental crosses were used. The low viability of experimental crosses combined with morphological and morphometric data allow the differentiation of T. bahiensis and T. lenti. Pairwise cyt b sequence divergence between T. lenti and T. bahiensis was
2.5%. Cytogenetic and molecular analyses grouped T. lenti and T. bahiensis as members of the T. brasiliensis complex. These results revalidate the specific status of T. bahiensis.

Key words: Triatominae, taxonomy, morphology, experimental crosses, Chagas'
disease vectors

Introduction

Trypanosoma cruzi (Chagas, 1909), the etiological agent of Chagas disease, is a parasite mainly transmitted by blood-sucking bugs of the subfamily Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) (Chagas 1909, WHO 2013). To date,
150 valid species have been described as part of this subfamily, including two fossils (Poinar Jr. 2005, 2013, Justi et al. 2014). Accurate vector identification is crucial for Chagas disease control and surveillance programs (Monteiro et al. 2001, Vinhaes et al. 2014).

In a triatomine survey carried out in the Brazilian state of Bahia between 1957 and 1971, Sherlock and Serafim (1967) described Triatoma bahiensis Sherlock & Serafim, 1967, T. lenti Sherlock & Serafim, 1967, and T. pessoai Sherlock & Serafim, 1967. The differences among them were based on the size and color of the connexivum: T. pessoai possesses large connexivum with red spots, T. lenti a small connexivum with yellow spots, and T. bahiensis

Accepted by D. Redei: 24 Mar. 2016; published: 2 May 2016

a medium-sized connexivum with orange-red spots, a color in between that of the other two species. Furthermore,

T. bahiensis presents two spots on each side of the corium, a pattern which is not present in T. pessoai or T. lenti.

The description of T. bahiensis was based in an uncertain number of specimens captured in the city of Seabra, while T. lenti and T. pessoai were found in intradomiciliary environments in the cities of Brotas de Macaúbas, Ipupiara, and Macaúbas. Based on their geographic distribution in northeastern Brazil, T. lenti, T. pessoai and T. bahiensis were included into the T. brasiliensis complex by Lucena (1970). A few years later, T. bahiensis was determined to be a variety of T. pessoai (Sherlock & Serafim 1972) and subsequently, morphological and morphometric analyses concluded that T. pessoai (= T. pessoai var. bahiensis) was a synonym of T. lenti (Lent & Wygodzinsky 1979). After the synonymy between them, Schofield and Galvão (2009) were the first to cite T. lenti as a member of the T. brasiliensis subcomplex. However, no study has been performed to confirm this phylogenetic position.

Based on morphological (Costa et al. 1997a, 2013) and biological data (Costa & Marchon-Silva 1998), experimental crosses (Costa et al. 2003b), ecological (Costa et al. 1998, 2002), genetic (Panzera et al. 2000), biogeographic (Costa et al. 2014), and molecular analyses (Costa et al. 1997b, Monteiro et al. 2004, Mendonça et al. 2009), the T. brasiliensis complex is considered to be a monophyletic group composed by T. b. brasiliensis Neiva, 1911, T. b. macromelasoma Galvão, 1956, T. juazeirensis Costa & Félix, 2007, T. melanica Costa et al. 2006, and T. sherlocki Papa et al. 2002. However, recent cytogenetic analyses (Alevi et al. 2012, 2013, 2014) and experimental crosses (Mendonça et al. 2014) suggest that T. lenti could also be a member of the T. brasiliensis complex.

In addition, Sherlock and Serafim (1967) did not designate holotypes for T. lenti, T. pessoai and T. bahiensis. They determined 20 "cotypes" for each of the first two species, which should all be considered syntypes. As for T. bahiensis, the same authors did not mention any kind of "types". They described one male specimen, but presented drawings of the female genitalia, therefore the number of specimens originally studied is uncertain and they should also be collectively considered syntypes. Gonçalves et al. (1993) and Rodrigues et al. (2015) misinterpreted this and, based on specimens labels, listed a holotype of T. lenti and paratypes of the three species from the Oswaldo Cruz Institute, which is incorrect (International Code of Zoological Nomenclature, Recommendation 73F, Article 73.2)

A triatomine survey carried out in the south-central region of the Brazilian state of Bahia between 2008 and 2013 (Mendonça et al. 2015) revealed two specimens morphologically similar to T. bahiensis which were initially identified as T. lenti. These specimens have been kept in a colony and their descendants maintained the morphological characteristics of T. bahiensis initially described by Sherlock and Serafim (1967). Because T. lenti occurs in domiciliary units in Bahian municipalities and could represent a threat as a vector of T. cruzi (Costa et al. 2003, Mendonça et al. 2015), it is important to reassess its taxonomic status.

Thus, this study aims to i) check for the specific status of T. bahiensis using distinct

REVALIDATION OF TRIATOMA BAHIENSIS Zootaxa 4107 (2) © 2016 Magnolia Press MENDONCA ET AL. 70

taxonomic tools (morphological, morphometric, experimental crosses, and cytogenetic approaches) and ii) determine whether T. lenti and T. bahiensis are members of the T. brasiliensis species complex through phylogenetic analyses based on mtDNA sequencing.

Methods

Specimens. Collecting sites were located in the cities of Caturama (13°08.847'S; 42°21.284'W), Ibipitanga (12°58.039'S; 42°19.728'W), Macaúbas (12°58.698'S; 42°50.451'W), and Seabra (12°21.911'S; 42°13.415'W). These cities are within the physiographic region known as the Serra Geral, which is part of the Chapada Diamantina mountain rage in the south-central region of the Brazilian state of Bahia. Bugs were collected during manual searches in intradomiciliary, peridomiciliary, and sylvatic environments. Twenty-four sites (which included neighborhoods, rural areas, and villages) were surveyed in four municipalities (Mendonça et al. 2015).

The identity of the recently collected specimens was confirmed by comparisons with high resolution photos of type-specimens of T. lenti, T. pessoai and T. bahiensis (Fig. 1). These photos were obtained from the Triatomines Collection of the Oswaldo Cruz Institute (CTIOC), where most of the material examined by Sherlock and Serafim (1967) was deposited. Considering the substandard type-handling by these authors, lectotypes have been selected among the syntypes of T. pessoai and T. bahiensis in order to enhance the stability of nomenclature. In the case of T. lenti, the wrong use of the term "holotype" by Gonçalves et al. (1993) fulfills the requirements of the International Code of Zoological Nomenclature, Article 74.5. Therefore, the specimen selected by them must be considered the lectotype of the species, and there is no need for a new designation.

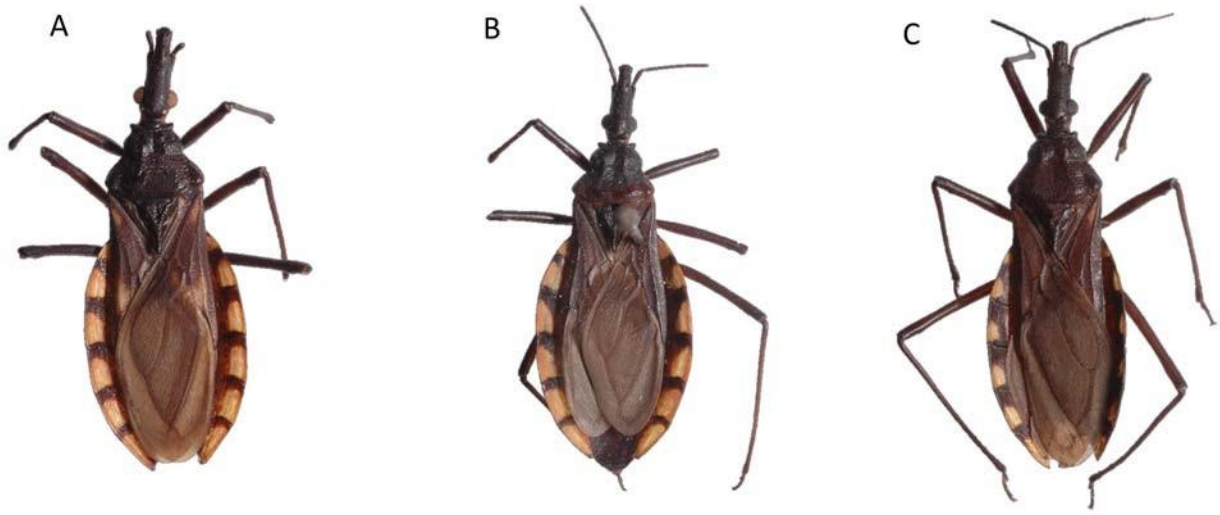

FIGURE 1. Type-material analyzed in the present study. A. Triatoma bahiensis Sherlock & Serafim, 1967, revalidated. B. Triatoma pessoai var. bahiensis Sherlock & Serafim (1972). C. Triatoma lenti.

Specimens morphologically similar to T. bahiensis were collected in rural areas within

Caturama, Ibipitanga, and Macaúbas, but only two specimens from Macaúbas collected by our team in peridomiciliary environments in the rural area known as Cana Brava were analyzed, as well as 222 T. lenti specimens collected in the same area. Both species have been kept in the colony at the Triatomine Insectarium of the School of Pharmaceutical Sciences within São Paulo State University (FCFAR/UNESP) in the city of Araraquara, São Paulo, Brazil, since 2009. The specimens of these colonies were used in morphological, morphometric and experimental cross studies, as described below.

Morphological analysis. Scanning electron microscopy (SEM) was used for the morphological analyses of the eggs (n=10), scutellum (n=5), and thorax (n=1) from each species. Specimens were examined under a Topcon SM-300 microscope at the Chemical Institute of UNESP Araraquara. The samples were fixed on aluminum stubs, washed, dehydrated in an alcohol series, and oven dried at 50°C. Sputtering metallization was then performed for 2 minutes at 10 mA (Rosa et al. 2012).

Morphometric analysis. A Leica MZ APO stereomicroscope equipped with an imaging system (Motic Advanced 3.2 plus) was used for the measurement and description of morphological characters of T. lenti and T. bahiensis. Linear measurements (length of the head, thorax, abdomen, rostral segments, and inner distance between the eyes) were taken from 30 adult specimens (15 females and 15 males). Egg characteristics (length of eggshells, diameter and area of the opercular opening) were registered from 30 T. lenti and T. bahiensis eggshells (Frías- Lasserre 2010, Rosa et al. 2012, Gonçalves et al. 2013).

In addition, seven wing landmarks, which were venation intersections or type I landmarks according to Bookstein (1990), were used in geometric morphometric analyses of T. bahiensis (n=49) (Fig. 2) and T. lenti (n=46). Landmark coordinates were recorded using tpsDig Version 1.18 (Rohlf 1999a). Centroid size, an isometric size estimator derived from coordinate data (Bookstein 1990) was used to analyze wing size variation. The generalized procrustes analysis superimposition algorithm was used to obtain the shape variables (Rohlf 1996). A consensus configuration was derived from raw coordinate data based on least-squares iterative method, and 'partial warps' were computed as deformations of each individual structure compared to the consensus configuration. Deformation components (uniform and non-uniform) were computed and tested for variation using tpsRelw 1.18 (Rohlf 1999b). The variables, which were derived from partial warps, were used in multivariate discriminant function analysis. A factor map of the first two canonical factors was used to illustrate the main results. Size variation between species was explored by means of Student's t-tests. Finally, we measured the contribution of size to shape variation (allometry) using multiple regression of shape discriminant factors against centroid size values.

REVALIDATION OF TRIATOMA BAHIENSIS Zootaxa 4107 (2) © 2016 Magnolia Press MENDONÇA ET AL. 72

Discriminant function analysis, multiple regression analysis and Student's t-tests were computed using Statistica® (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, U.S.A.).

FIGURE 2. Right wing of Triatoma bahiensis with the seven landmarks used in morphometric analysis. Following Bookstein (1990), all points correspond to type I landmarks (venation intersections).

Experimental crosses. Triatoma lenti and T. bahiensis were crossed in both directions: T. lenti female × T. bahiensis male and T. bahiensis female × T. lenti male. The insects were sexed as nymphs in the fifth instar, and males and females were kept apart until they reached the adult stage to cross virgin adults. For those crosses, five couples from each set were placed in plastic jars (5 cm in diameter x 10 cm in height) and kept at room temperature.

The fertility rate and oviposition were calculated from each cross (Correia et al. 2013). The eggs were collected daily throughout the females' oviposition period. Viable F1 offspring was kept into the adult stage following Mendonça et al (2014). Parental lineages of the colonies of T. lenti and T. bahiensis kept in the Triatomine Insectarium of UNESP were observed as a parameter for qualitative comparisons.

Cytogenetic analysis. Seminiferous tubules of five adult males of T. bahiensis were shredded, squashed, and fixed onto a cover slip in liquid nitrogen. They were then stained using the C-banding cytogenetic technique modified for triatomine chromosomes (Panzera et al. 1995). Microscope images were obtained under a Nikon Eclipse 80i microscope with a Nikon DS-5Mc-U2 digital cooled camera using Nikon Nis Elements 3.1 Advanced Research software.

Phylogenetic analysis. Total genomic DNA was extracted with standard phenol/chloroform technique (Sambrook et al. 1989) from three individuals of T. lenti and T. bahiensis collected from Macaúbas. A 690-bp fragment of the mitochondrial (mt) cytochrome b gene (Cyt b) was PCR-amplified (Lyman et al. 1999). Amplicons were purified using GFX PCR DNA and a Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Inc.). Both strands were used in Sanger sequencing reactions (ABI Prism® BigDye® Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems) and run on an ABI 3730 sequencer. Consensus sequences were edited with the BioEdit program and aligned with the Clustal W program using default parameters (Thompson et al. 1994, Hall 1999).

The sequences of T. lenti (KT347299) and T. bahiensis (KT347298) were aligned with some fragments downloaded from GenBank from several species within the T. brasiliensis complex (T. brasiliensis AY494160, T. b. macromelasoma AY336526, T. melanica AY336527, T. juazeirensis AY494168, and T. sherlocki EU489058), and T. dimidiata (Latreille, 1811) JN585905 and T. infestans Klug, 1834 EF639038 were added to the sequence alignment as the outgroup to root the phylograms.

The dendrogram was constructed using Bayesian analysis and clade support was estimated using a Markov chain Monte Carlo algorithm (MCMC) performed in the MrBayes software (Huelsenbeck & Ronquist 2001). The first analysis was run for 5,000,000 generations, with sampling of every 1000 generations. Estimates of likelihood settings were calculated using jModelTest (Posada 2008), and the Akaike information criterion (AIC) was chosen to obtain the best model to be applied to the gene fragment. The general model of DNA substitution with gamma- distributed rate variation across sites (TIM2+ILsetnst=6 rates=equal) was used, with two substitution types that distinguish only between transitions and transversions (nst=2).

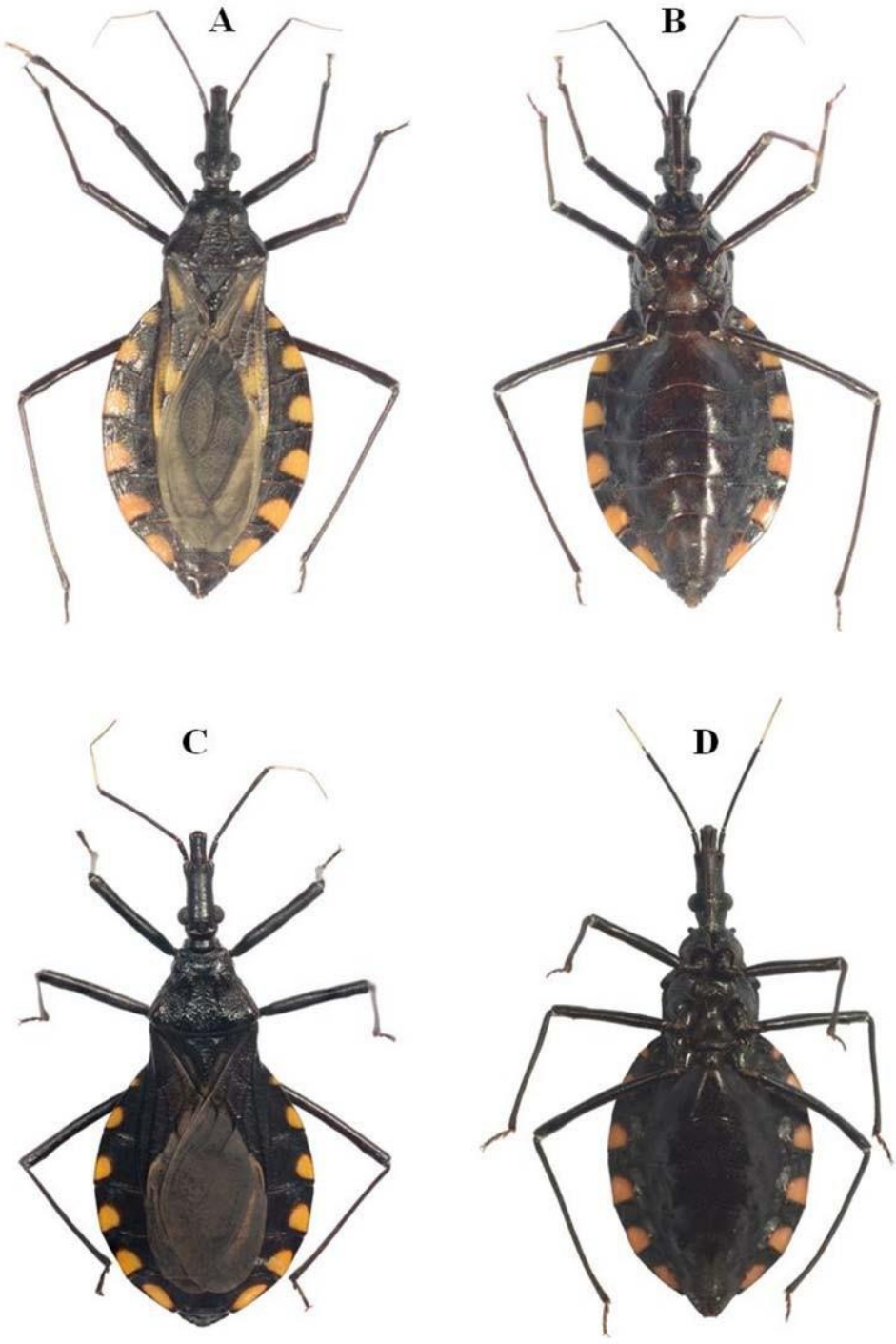

FIGURE 3. A—Triatoma bahiensis female, dorsal view; B—Triatoma bahiensis female, ventral view; C—Triatoma lenti female, dorsal view; D—Triatoma lenti female, ventral view.

Results

Triatoma bahiensis Sherlock & Serafim, 1967, valid species

Triatoma pessoai var. bahiensis: Sherlock & Serafim (1972). Triatoma lenti: Lent & Wygodzinsky (1979) (synonym).

Specimens. Type material examined: Triatoma pessoai. Lectotype (present designation): BRAZIL,Bahia: Ipupiara, collector unknown, 1966, one male (antennae and legs partially broken off) (genitalia in slide, missing), Triatoma pessoai det. I. Sherlock III/1967 (CTIOC #3330, Fig. 1). Triatoma bahiensis. Lectotype (present designation): BRAZIL, Bahia: Seabra, collector unknown, 1960, one male (antennae and legs partially broken off) (genitalia in slide, missing), Triatoma bahiensis det. I. Sherlock III/1967 (CTIOC #3338, Fig. 1). Triatoma lenti. Lectotype (Gonçalves et al. 1993): BRAZIL, Bahia: Macaúbas, N. P. B. col., X/1966, one male (antennae and legs partially broken off) (genitalia in slide, missing), Triatoma lenti det. I. Sherlock X/1967 (CTIOC # 3334, Fig. 1).

Additional material examined: BRAZIL, Bahia: Macaúbas, J. G. Nogueira col., 08/IX/2009, one female and one male. Caturama, S. L. Costa col., 20/X/2012, one female. Ibipitanga, S. L. Costa col., 15/III/2013, one male.

Diagnosis. Triatoma bahiensis (Figs. 1, 3A–B) is black with orange-red spots on the connexivum that are greater than those of T. lenti (Figs. 1, 3C–D). The hemyelitrum of T. bahiensis presents discoidal cells black, does not reach the apex of the abdomen and possesses two orange-red spots on each side of the corium (Figs. 1, 3A–B), whereas the hemyelitrum of T. lenti is totally black without spots in the corium.

Morphological analysis. The exochorial cells of T. bahiensis eggs (Fig. 4A) revealed a higher quantity of pores than those of T. lenti (Fig. 4B). These pores are concentrated in the central region of T. bahiensis egg cells (Fig. 4A), while in T. lenti the pores are uniformly distributed and also found on egg cell borders (Fig. 4B).

The posterior portion of the central depression of the scutellum is rounded in T. bahiensis (Fig. 4C) and tapered in T. lenti (Fig. 4D). The first abdominal segment has two lateral prominences in T. bahiensis (Fig. 4C). These prominences are absent in T. lenti (Fig. 4D).

Morphological analysis of the ventral thorax showed that the anterior region of the prothorax (near the stridulatory sulcus) in T. lenti presents a depression (Fig. 5D), which is absent in T. bahiensis (Fig. 5A). Furthermore, the stridulatory sulcus of T. bahiensis (Fig. 5A) is narrower than that of T. lenti (Fig. 5D). In T. bahiensis, the posterior region of the stridulatory sulcus has rounded and well-defined edges (Fig. 5A), whereas in T. lenti this region has rough edges (Fig. 5D).

The mesothorax of T. bahiensis has a central longitudinal projection that is rectangular in shape

Zootaxa 4107 (2) © 2016 Magnolia Press MENDONCA ET AL. 76

(Fig. 5B). In T. lenti, however, the mesothorax is smooth and rounded (Fig. 5E). No distinctive features were observed between the metathoraces of T. bahiensis and of T. lenti (Figs. 5C, F).

Morphometric analysis. All of the morphometric characteristics analyzed in males and females of T. bahiensis were smaller than those of T. lenti, except for the third segment of the proboscis, which is the same size in females of both species and larger in T. bahiensis males (Tables 1 and 2).

TABLE 1. Measurements (mm) of Triatoma lenti and T. bahiensis females captured in the city of Macaúbas, Bahia State, Brazil, and eggs.

	Triatoma lenti					Triatoma bahiensis				
	Min	Max	X	SD	S^2	Min	Max	X	SD	S^2
Length of head*	4.83	5.48	5.30	0.23	0.05	4.70	5.14	4.98	0.1	0.01
Length of thorax*	5.79	6.80	6.33	0.31	0.01	5.00	5.86	5.48	0.3	0.11
Length of abdomen*	13.13	15.01	13.94	0.65	0.42	11.0	13.0	12.40	0.6	0.38
Length of 1st rostral	1.47	1.82	1.61	0.11	0.01	1.38	1.75	1.53	0.1	0.01
Length of 2nd rostral	2.73	3.12	2.95	0.12	0.01	2.50	2.93	2.74	0.1	0.02
Length of 3rd rostral	1.20	1.31	1.24	0.03	0.00	1.17	1.35	1.24	0.0	0.00
Inner distance between eyes	1.33	1.43	1.37	0.03	0.00	1.27	1.44	1.34	0.0	0.00
Outer distance between	2.34	2.61	2.48	0.09	0.01	2.15	2.51	2.38	0.1	0.01
Length of eggshells*	2.27	2.73	2.50	0.11	0.01	1.88	2.17	2.04	0.0	0.00
Diameter of the opercular	0.72	0.82	0.76	0.03	0.01	0.62	0.78	0.71	0.0	0.00
Area of opercular opening*	0.40	0.52	0.46	0.03	0.01	0.30	0.47	0.40	0.0	0.00

*differences between species are significant (analysis of variance—$p < 0.05$); Max: maximum; Min: minimum; SD: standard deviation; S^2: variance; X: average.

TABLE 2. Measurements (in mm) of Triatoma lenti and T. bahiensis males captured in the city of Macaúbas, Bahia

State, Bazil.

	Triatoma lenti					Triatoma bahiensis				
	Min	Max	X	SD	S^2	SD	S^2	Min	Max	X
Length of head*	4.56	5.31	5.12	0.19	0.04	4.54	5.07	4.85	0.16	0.03
Length of thorax	5.73	6.20	5.94	0.19	0.02	5.24	6.19	5.84	0.31	0.09
Length of abdomen*	11.89	14.27	13.6	0.63	0.36	11.44	13.3	12.64	0.55	0.30
Length of 1st rostral	1.39	1.73	1.59	0.08	0.00	1.42	1.66	1.52	0.08	0.01
Length of 2nd rostral	2.61	3.02	2.85	0.13	0.02	2.53	2.93	2.78	0.13	0.02
Length of 3rd rostral	1.10	1.27	1.19	0.05	0.00	1.18	1.33	1.26	0.05	0.00
Inner distance between	1.17	1.34	1.25	0.04	0.00	1.16	1.32	1.23	0.05	0.00
Outer distance between	2.23	2.53	2.40	0.08	0.00	2.23	2.50	2.35	0.09	0.01

*differences between species are significant (analysis of variance—$p < 0.05$); Max: maximum; Min: minimum; SD:

standard deviation; S^2: variance; X: average

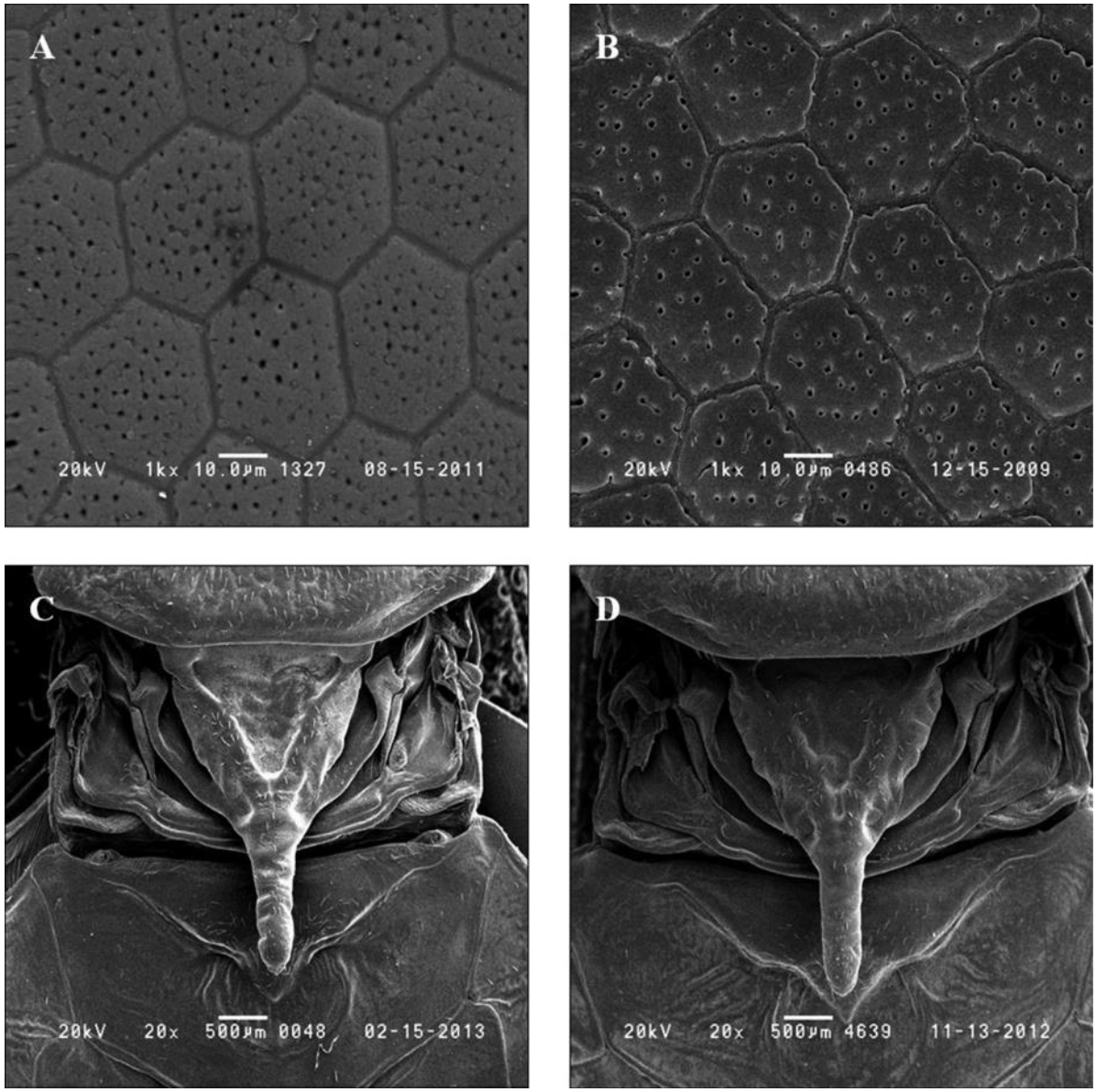

FIGURE 4. Egg exochorion detail via scanning electron microscopy in A—T. bahiensis and B—T. lenti. Scutellum detail via scanning electron microscopy in C—T. bahiensis and D—T. lenti.

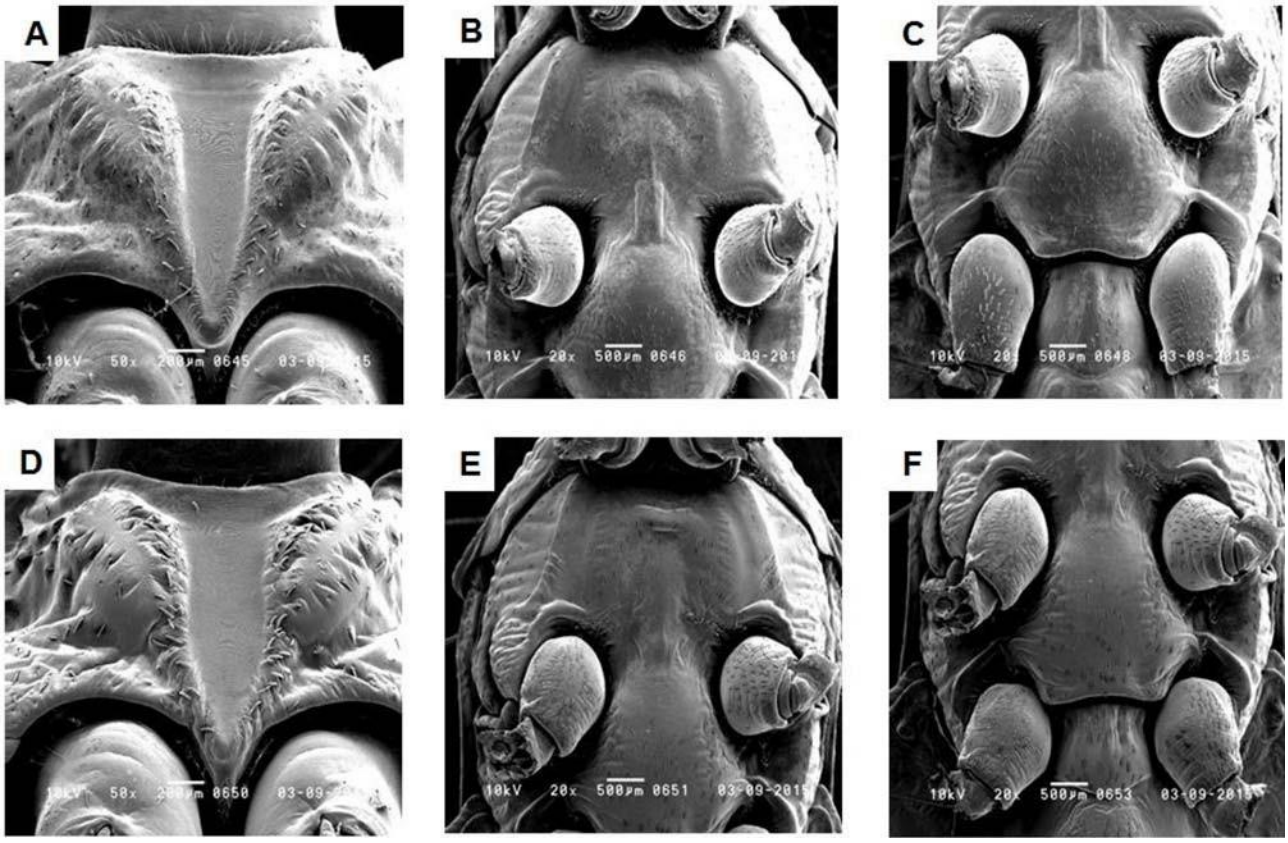

FIGURE 5. Ventral view of T. bahiensis: A—prothorax, B—mesothorax and C—metathorax; Ventral view of T. lenti: D—prothorax, E—mesothorax and F—metathorax

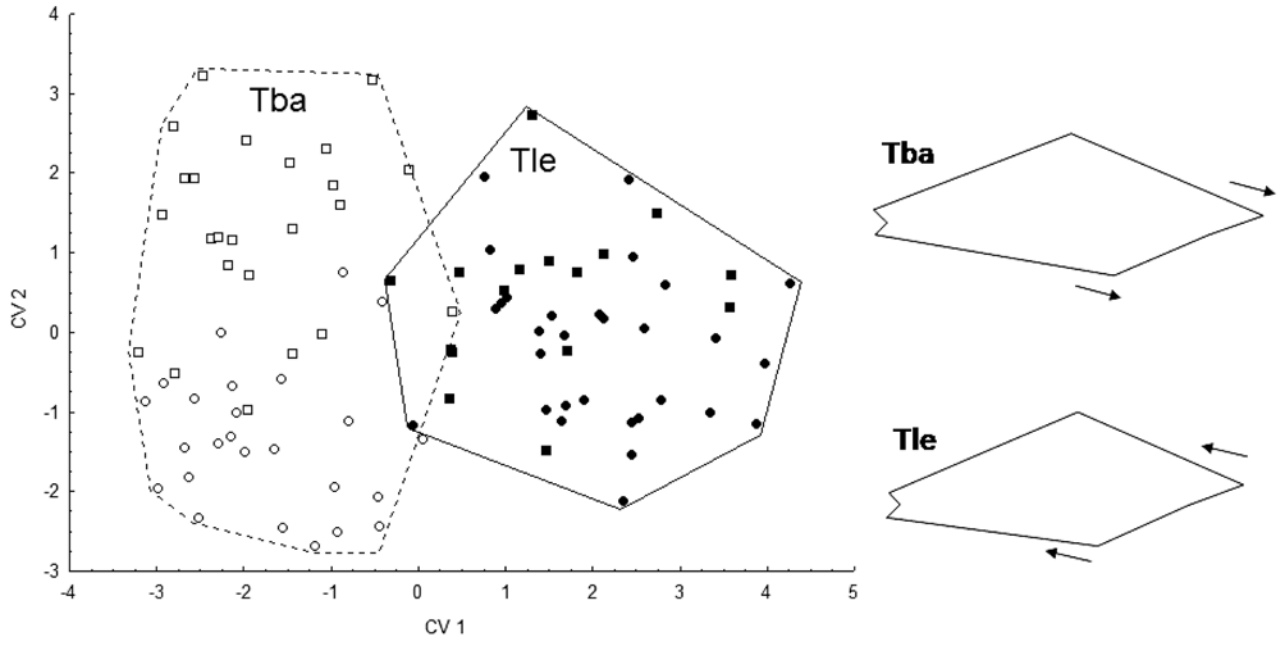

FIGURE 6. Factorial maps in the plane of the two discriminant factors of wing shape variation (canonical variables 1 and 2, or CV1 and CV2) presenting the distribution of specimens of Triatoma bahiensis (Tba, dashed polygon, open symbols) and Triatoma lenti (Tle, black polygon, closed symbols). Males are represented by squares and females are represented by circles. Drawings to the

right of the plot show the consensus conformation of the wings of the species (see landmarks in Fig. 2). Arrows indicate the differences in wings of both species (see text for details).

Wings of T. bahiensis were smaller than those of T. lenti ($p<0.01$). The first two discriminant factors explained

76% and 21% of wing shape variation, respectively. Triatoma lenti and T. bahiensis were well separated in discriminant function analysis plots, and wing shape differences between species were evident, T. lenti wings being narrower than in T. bahiensis (Fig. 6). No allometric effects were observed on the regression analyses between shape variables and size of wings ($R^2 = 0.01$, $p = 0.94$).

Experimental crosses. Triatoma bahiensis female × T. lenti male: out of 5 couples crossed, four produced

fertile eggs and only 4% reached adulthood (Table 3). The F1 egg hatching rate was 81.3%, but the coupling did not produce adults (F2 generation).

TABLE 3. Results of experimental crosses between T. bahiensis and T. lenti.

Generation	T. bahiensis female x T. lenti male			T. lenti female x T. bahiensis male		
	Nº of eggs laid	Nº of eggs hatched (%)	Nº of adults (%)	Nº of eggs laid	Nº of eggs hatched (%)	Nº of adults (%)
F1	271	70 (25.8)	11 (4)	239	84 (35.1)	2 (0.8)
F2	107	87 (81.3)	-	-	-	-

Triatoma lenti female × T. bahiensis male: only one of the five couples produced fertile eggs; only two eggs reached adulthood (Table 3). No eggs were generated from this offspring. Despite the low egg viability in both experimental crosses, no abnormalities were found in the hybrids.

Cytogenetic analysis. The analysis of the early first meiotic prophase I of T. bahiensis (Fig. 7A) revealed a large chromocenter made up of the association of both sex chromosomes plus two autosomal pairs (arrow) and many heterochromatic blocks arranged inside the nucleus (arrowheads). In the diplotene stage (Fig. 7B), T. bahiensis presented an association between two autosomal bivalents (arrowheads) with sex chromosomes (arrow). In diakinesis or in later diplotene (Fig. 7C), this species presented ten autosomal bivalents and two (XY) sex chromosomes with heterochromatic blocks in one or both chromosomal ends of the autosomes. Note that the Y sex chromosome (arrow) is larger and more heterochromatic that the X chromosome.

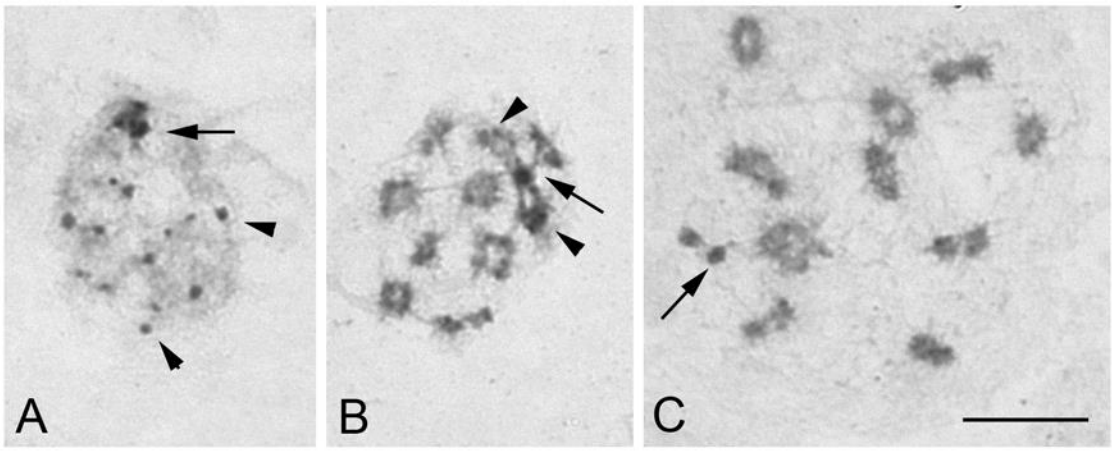

FIGURE 7. Triatoma bahiensis (2n= 22 chromosomes), male meiosis, C-banding. (A) Early first meiotic prophase: several heterochromatic chromocenters spread in the nucleus (arrowheads). A large chromocenter consists of the association of sex chromosomes plus autosomal bivalents (arrow). (B) Diplotene stage: the association between two autosomal bivalents (arrowheads) with associated sex chromosomes (arrow) is observed. (C) Diakinesis or later diplotene: ten bivalents and both sex chromosomes (XY) are clearly identified. The Y chromosome is entirely C-heterochromatic (arrow) and the X chromosome is euchromatic.

Phylogenetic analysis. The three specimens studied of each species did not present intraspecific variability. The comparison of Cyt b gene fragments between T. lenti and T. bahiensis revealed 17 variable sites, and pairwise sequence divergence was 2.5% (Table 4). This value is higher than that found for T. b. brasiliensis and T. b. macromelasoma (2.0%), and it is close to the value found for the T. lenti and T. melanica (2.7%). Bayesian analysis grouped T. lenti, T. bahiensis, and T. melanica into a monophyletic clade (Fig. 8). The other species of the T. brasiliensis complex are located in another clade. Phylogenetic analysis of T. lenti and T. bahiensis with T. melanica suggests that T. bahiensis and T. lenti represents two new members of the T. brasiliensis complex. Furthermore, the value of genetic distance between T. lenti and T. bahiensis support the revalidation of T. bahiensis. The sequence analysis of T. lenti and T. bahiensis with other species of the T. brasiliensis complex revealed 75 variable sites and three autapomorphies for T. bahiensis. All branches of the clade had 100% supports.

TABLE 4. Pairwise distance genetic among the T. brasiliensis complex members and T. dimidiata and T. infestans.

Species	1	2	3	4	5	6	7	8
1. T. bahiensis								
2. T. lenti	0.0248							
3. T. sherlocki	0.0901	0.0856						
4. T. melanica	0.0338	0.0270	0.0901					
5. T. b. brasiliensis	0.1014	0.0991	0.1194	0.1036				
6. T. b.	0.1014	0.0991	0.1171	0.0991	0.0203			
7. T. juazeirensis	0.0991	0.1014	0.1081	0.1059	0.0878	0.0856		
8. T. infestans	0.1351	0.1216	0.1374	0.1329	0.1329	0.1351	0.1306	
9. T. dimidiata	0.1712	0.1689	0.1847	0.1779	0.1914	0.2005	0.2050	0.1667

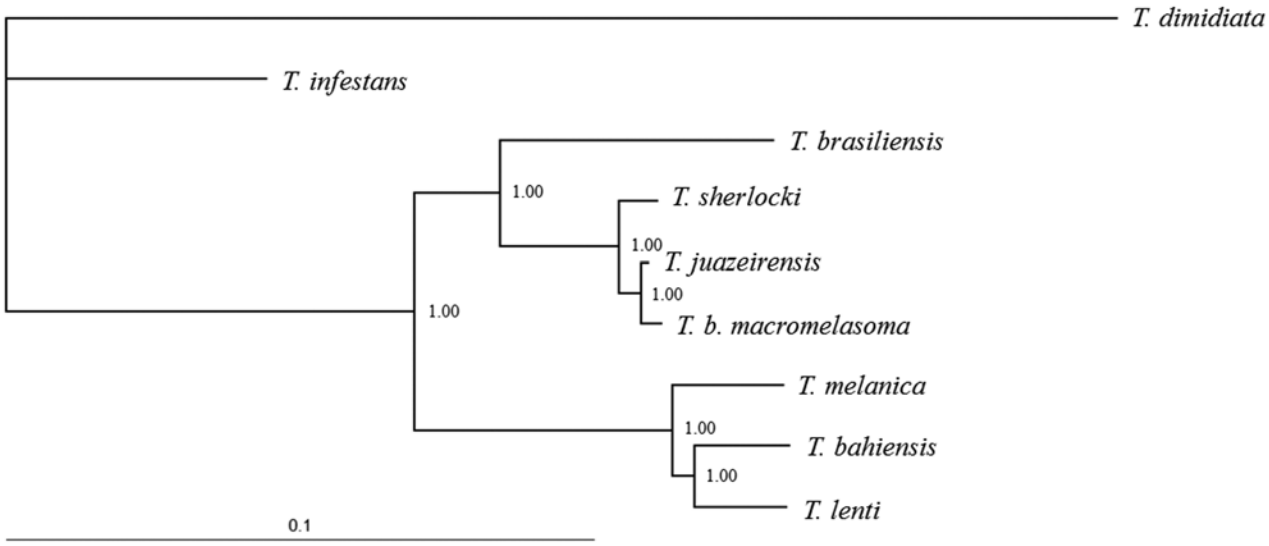

FIGURE 8. Bayesian inference consensus using a Markov chain Monte Carlo algorithm applied to mitochondrial sequences of Cyt b fragments of 510 bp. The values over the nodes refer to bootstrap value by maximum parsimony. T. dimidiata and T. infestans were used as outgroup. Accession code of GenBank in the text.

Discussio

n

Revalidation of T. bahiensis was based on an integrative assessment that included morphology, mtDNA sequencing, morphometrics, experimental crosses, cytogenetics, and qualitative phenotype traits. Moreover, phylogenetic analyses revealed that both T. bahiensis and T. lenti should be included as members of the T. brasiliensis complex, which is a monophyletic group proposed by Costa et al. (2013). The T. brasiliensis complex is now represented by T. b. brasiliensis, T. b macromelasoma, T. juazeirensis, T. melanica, T. sherlocki, T. lenti and T.bahiensis.

Previous analyses of morphometric and morphological characters, including male genitalia, were unable to separate T. bahiensis (= T. pessoai var. bahiensis), T. lenti, and T. pessoai (Lent & Wygodzinsky 1979). Thus, Lent & Wygodzinsky (1979) concluded that T. pessoai and T. bahiensis were synonyms of T. lenti, because the only differences observed (size and color variation in the connexival spots and corium) were within the limits commonly accepted among Triatoma species.

Although analysis of chromatic patterns has been widely proposed for taxonomic definition of triatomine species (Lent & Wygodzinsky 1979), including some members of the T. brasiliensis complex and T. phyllosoma complex, integrative taxonomy, which includes biological and phylogenetic approaches, is recommended to support new species description (Costa et al. 2006, Martinez et al. 2006, Costa & Felix 2007, Martínez-Ibarra et al. 2009, Rosa et al. 2012, Abad-Franch et al. 2013). In addition, phenotypic variability was already

observed and recorded in several triatomine species, as recently described in the T. brasiliensis complex (Costa et al. 2016), and also for Triatoma rubrovaria, T. pseudomaculata, Panstrongylus geniculatus, and several other species (Almeida et al. 2002, Lent & Wygodzinsky 1979). Therefore, the combination of independent taxonomic tools is crucial to avoid misidentifications.

Morphological and morphometric analyses are essential tools in species descriptions and validations (Rosa et al. 2012, Costa et al. 2013, Gonçalves et al. 2013, Jurberg et al. 2013). Although morphologically similar to T. lenti, T. bahiensis presents distinct characteristics. These include corium with two orange-red spots on each wing, a trait which can be used as diagnostic for species differentiation. The chromatic pattern was very important for initial studies on the T. brasiliensis complex, since the current species grouped by Costa et al. (2013) were previously considered to be only chromatic variations of T. brasiliensis (Lent & Wygodzinsky 1979, Costa et al. 2003). Later, Costa et al. (2006) raised the status of T. b. melanica to T. melanica. Costa & Felix (2007) then described T. juazeirensis, and Costa et al. (2013) redescribed T. b. macromelasoma.

Scanning electron microscopy revealed significant differences between T. bahiensis and T. lenti. Such differences could be observed in T. bahiensis egg exochorial cells which presented more pores than in T. lenti. The number of pores in exochorial cells of T. brasiliensis species complex is variable, being higher for T. melanica populations (Costa et al. 1997a, Costa et al. 2006). This species has pores distributed over the entire egg surface, similar to T. lenti, but with a higher number of pores. The posterior region of the central depression of the scutelum is rounded in T. bahiensis and tapering in T. lenti. Both characters are important tools for taxonomy and were used to differentiate R. montenegrensis Rosa et al. 2012 from R. robustus Larrousse, 1927. They have also proven to be useful for the characterization of other triatomine species (Rosa et al. 2012).

The ventral thoracic region, specifically the prothorax and mesothorax, showed significant morphological differences between T. bahiensis and T. lenti. The mesothorax of T. bahiensis has a central longitudinal projection that is rectangular in shape, unlike that of T. lenti, which is smooth and rounded. The use of this structure as a tool for taxonomy was applied with satisfactory results for the first time in this study.

Geometric morphometric techniques also allowed the distinction between T. bahiensis and T. lenti, and the first two discriminant factors explained 97% of wing shape variation. These techniques have been applied previously to compare shape differences among populations (Campos et al. 2011, Almeida et al. 2012), to support species descriptions, as in the case of T. jatai (Gonçalves et al. 2013) and R. montenegrensis (Rosa et al. 2012), and also to characterize hybrid forms (Martínez-Ibarra et al. 2011, Mendonça et al. 2014).

Hybridization between closely related triatomine species is a well-known phenomenon that has been detected both in nature and in experimental cross-mating (Usinger et al. 1966, Costa et al. 2003b, Pérez et al. 2005, Mas- Coma & Bargues 2009, Mendonça et al. 2014). Experimental crosses offer a powerful tool for determining isolating mechanisms that limit gene flow between species and also for establishing taxonomic status among putative cryptic species (Arnold 1997). In triatomines, experimental crosses have been performed to validate the specific status of T. petrochii Pinto and Barreto 1925 (Espínola 1971), T. sherlocki (Correia et al. 2013), and other species of the T. brasiliensis complex (Costa et al. 2003b, 2009), the T. phyllosoma complex (Martínez-Ibarra et al. 2009, 2011), and the T. dimidiata complex (García et al. 2013). Pre-zygotic barriers, such as the

incompatibility of genitalia (Mendonça et al. 2014) and gametes (Schreiber et al. 1974) as well as post-zygotic barriers, such as hybrid collapse (Mendonça et al. 2014) have been described in the subfamily Triatominae.

Though T. bahiensis females × T. lenti males resulted in limited reproductive success, the reciprocal crosses did not show the same pattern. The crosses between T. lenti females and T. bahiensis males resulted in high mortality before the offspring reached adulthood, and F2 generation did not produce eggs. Similar reproductive isolation was also reported between T. sherlocki and T. lenti (Mendonça et al. 2014). Although the experimental crosses have occurred in F1 adults, the levels of 4% and 0.8% of adult hybrids are negligible. Mendonça et al. (2014) demonstrated through chromosome analysis that the collapse of the hybrid event happens from the F2 cross between T. lenti and T. sherlocki. Perhaps the same phenomenon is occurring between T. lenti and T. bahiensis crosses, which present post-zygotic reproductive barriers that are manifested in both the small percentage of individuals that reached adulthood in F1 and their sterility. This sterility is likely to be associated with failures in the pairing of homologous chromosomes, which leads to the production of abnormal gametes, similar to the results observed among other triatomine hybrids (Pérez et al. 2005).

Heitzmann-Fontenelle (1984) carried out an experimental cross between a T. lenti male and T. brasiliensis female. The author noted that, of the 153 eggs produced, only 17 reached adulthood in F1. The hybrid viability (11%) between these species is higher than that observed in crosses between T. lenti and T. bahiensis. It is noteworthy that parental lineages of these species were viable producing at least 10 generations with high oviposition and fertility rates at the FCFAR/UNESP, São Paulo, Brazil, since 2009.

Cytogenetic analysis suggests that T. lenti (Alevi et al. 2012, 2013, 2014) and T. bahiensis are members of the T. brasiliensis complex, since they have the same chromosomal characteristics as those used for diagnosing the other members: 22 chromosomes (20A+XY), meiotic prophase with a main chromocenter constituted of both sex chromosomes, plus two pairs of autosomes and heterochromatic chromocenters dispersed in the nucleus, as well as the presence of a heterochromatic block in one or both chromosomal ends of all autosomes (Panzera et al. 2000, Alevi et al. 2013).

The phylogenetic analysis of T. bahiensis and T. lenti included seven species of the T. brasiliensis complex, plus T. dimidiata and T. infestans. The low genetic distance between T. bahiensis and T. lenti (2.5%) showing them as sister-species, forming a monophyletic clade with T. melanica (distance 2.7–3.3%, Table 4). Although a low genetic distance was found between T. lenti and T. melanica, both are well-defined and phenotypically distinct species. Similar data was found by García et al. (2001) in their analysis of mitochondrial genes (12S and 16S) from T. infestans, T. platensis Neiva, 1913, and T. delpontei Romaña & Abalos, 1947, which showed genetic distances ranged between 0.0–0.8%. Cytogenetic data suggested that T. infestans and T. platensis would be the most closely related (Panzera et al. 1995). Furthermore, complete interfertility between T. infestans and T. platensis has been observed, whereas only partial sterility was reported between T. platensis and T. delpontei (Abalos 1948, Pérez et al. 2005). Thus, low viability of experimental crosses here reported, in conjunction with morphological and morphometric data support the revalidation of the specific status T. bahiensis.

In the phylogeographic analysis of the T. brasiliensis complex, Monteiro et al. (2004) showed a greater genetic distance among the population "melanica" and the other members of that complex.

Furthermore, Mendonça et al. (2009) included T. sherlocki in the complex and positioned it as a sister species of T. melanica, in a clade separated of the other members of the complex. After the inclusion of T. lenti and T. bahiensis the present phylogenetic analysis showed two main clades, one composed of T. lenti, T. bahiensis, and T. melanica and another by T. sherlocki, T. b. brasiliensis, T. b. macromelasoma and T. juazeirensis.

The cryptic speciation phenomenon is relatively common in Triatominae (Monteiro et al. 2003, Rosa et al. 2012, Gonçalves et al. 2013, Jurberg et al. 2013). This evolutionary event results in species that are almost identical morphologically, which often makes identification based on morphological parameters alone very difficult. Thus, other tools are needed to characterize these taxa. Therefore, the morphological similarity between T. lenti and T. bahiensis, combined with their similar geographic distribution, may lead to the misidentification of these taxa. Specimens morphologically similar to T. bahiensis have been collected in rural areas within three municipalities (Caturama, Ibipitanga, and Macaúbas) where T. lenti may also occur. Currently, T. lenti is distributed in at least two states, Goiás and Bahia, in Cerrado and Caatinga ecoregions, respectively (Costa et al. 2003, Gurgel- Gonçalves et al. 2012). Future studies should revise the geographic limits and the vectorial competence of T. lenti and T. bahiensis.

Acknowledgements

To Salvador Lopes da Costa at the Bahia State Secretariat of Health (Secretaria de Saúde do Estado da Bahia), who provided the specimens T. lenti and T. bahiensis. Mario Cilense for his assistance with SEM, and Davi Antonio da Rosa for T. lenti and T. bahiensis photos and Drs. Cléber Galvão, Petr Kment, and Dávid Rédei that provided advice concerning zoological nomenclature. We also thank Dr. Cléber Galvão that provided the photos of T. bahiensis, T. lenti and T. pessoai and the reviewers of the manuscript. Financial support was provided by the Brazilian agency known as the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel, or CAPES (Ministry of Education, Brazilian Government, Brazil), process number 23038.005285/2011-12, and also by the FCF/UNESP-PADC. Cytogenetic analyses have been supported by project grant (no. 370) from the ‘‘Comisión Sectorial de Investigación Científica’’ (CSIC-Udelar-Uruguay) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Brazil) process number 2013/19764-0.

References

Abad-Franch, F., Pavan, M.G., Jaramillo, N., Palomeque, F.S., Dale, C., Chaverra, D. & Monteiro, F.A. (2013) Rhodnius barretti, a new species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) from western Amazonia. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 108, 92–99. http://dx.doi.org/10.1590/0074-0276130434.

Abalos, J.W. (1948) Sobre híbridos naturales y experimentales de Triatoma. Anales del Instituto de Medicina Regional, 2, 209-223.

Alevi, K.C.C., Mendonça, P.P., Pereira, N.P., Guerra, A.L., Facina, C.H., Rosa, J.A. & Azeredo-Oliveira, M.T.V. (2013) Distribution of constitutive heterochromatin in two species of triatomines: Triatoma lenti Sherlock and Serafim (1967) and Triatoma sherlocki Papa, Jurberg, Carcavallo, Cerqueira & Barata (2002). Infection, Genetics and Evolution, 13, 301–303. http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2012.11.011

Alevi, K.C.C., Mendonça, P.P., Succi, M., Pereira, N.P., Rosa, J.A. & Azeredo-Oliveira, M.T.V. (2012) Karyotype and spermatogenesis in Triatoma lenti (Hemiptera: Triatominae), a potential Chagas vector. Genetics and Molecular Research, 11, 4278–4284. http://dx.doi.org/10.4238/2012.December.17.3

Alevi, K.C.C., Rosa, J.A. & Azeredo-Oliveira, M.T.V. (2014) Cytotaxonomy of the Brasiliensis subcomplex and the Triatoma brasiliensis complex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Zootaxa, 3838, 583–589. http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.3838.5.7

Almeida, C.E., Oliveira, H.L., Correia, N., Dornak, L.L., Gumiel, M., Neiva, V.L., Harry, M., Mendonça, V.J., Costa, J. & Galvão, C. (2012) Dispersion capacity of Triatoma sherlocki, Triatoma juazeirensis and laboratory-bred hybrids. Acta Tropica, 122, 71–79. http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.12.001

Almeida, C.E., Pacheco, R.S., Noireau, F. & Costa, J. (2002) 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, 97 (6), 829–834.

Arnold, M.L. (1997) Natural Hybridization and Evolution. University Press, Oxford.

Bookstein, F.L. (1990) Introduction to methods of landmark data. In: Rohlf, F.J. & Bookstein, F.L. (Eds.), Proceedings of the Michigan morphometrics workshop. Special Publication number 2. The University of Michigan Museum of Zoology. Ann Arbor, pp. 215–225.

Campos, R., Botto-Mahan, C., Coronado, X., Jaramillo, N., Panzera, F. & Solari, A. (2011) Wing shape differentiation of Mepraia species (Hemiptera: Reduviidae). Infection, Genetics and Evolution, 11, 329–333. http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2010.11.002

Chagas, C. (1909) 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, 1, 159–218.

Correia, N., Almeida, C.E., Lima-Neiva, V., Gumiel, M., Lima, M.M., Medeiros, L.M.O., Mendonça, V.J., Rosa, J.A. & Costa, J. (2013) Crossing experiments confirm Triatoma sherlocki as a member of the Triatoma brasiliensis species complex. Acta Tropica, 128, 162–167. http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.06.019

Costa, J., Almeida, C.E., Dotson, E., Lins, A., Vinhaes, M.C., Silveira, A.C. & Beard, C.B. (2003) The epidemiologic importance of Triatoma brasiliensis as a Chagas disease vector in Brazil: a revision of domiciliary captures during 1993-1999. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 98, 443–449. http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762003000400002

Costa, J., Almeida, J.R., Britto, C., Duarte, R., Marchon-Silva, V. & Pacheco, R. (1998) Ecotopes, natural infection and trophic resources of Triatoma brasiliensis (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 93, 7–13. http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761998000100002

Costa, J., Almeida, C.E., Dujardin, J.P. & Beard, C.B. (2003b) Crossing experiments detect genetic incompatibility among populations of Triatoma brasiliensis Neiva, 1911 (Heteroptera, Reduviidae, Triatominae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 98 (5), 637–639

Zootaxa 4107 (2) © 2016 Magnolia Press MENDONCA ET AL. 87

Costa, J., Argolo, A. & Felix, M. (2006) Redescription of Triatoma melanica Neiva & Lent, 1941, new status (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Zootaxa, 1385, 47–58.

Costa, J., Bargues, M.D., Neiva, V.L., Lawrence, G.G., Gumiel, M., Oliveira, G., Cabello, P., Lima, M.M., Dotson, E., Provance, D.W. Jr., Almeida, C.E., Mateo, L., Mas-Coma, S. & Dujardin, J.P. (2016) Phenotypic variability confirmed by nuclear ribosomal DNA suggests a possible natural hybrid zone of Triatoma brasiliensis species complex. Infection, Genetics and Evolution, 37, 77–87. http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2015.10.025.

Costa, J., Barth, O.M., Marchon-Silva, V., Almeida, C.E., Freitas-Sibajev, M.G. & Panzera, F. (1997a) Morphological studies on the Triatoma brasiliensis Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae): genital structures and eggs of different chromatic forms. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 92, 493–498. http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761997000400009

Costa, J., Correia, N.C., Neiva, V.L., Gonçalves, T.C.M. & Felix, M. (2013) Revalidation and redescription of Triatoma brasiliensis macromelasoma Galvão, 1956 and an identification key for the Triatoma brasiliensis complex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 108, 785–789. http://dx.doi.org/10.1590/0074-0276108062013016

Costa, J., Dornak, L.L., Almeida, C.E. & Peterson, A.T. (2014) Distributional potential of the Triatoma brasiliensis species complex at present and under scenarios of future climate conditions. Parasites & Vectors, 7, 238. http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-7-238

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. http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762007000100015

Costa, J., Freitas-Sibajev, M.G., Marchon-Silva, V., Pires, M.Q. & Pacheco, R. (1997b) Isoenzymes detect variation in populations of Triatoma brasiliensis (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 92, 459–464. http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761997000400002

Costa, J. & Marchon-Silva, V. (1998) Período de intermuda e resistência ao jejum de diferentes populações de Triatoma brasiliensis Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Entomologia y Vectores, 5, 23–34.

Costa, J., Peterson, A.T. & Beard, C.B. (2002) Ecological niche modeling and differentiation of populations of Triatoma brasiliensis Neiva, 1911, the most important Chagas disease vector in northeastern Brazil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 67, 516–520.

Costa, J., Peterson, A.T. & Dujardin, J.P. (2009) Morphological evidence suggests homoploid hybridization as a possible mode of speciation in the Triatominae (Hemiptera, Heteroptera, Reduviidae). Infection, Genetics and Evolution, 9, 263–270.

http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2008.12.005

Espínola, H.N. (1971) Reproductive isolation between Triatoma brasiliensis Neiva, 1911 and Triatoma petrochii Pinto & Barreto, 1925 (Hemiptera Reduviidae). Revista Brasileira de Biologia, 31, 277–281.

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, 572–583. http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2010000400017

García, 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. http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585-38.5.675

García, M., Menes, M., Dorn, P.L., Monroy, C., Richards, B., Panzera, F. & Bustamante, D.M. (2013) Reproductive isolation revealed in preliminary crossbreeding experiments using field collected Triatoma dimidiata (Hemiptera: Reduviidae) from three ITS-2 defined groups. Acta Tropica, 128, 714–718. http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.09.003

Gonçalves, T.C.M., Almeida, M.D., Jurberg, J. & Lent, H. (1993) Lista dos exemplares-tipo de Triatomíneos depositados na Coleção Entomológica do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro (Hemiptera: Reduviidae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 88, 327–333. http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761993000200025

Gonçalves, T.C.M., Teves-Neves, S.C., Santos-Mallet, J.R., Carbajal-de-la-Fuente, A.L. & Lopes, C.M. (2013) Triatoma jatai sp. nov. in the state of Tocantins, Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 108, 429–437. http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761080420130006

Gurgel-Gonçalves, R., Galvão, C., Costa, J. & Peterson, A.T. (2012) Geographic distribution of Chagas disease vectors in Brazil based on ecological niche modeling. Journal of Tropical Medicine, 705326, 1–15. http://dx.doi.org/10.1155/2012/705326

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.

Heitzmann-Fontenelle, T. (1984) Bionomia comparativa de triatomíneos. VI-Híbridos de Triatoma brasiliensis Neiva, 1911 X

Triatoma lenti, Sherlocki & Serafim, 1967 (Hemiptera, Reduviidade). Memórias do Instituto Butantan, 47, 175–181.

Zootaxa 4107 (2) © 2016 Magnolia Press MENDONÇA ET AL. 90

Huelsenbeck, J.P. & Ronquist, F. (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. Bioinformatics, 17, 754–755. http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754

International Commission on Zoological Nomenclature (1999) International Code of Zoological Nomenclature. Fourth edition. International Trust for Zoological Nomenclature, London, i–xxix + 1–306.

Jurberg, J., Cunha, V., Cailleaux, S., Raigorodschi, R., Lima, M.S., Rocha, D.S. & Moreira, F.F.F. (2013) Triatoma pintodiasi sp. nov. do subcomplexo T. rubrovaria (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Revista Pan-Amazônica de Saúde, 4, 43–56. http://dx.doi.org/10.5123/s2176-62232013000100006

Justi, S.A., Russo, C.A.M., Mallet, J.R.S., Obara, M.T. & Galvão, C. (2014) Molecular phylogeny of Triatomini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Parasites & Vectors, 7, 149. http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-7-149

Lent, H. & Wygodzinsky, P. (1979) Revision of the Triatominae (Hemiptera. Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas Disease. Bulletin of the American Museum of Natural History, 163, 125–529.

Lucena, D.T. (1970) Estudos sobre a doença de Chagas no Brasil. Revista Brasileira de Malariología e Doenças Tropicais, 22, 3–173.

Lyman, D.F., Monteiro, F.A., Escalante, A.A., Cordon-Rosales, C., Wesson, D.M., Dujardin, J.P. & Beardi, C.B. (1999) Mitochondrial DNA sequence variation among triatomine vectors of Chagas disease. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 60, 377–386.

Martínez, F.H., Villalobos, G.C., Cevallos, A.M., Torre, P.L., Laclette, J.P., Alejandre-Aguilar, R. & Espinoza, B. (2006) Taxonomic study of the Phyllosoma complex and other triatomine (Insecta: Hemiptera: Reduviidae) species of epidemiological importance in the transmission of Chagas disease: using ITS-2 and mtCytB sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution, 41, 279–287. http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2006.05.002

Martínez-Ibarra, J.A., Grant-Guillén, Y., Ventura-Rodríguez, L.V., Osorio-Pelayo, P.D., Macías-Amezcua, M.D., Meillón-Isáis, K., Alejandre-Aguilar, R., Rodríguez-Bataz, E. & Nogueda-Torres, B. (2011) Biological and genetic aspects of crosses between species of the genus Meccus (Hemiptera: Reduviidae Triatominae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 106, 293–300. http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762011000300007

Martínez-Ibarra, J.A., Salazar-Schettino, P.M., Nogueda-Torres, B., Vences, M.O., Tapia-González, J.M. & Espinoza- Gutiérrez, B. (2009) Occurrence of hybrids and laboratory evidence of fertility among three species of the Phyllosoma complex (Hemiptera: Reduviidae) in Mexico. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 104, 1125–1131. http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762009000800009

Mas-Coma, S. & Bargues, M.D. (2009) Populations, hybrids and the systematic concepts of species and subspecies in Chagas disease triatomine vectors inferred from nuclear ribosomal and

mitochondrial DNA. Acta Tropica, 110, 112–136. http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.10.013

Mendonça, V.J., Alevi, K.C.C., Medeiros, L.M.O., Nascimento, J.D., Azeredo-Oliveira, M.T.V. & Rosa, J.A. (2014) Cytogenetic and morphologic approaches of hybrids from experimental crosses between Triatoma lenti Sherlock & Serafim, 1967 and T. sherlocki Papa et al., 2002 (Hemiptera: Reduviidae). Infection, Genetics and Evolution, 26, 123–131. http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2014.05.015

Mendonça, V.J., Oliveira, J., Rimoldi, A., Ferreira Filho, J.C.R., Araújo, R.F. & Rosa, J.A. (2015) Triatominae Survey (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in the South-Central Region of the State of Bahia, Brazil between 2008 and 2013.

The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 92, 1076–1080. http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.14-0556

Mendonça, V.J., Silva, M.T.A., Araújo, R.F., Martins Jr, J., Bacci Jr, M., Almeida, C.E., Costa, J., Graminha, M.A.S., Cicarelli, R.M.B. & Rosa, J.A. (2009) Phylogeny of Triatoma sherlocki (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) inferred from two mitochondrial genes suggests its location within the Triatoma brasiliensis complex. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 81, 858–864. http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2009.08-0664

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, 997–1006.

http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01802.x

Monteiro, F.A., Donnelly, M.J., Beard, C.B. & Costa, J. (2004) Nested clade and phylogeographic analyses of the Chagas disease vector Triatoma brasiliensis in Northeast Brazil. Molecular Phylogenetics and Evolution, 32, 46–56. http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.ympev.2003.12.011

Monteiro, F.A., Escalante, A.A. & Beard, C.B. (2001) Molecular tools and triatomine systematics: a public health perspective.

Trends in Parasitology, 2001, 17, 344–347. http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4922(01)01921-3

Panzera, F., Pérez, R., Nicolini, P., Hornos, S., Costa, J., Borges, E., Diotaiuti, L. & Schofield, C.J. (2000) Chromosome homogeneity in populations of Triatoma brasiliensis Neiva 1911 (Hemiptera – Reduviidae – Triatominae). Cadernos de Saúde Pública, 16, 83–88.

Zootaxa 4107 (2) © 2016 Magnolia Press MENDONÇA ET AL. 92

http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2000000800009

Panzera, F., Pérez, R., Panzera, Y., Alvarez, F., Scvortzoff, E. & Salvatella, R. (1995) Karyotype evolution in holocentric chromosomes of three related species of triatomines (Hemiptera-Reduviidae). Chromosome Research, 3, 143–150. http://dx.doi.org/10.1007/BF00710707

Pérez, R., Hernández, M., Quintero, O., Scvortzoff, E., Canale, D., Méndez, L., Cohanoff, C., Martino, M. & Panzera, F. (2005) Cytogenetic analysis of experimental hybrids in species of Triatominae (Hemiptera-Reduviidae). Genetica, 125, 261–270. http://dx.doi.org/10.1007/s10709-005-0369-z

Poinar Jr., G. (2005) Triatoma dominicana sp. n. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) and Trypanosoma antiquus sp. n. (Stercoralia: Trypanosomatidae), the first fossil evidence of a Triatominae—Trypanosomatid vector association. Vector- Borne and Zoonotic Diseases, 5, 72–81. http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2005.5.72

Poinar Jr., G. (2013) Panstrongylus hispaniolae sp. n. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), a new fossil triatomine in Dominican amber, with evidence of gut flagellates. Palaeodiversity, 6, 1–8.

Posada, D. (2008) jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. Molecular Biology and Evolution, 25, 1253–1256. http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msn083

Rodrigues, J.M.S., Moreira, F.F.F., Cordeiro, I.R.S., Almeida, M.D. & Jurberg, J. (2015) List of the type-specimens of Reduviidae (Hemiptera: Heteroptera) in the Triatomines Collection of the Oswaldo Cruz Institute, Brazil. Zootaxa, 3936, 181–206. http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.3936.2.2

Rohlf, F.J. (1996) Morphometric spaces, shape components and the effects of linear transformations. In: Marcus, L.F., Corti, M., Loy, A., Naylor, G. & Slice, D.E. (Eds.), Advances in morphometric. NATO ASI Series A: Life Sciences, Vol. 284. New York: Plenum Publishing, pp. 117–129.

Rohlf, F.J. (1999a) tpsDig, version 1.18. Available from: http://www.life.bio.sunysb.edu/morph/ (accessed July 2015) Rohlf, F.J. (1999b) tpsRelw, version 1.18. Available from: http://www.life.bio.sunysb.edu/morph/ (accessed July 2015)

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.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Vols. 1–3. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press,

Schofield, C.J. & Galvão, C. (2009) Classification, evolution, and species groups within

the Triatominae. Acta Tropica, 110, 88–100. http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.01.010

Schreiber, G., Pinho, A.C., Parentoni, R., Salgado, A.D. & Godoy Jr, T.L. (1974) Cytogenetics of triatominae: II- Spermatogenesis in hybrid between Triatoma infestans and Triatoma pseudomaculata (Hemiptera, reduviidae). Revista Brasileira de Biologia, 34, 1–9.

Sherlock, I.A. & Serafim, E.M. (1967) Triatoma lenti sp.n., Triatoma pessoai sp.n. e Triatoma bahiensis sp.n. do Estado da Bahia. Brasil (Hemiptera, Reduviidae). Gazeta Médica da Bahia, 67, 75–92.

Sherlock, I.A. & Serafim, E.M. (1972) Fauna Triatominae do Estado da Bahia. Brasil. I – As espécies e distribuição geográfica. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 6, 265–276. http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86821972000500005

Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research, 22, 4673–4680. http://dx.doi.org/10.1093/nar/22.22.4673

Usinger, R.L., Wygodzinsky, P. & Ryckman, E.R. (1966) The biosystematics of Triatominae. Annual Review of Entomology, 11, 309–329. http://dx.doi.org/10.1146/annurev.en.11.010166.001521

Vinhaes, M.C., Oliveira, S.V., Reis, P.O., Sousa, A.C.L., Silva, R.A., Obara, M.T., Bezerra, C.M., Costa, V.M., Alves, R.V. & Gurgel-Gonçalves, R. (2014) Assessing the vulnerability of Brazilian municipalities to the vectorial transmission of Trypanosoma cruzi using multi-criteria decision analysis. Acta Tropica, 137, 105–110. http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.05.007

WHO. (2013) Chagas disease (American trypanosomiasis). Available from: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html (accessed January 2014)