

Análise das relações taxonômicas e sistemáticas entre espécies de triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae) de colônias mantidas pelo Serviço Especial de Saúde de Araraquara, inferida de seqüências do 16S rDNA mitocondrial

Walter Ceretti Junior¹, Daniel Pagotto Vendrami¹, João Molina Gil², José Maria Soares Barata¹
& Mauro Toledo Marrelli¹

¹Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, Av. Dr. Arnaldo 715, 01246-904 São Paulo-SP, Brasil. mmarelli@usp.br

²Serviço Especial de Saúde de Araraquara (SESA), Universidade de São Paulo, Rua Itália 1622, Centro, 14801-350 Araraquara, São Paulo-SP, Brasil.

ABSTRACT. Taxonomic and systematic analysis among triatomine bug species (Hemiptera, Reduviidae) from colonies of the Special Health Service of Araraquara (SESA), inferred from 16S rDNA mitochondrial sequences. Nucleotide sequences of mitochondrial 16S rDNA gene were analyzed in 14 populations of triatomine bugs from colonies maintained by SESA, Araraquara, São Paulo, Brazil, comparing them with sequences of same gene found in the GenBank. The fragments varied from 311 to 317 bp, with low intra-specific genetic distance (0% to 0.6%), with exception of the relationship among *Triatoma sordida* specimens (1%) and *T. brasiliensis* specimens (1.3%) that were attributed to different geographical populations. The paraphily of *Rhodniini* and *Panstrongylus* genus was evidenced by this analyses, confirming previous results between these and the narrow relationships of *R. prolixus* with *R. robustus* and of *T. infestans* with *T. platensis*. The relationship between *T. maculata* and *T. pseudomaculata* has not been resolved, since these taxa appeared both in monophyly and as in paraphyly: *T. pseudomaculata* (SESA) is grouped with *T. maculata* (sequence of GenBank) and the associated *T. brasiliensis* (SESA), while *T. maculata* (SESA) appears grouped with *T. pseudomaculata* of SESA and GenBank. The results evidence the utility of the gene 16S as molecular marker in the species of triatomine bugs and its importance in systematic and taxonomy questions. There is a necessity of new studies including new molecular markers associated with classic systematic characters of morphology, ecology and behavior to adjust systematic decisions since those will be not of only systematic impact but, for new strategies of control.

KEYWORDS. Triatominae; Chagas disease vectors; systematic; 16S rDNA.

RESUMO. Análise das relações taxonômicas e sistemáticas entre espécies de triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae) de colônias mantidas pelo Serviço Especial de Saúde de Araraquara (SESA), inferida de seqüências do 16S rDNA mitocondrial. Foram analisadas seqüências de nucleotídeos do gene 16S do rDNA mitocondrial em 14 populações de triatomíneos mantidos em colônias no insetário SESA de Araraquara- SP, comparando-as com seqüências do mesmo gene disponíveis no GenBank. Os fragmentos variaram de 311 a 317 pb com baixa variação intra-específica entre as distâncias genéticas (0% a 0,6%), exceto para os relacionamentos entre espécimes de *Triatoma sordida* (1%) e espécimes de *T. brasiliensis* (1,3%) atribuídos a populações geográficas diferentes. A parafilia de *Rhodniini* e do gênero *Panstrongylus* foi evidenciada pelas análises, confirmando resultados anteriores entre estes e os estreitos relacionamentos de *R. prolixus* com *R. robustus* e de *T. infestans* e *T. platensis*. O relacionamento entre *T. maculata* e *T. pseudomaculata* não foi solucionado, uma vez que, esses táxons apareceram tanto em monofilia quanto em parafilia: *T. pseudomaculata* (SESA) está agrupado com *T. maculata* (seqüência do GenBank) e associados a *T. brasiliensis* (SESA), enquanto *T. maculata* (SESA) aparece agrupado com *T. pseudomaculata* do SESA e do GenBank. Os resultados evidenciam a utilidade do gene 16S como marcador de espécies de triatomíneos e sua importância em questões de sistemática e taxonomia. Há necessidade de novos estudos envolvendo outros marcadores associados a caracteres sistemáticos clássicos de morfologia, ecologia e comportamento para decisões sistemáticas adequadas uma vez, que teriam impacto não apenas sistemático mas, para as estratégias de controle.

PALAVRAS-CHAVE. Triatominae; Vetores da doença de Chagas; sistemática; 16S rDNA.

A subfamília Triatominae de Reduviidae comporta hoje, cerca de 142 espécies ocorrentes e uma fóssil, distribuídas em 18 gêneros. Esses insetos, hematófagos estritos em todas as fases da vida são reconhecidos vetores da doença de Chagas, parasitemia endemicamente distribuída entre as latitudes 40°N e 46°S do Sul dos EUA à Patagonia Argentina (Lent & Wygodzinsky 1979; Schofield 1988; Galvão et al. 2003; Forero et al. 2004; Poinar 2005; Costa et al. 2006; Galvão & Angulo

2006; Sandoval et al. 2007; Costa & Felix 2007; Martinez et al. 2007).

Essa enfermidade é considerada um dos mais importantes problemas de Saúde na América Latina, com cerca de 9 a 14 milhões de indivíduos chagásicos, 60 milhões vivendo em risco e cerca de 20.000 caso/ano em 18 países da América do Sul e Central (W. H. O. 1990, 1991; Schmuñis, 1999; W. H. O. 2002; Schofield et al. 2006).

Morfológicamente os triatomíneos em sua maioria são de fácil distinção, no entanto alguns táxons necessitam de ferramentas mais sutis para uma adequada distinção (Schofield 1988; Barata 1998; Carcavallo *et al.* 2001; Jurberg 2003). É o caso dos “complexos” de espécies crípticas, *R. robustus* e *T. sordida*, entre outras (Monteiro *et al.* 2001).

O uso de marcadores moleculares para fins de análise cladística em Triatominae, auxilia na resolução desses impasses sistemáticos e também acirrou as questões sobre as hipóteses de origem monofilética e parafilética do grupo (Jurberg 2003; Scheafer 2003; 2005).

Para inferências filogenéticas de populações e problemas relativos ao *status* específico de alguns táxons o gene 16S do DNA mitocondrial tem sido bastante útil (Abad-Franch & Monteiro 2005). No GenBank constatamos que já existe uma quantidade significativa de seqüências disponíveis deste gene para vários insetos, inclusive Triatominae.

O Serviço Especial de Saúde de Araraquara (SESA) pertencente à Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, Brasil, mantém um insetário constituído a partir da desativação do biotério existente no Departamento de Epidemiologia, na unidade matriz, na década de 1980. Conta atualmente com cerca de 31 espécies de triatomíneos dos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* distribuídos em 14 colônias de diversas procedências nacionais e internacionais que são utilizadas por pesquisadores locais e de instituições de outros estados e nações. No entanto, somente umas poucas colônias foram pauta de estudos moleculares.

O presente trabalho tem por finalidade analisar seqüências do gene 16S do rDNA mitocondrial dos triatomíneos mantidos nas colônias do SESA e compará-las àquelas disponíveis no GenBank no intuito de fornecer novos dados moleculares que possibilitarão análises mais robustas futuramente.

MATERIAL E MÉTODOS

Procedência dos Triatomíneos. Foram analisados 39 triatomíneos representantes de 14 espécies dos gêneros *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma*, adultos (machos e/ou fêmeas) e ninfas de V estágio, conforme Tabela 1. Esses indivíduos foram procedentes de colônias mantidas pelo insetário do Serviço Especial de Saúde de Araraquara (SESA), da Universidade de São Paulo.

De algumas espécies testamos mais de uma procedência (CTAs), caso de: *R. prolixus* Stål 1859 (3), *P. megistus* (Burmeister 1835) (5), *T. infestans* (Klug 1834) (8), *T. pseudomaculata* Correa & Espinola 1964(3), *T. rubrovaria* Blanchard 1843 (2) e *T. sordida* Stål 1859 (2). Os trabalhos foram executados no Laboratório de Entomologia em Saúde Pública (LESP) da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo.

Os exemplares enviados semanalmente pelo insetário do SESA foram acondicionados em Tubos tipo Falcon de 50 ml, devidamente identificados e conservados em *freezer* a -70°C até o momento da extração do DNA total.

Seqüências do gene 16S de alguns exemplares de 18 outras

espécies de triatomíneos dos gêneros *Rhodnius*, *Psammolestes* Bergroth, 1991, *Triatoma*, *Panstrongylus*, *Eratyrus* Stål, 1859, *Dipetalogaster* Usinger, 1939, *Mepraia* Mazza, Gajardom & Jörg, 1940 e *Linschosteus* Distant, 1904 foram obtidas do GenBank, e estão listados na Tabela 2 com os respectivos números de acesso.

Extração do DNA total. Os exemplares obtidos foram mortos por congelamento a -70°C. O DNA genômico foi extraído individualmente utilizando o método de extração fenol-clorofórmio, (Zahler & Roth 1995) adaptado para triatomíneos por Lyman *et al.* (1999). De cada exemplar adulto retirou-se os três pares de pernas e a cabeça. As ninfas foram processadas integralmente.

O DNA foi obtido por meio da maceração individual, com pistilo, das peças anatômicas acima, em microtubos de 1,5 ml nos quais se adicionou 150 µl tampão de lise (Tris-HCl 10mM, SDS 20%, EDTA 50 mM) + 0,8 ml de proteinase K 20 ng/ml + 1,0 ml de RNase 10 ng/ml. Desta forma obteve-se um homogenado que foi submetido a quatro ciclos de congelamento (em N₂ líquido) e descongelamento. Sendo posteriormente, incubados por 1 hora em “banho seco” a 60°C. Após a incubação o DNA foi extraído com 100µl de FCI (fenol: clorofórmio: álcool isoamílico 25:24:1) e precipitado pela adição de 2 volumes de etanol absoluto (por 24 horas a 4°C). Após centrifugação (12,000 x g por 5 min), o precipitado foi ressuspenso com 50µl de TE (Tris 10 mM, EDTA 0,5 mM).

Amplificação do gene 16S do DNA mitocondrial e sequenciamento. Cada amostra de DNA individualmente obtida foi utilizada para amplificação do 16S, com os iniciadores (*primers*) descritos por Lyman *et al.* (1999).

As reações de amplificação do 16S foram conduzidas por 35 ciclos (95°C por 45 segundos, 55°C por 1 minuto, e 72°C por 1 minuto) e seus produtos (ao redor de 500 pares de base) foram visualizados após eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. Os fragmentos obtidos foram então seqüenciados diretamente (sem purificação do produto da PCR), em ambas as direções com os mesmos *primers* usando o sistema ABI Prism dGTP BigDye Terminator Ready Reaction Kit (Perkin Elmer, Foster City, CA).

Análise das seqüências. Foram obtidas seqüências parciais do gene 16S dos espécimes estudados, que foram alinhadas usando CLUSTAL W software (1.60) (Thompson *et al.* 1994). As seqüências estão disponibilizadas no GenBank (números de acesso na Tabela I).

As seqüências obtidas a partir das colônias do SESA foram comparadas com outras obtidas do GenBank que foram previamente cortadas e adaptadas para número de bases semelhante ao das primeiras.

Para o alinhamento, foi utilizado o programa MEGA software (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 3.01) (Kumar *et al.* 2003) e uma matriz de divergência foi gerada. As relações entre as espécies foram avaliadas por três métodos: Neighbor Joining (NJ) com distância Kimura dois

parâmetros, 1000 replicações no teste de “bootstrap” (MEGA); Máxima Parcimônia (MP) com 1000 réplicas de “bootstrap” e opção de busca “branch-and-bound”; e Máxima Verossimilhança (ML), utilizando o programa PHYLIP: (Phylogeny Inference Package, version 3.6) (Felsenstein 2004). As três árvores foram enraizadas com seqüências de 16S de *Arilus cristatus* Linnaeus, 1763 (Hemiptera: Reduviidae: Harpactorinae) e *Oncerothelus* sp. Stål, 1868 (Hemiptera: Reduviidae: Saicinae), como grupo externo (número de acesso no GenBank/EMBL na Tabela 2) por se tratarem de membros da Família Reduviidae, à qual os triatomíneos pertencem e terem sido utilizados por Lyman *et al.* (1999).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidas 39 seqüências de nucleotídeos de fragmentos do gene 16S do DNA mitocondrial de 14 espécies dos gêneros *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius* aos quais pertencem reconhecidos vetores da doença de Chagas na América Latina. As seqüências geradas variaram entre 311 (pares de bases) pb, para *R. pictipes*, a 317 pb em *T. sordida* (CTA 20C e 26C) (dados não mostrados).

Estes fragmentos foram alinhados com seqüências do mesmo gene para outros triatomíneos e também de *A. cristatus* e *Oncerothelus* sp. Stål, 1868. Uma matriz de distância foi construída utilizando o programa MEGA e com estes dados uma árvore de distâncias foi gerada (Fig. 1). Embora árvores por três métodos (Neighbour-Joinig, Máxima Parcimônia e, Máxima Verossimilhança) foram geradas, as espécies foram basicamente mantidas nos mesmos “clusters” ou clados em todas as árvores e, portanto, a árvore de distância foi a melhor escolha para ser mostrada e discutida neste estudo.

A árvore de distância demonstra a clara parafilia das tribos Rhodniini e Triatomini, corroborando com dados obtidos por Monteiro *et al.* (2000) usando CitB, D2 e LR, como marcadores, Hypša *et al.* (2002) que utilizaram 12S e 16S, e Paula *et al.* (2005) com seqüências de 16S depositadas no GenBank.

Em Rhodniini, obtivemos um clado composto pelo relacionamento (*R. domesticus* (*R. neglectus*1A (*R. prolixus*3A (*R. prolixus*3B - *R. prolixus*4 - *R. robustus*11 (*R. prolixus* 29 B e C))))). *R. prolixus* (3;4) e *R. robustus*11 não apresentaram divergência nas seqüências dos fragmentos do gene 16S obtidas. Porém, *R. prolixus* 29 (Faculdade de Medicina) foi o mais divergente do grupo, variando de 0,3% a 0,6% e posicionando-se em ramo separado. Tal topografia corrobora a hipótese de *R. prolixus* e *R. robustus* tratarem-se de linhagens distintas de espécie única adaptadas a ecótopos diferentes (Harry *et al.* 1992; Harry 1993; Solano *et al.* 1996) mas pode sugerir também, um possível erro de identificação das colônias de *R. prolixus* (3;4) ou *R. robustus*, uma vez que, Monteiro *et al.* (2000) confirmaram a validade dos dois táxons.

Em análises mais recentes mostrou-se ainda, que o ramo acima está mais proximamente relacionado a *Psammolestes tertius* e *P. coreodes* do que ao relacionamento constituído por (*R. pictipes* (*R. stali* - *R. brethesi*)) (Hypša *et al.* 2002; Paula *et al.* 2005).

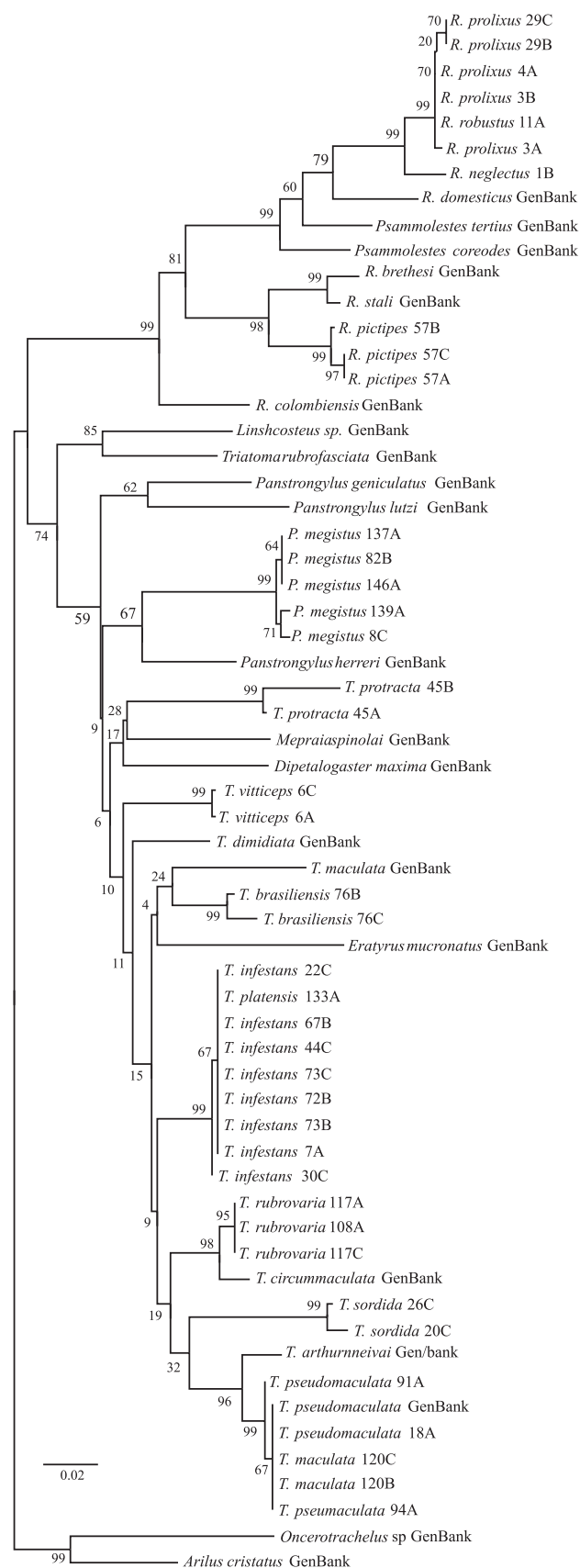


Fig. 1. Árvore de similaridade inferida das distâncias do gene 16S do DNAr mitocondrial entre triatomíneos de colônias mantidas pelo SESA – USP e GenBank. Método “Neighbor Joining”, Kimura 2-parâmetros, 1000 replicações no teste “bootstrap” (programa MEGA).

Tabela I. Lista de espécies de triatomíneos dos gêneros *Rhodnius*, *Panstrongylus* e *Triatoma* examinados por meio de fragmentos do gene 16S do DNAr mitocondrial, sexo e estágio, número de acesso no GenBank, procedência e código da colônia (CTA), e início da mesma, mantidas pelo SESA - USP, Araraquara-SP. A-ninfa, B-fêmea, C-macho.

Espécie	Sexo Estádio	GenBank	Procedência	Colônia	Início
<i>R. neglectus</i>	B	EU822951	Guaíra – SP - Brasil	001	14/03/1969
<i>R. prolixus</i>	A	EU822952	Colômbia	003	21/12/1976
	B	EU822953			
<i>R. prolixus</i> *	C	EU822954	Colômbia	004	21/12/1976
<i>R. prolixus</i>	B	EU827235	Faculdade de Medicina Ribeirão Preto	029	01/05/1967
	C	EU827236			
<i>R. robustus</i>	A	EU827206	Madre de Dios - Perú	011	30/08/1973
<i>R. pictipes</i>	A	EU827215	Jacundá – PA - Brasil	057	20/06/1978
	B	EU827216			
	C	EU827217			
<i>P. megistus</i>	C	EU827205	Almino Alfonso – RN - Brasil	008	28/02/1980
<i>P. megistus</i>	B	EU827224	Araraquara – SP - Brasil	082	S.I.**
<i>P. megistus</i>	A	EU827233	São Felipe - BA- Brasil	137	12/09/1992
<i>P. megistus</i>	A	EU827234	Sta. Maria do Cambuçá – PE- Brasil	139	18/07/1977
<i>P. megistus</i>	A	EU835979	Boca da Mata - AL- Brasil	146	04/03/1980
<i>T. brasiliensis</i>	B	EU827222	São João do Piauí e Conceição do Canindé- PI- Brasil	076	20/01/1980
	C	EU827223			
<i>T. infestans</i>	A	EU827204	Mambai – GO- Brasil	007	28/02/1980
<i>T. infestans</i>	C	EU827209	Frutal – MG- Brasil	022	22/09/1977
<i>T. infestans</i>	C	EU827211	Tucuman - Argentina	030	24/10/1973
<i>T. infestans</i>	C	EU827212	Cochabamba - Bolívia	044	05/09/1972
<i>T. infestans</i>	B	EU827219	Santa Cruz - Bolívia	072	12/07/1978
<i>T. infestans</i>	B	EU827218	Tanhaçu - BA- Brasil	067	07/12/1977
<i>T. infestans</i>	B	EU827221	Gloria de Dourados - MS- Brasil	073	12/09/1979
	C	EU827220			
<i>T. maculata</i>	B	EU827230	Cerro Galan - Venezuela	120	19/12/1979
	C	EU827231			
<i>T. pseudomaculata</i>	A	EU827207	Pocinhos - PB- Brasil	018	22/08/1977
<i>T. pseudomaculata</i>	A	EU827225	Ceará- Brasil	091	06/11/1975
<i>T. pseudomaculata</i>	A	EU827226	Teofelândia - BA- Brasil	094	11/03/1977
<i>T. platenses</i>	A	EU827232	La Pampa - Argentina	133	21/07/1984
<i>T. protracta</i>	A	EU827213	Monte Del Diablo – California – EUA	045	16/10/1972
	B	EU827214			
<i>T. sordida</i>	C	EU827208	Guaíra – SP- Brasil	020	26/08/1977
<i>T. sordida</i>	C	EU827210	Tanhaçu - BA- Brasil	026	17/11/1977
<i>T. rubrovaria</i>	A	EU827227	Caçapava do Sul - RS- Brasil	108	02/05/1983
<i>T. rubrovaria</i>	A	EU827228	Pelotas – RS- Brasil	117	24/03/1983
	C	EU827229			
<i>T. vitticeps</i>	A	EU827202	Guarapari - ES- Brasil	006	08/11/1979
	C	EU827203			

* Linhagem: olhos vermelhos - ** Sem informação.

R. colombiensis situou-se em ramo mais basal em relação aos outros Rhodiniini. Em filogenias anteriormente publicadas (Hypša *et al.* 2002; Paula *et al.* 2005) esta espécie aparece relacionada a *R. pallelescens* enquanto, *R. ecuadoriensis* posicionou-se em ramo basal ao da Tribo. A não inclusão dessas duas espécies nesta análise justifica a posição basal de *R. colombiensis* na presente árvore.

Em Triatomini, ficou demonstrada a parafilia de *Panstrongylus* formando clados distintos *P. geniculatus* com *P. lutzi* basal ao ramo *P. herreri* com *P. megistus* e este, mais próximo a *Dipetalogaster maxima* e aos “*Triatomas*” Norte-americanos do que aos da América do Sul. *D. maxima* aparece basal em relação a o ramo *P. herreri*-*P. megistus*. As distâncias

entre as populações de *P. megistus* variaram entre 0,3% e 0,6% confirmando derivação distinta para esse gênero observada também por Garcia *et al.* (2001), utilizando seqüências combinadas dos genes 12S, citocromo oxidase I (COI) e 16S), Garcia *et al.* (2003) usando 12S e 16S e Marcilla *et al.* (2002) com o uso de ITS-2, como marcadores. Esse resultado corrobora com a hipótese de origem do clado neotropical de Triatomini a partir de ancestrais das linhagens neárticas, ou ainda, por derivação direta de um dos membros já constituídos, *T. rubida*, por exemplo, semelhantemente ao que supostamente tenha ocorrido aos Triatominae do Velho Mundo (Patterson *et al.* 2001; Hypša *et al.* 2002; Marcilla *et al.* 2002; Sainz *et al.* 2004).

O ramo formado por *T. pseudomaculata* com *T. maculata* apresentou divergência nula e corrobora os resultados obtidos por Sainz *et al.* (2004) que, usando também 16S, obtiveram diferença que variou de 0,2-0,8% e que sustentam nossos resultados para *T. pseudomaculata* 91 (Ceará) que foi 0,3% divergente dos demais e formou um ramo consistente com *T. arthurneivai* que não foi testado pelos referidos autores.

Para Sainz *et al.* (2004) a inclusão de *T. arthurneivai* na análise poderia ajudar a resolver a questão desse relacionamento. Porém, quando incluímos em nossa análise seqüências de *T. maculata* e *T. pseudomaculata* obtidas do GenBank verificamos que *T. maculata* do SESA (CTA-120) manteve-se associado aos *T. pseudomaculata* do SESA enquanto, o *T. maculata* do GenBank relacionou-se ao *T. brasiliensis*. Esse resultado coincide com Garcia *et al.* (2001), Hypša *et al.* (2002) e Paula *et al.* (2005) que mostraram divergências significativas entre *T. maculata* e *T. pseudomaculata* que se posicionaram em ramos independentes e muito distantes entre si.

Segundo Carbajal de La Fuente *et al.* (2008) as discordâncias entre os resultados exibidos por Sainz *et al.* (2004) e aqueles obtidos por Garcia *et al.* (2001), Hypša *et al.* (2002) e Paula *et al.* (2005) estão relacionados a algum erro de identificação dos espécimes utilizados por Sainz *et al.* (2004) como *T. maculata* procedente de Sergipe, que seriam de fato *T. pseudomaculata*. No Brasil, *T. maculata* ocorre apenas no Estado de Roraima (Lent & Wygodzinsky 1979; Carcavallo *et al.* 1998).

Tais erros são conseqüências dessas duas espécies serem de difícil separação pelos caracteres morfológicos dos adultos e as chaves dicotômicas de Lent & Wygodzinsky (1979) e de Carcavallo *et al.* (1997) atribuírem grande peso a esses caracteres, principalmente os cromáticos, que são inconsistentes com a grande variedade fenotípica que esses caracteres apresentam na maioria das espécies (Carbajal de La Fuente *et al.* 2008).

Outro motivo também, seria a ocorrência de híbridos produzidos pelos cruzamentos entre indivíduos de colônias de *T. maculata* e *T. pseudomaculata* (Belisário *et al.*, 2007), principalmente por que *T. pseudomaculata*, foi erroneamente identificada por mais de um século, antes de ser descrita por Corrêa & Espínola (1964), a partir de insetos procedentes do Estado do Ceará, Brasil e continuaram sendo confundidas, principalmente pelas secretarias de Saúde, mesmo após os trabalhos de Lent & Jurberg (1978), Lent & Wygodzinsky (1979) e de Gonçalves *et al.* (1985) que confirmam as diferenças encontradas, na genitália externa, nos ovos e entre as ninfas das duas espécies.

Ambas são encontradas nos ambientes domésticos e peridomésticos em geral, associadas a aves. Schofield (1988) sustenta a provável evolução das mesmas a partir de populações alopatricas originadas de uma ancestral comum por dispersão passiva.

Em análises isoenzimática, citogenéticas e morfométricas da cabeça, incluindo as antenas, do tórax e do abdome ficou demonstrado que é possível distinção completa de *T. maculata*,

Tabela II. Espécies estudadas e correspondente número de acesso de seqüências do gene 16S do DNA mitocondrial de espécies de insetos da Família: Reduviidae, obtidas no GenBank (setembro de 2007) para comparação com as seqüências geradas nesse estudo.

Espécie	Número de acesso
<i>Oncerothelus sp</i>	AY252739
<i>Arilus cristatus</i>	AF045712
<i>Rhodnius domesticus</i>	AY035440
<i>Rhodnius stali</i>	AY035437
<i>Rhodnius brethesi</i>	AF045710
<i>Rhodnius colombiensis</i>	AY035438
<i>Psammolestes tertius</i>	AY035439
<i>Psammolestes coreodes</i>	AF045708
<i>Triatoma maculata</i>	AY035465
<i>Triatoma pseudomaculata</i>	AY035461
<i>Triatoma dimidiata</i>	AF045695
<i>Triatoma circummaculata</i>	AF021188
<i>Triatoma arthurneivai</i>	AY035460
<i>Triatoma rubrofasciata</i>	AY035468
<i>Panstrongylus lutzi</i>	AY035449
<i>Panstrongylus geniculatus</i>	AF394593
<i>Panstrongylus herreri</i>	AY185833
<i>Dipetalogaster maximus</i>	AF045699
<i>Eratyrus mucronatus</i>	AY185832
<i>Mepraia spinolai</i>	AF324518
<i>Linshcosteus sp.</i>	AF394595

T. pseudomaculata e *T. arthurneivai*, sendo o relacionamento evolutivo da primeira em relação às últimas questionado (Santos *et al.*, 2007; Carbajal de La Fuente *et al.* 2008).

O *T. maculata* do SESA (CTA 120) está rotulado como procedente de Cerro Galan, Venezuela. Essa localidade está inserida na área de ocorrência natural da espécie. Desta forma, um erro de identificação é pouco provável. No entanto, devido à longevidade dessa colônia (iniciada em 1979), não podemos descartar a hipótese de hibridação, por qualquer motivo relacionado à sua manutenção no insetário, com membros de colônias de *T. pseudomaculata* comprometendo os resultados deste trabalho.

As espécies de *T. infestans* (CTA 044 e 072) procedentes de Cochabamba e Santa Cruz (Bolívia) formaram ramo com as procedentes de Glória de dourados (CTA 073) e Mambaí (CTA 007), ambas do Estado de Goiás, Frutal (CTA 022) de Minas Gerais e Tanhaçú (CTA 067) de Bahia, Brasil, observando-se, também, inclusão de *T. platensis* (CTA 133) nesse ramo, havendo divergência nula dessa em relação aos *T. infestans* mencionados. No entanto, *T. infestans* (CTA 030) procedente de Tucuman, Argentina, divergiu 0,3% das demais, formando ramo basal a este clado. A similaridade genética entre as colônias do Brasil e Bolívia pode ser explicada, pois, admiti-se que a região andina de Cochabamba, Bolívia seja o centro de dispersão da espécie que teria atingido o território brasileiro durante o século XX, passivamente, por meio da imigração humana (Schofield 1988). Esse argumento leva em consideração a ocorrência de populações silvestres de *T. infestans* naquela área. No entanto, observações recentes revelaram a existência

de populações silvestres também na região do Chaco que abrange o sudeste da Bolívia, Paraguai e norte da Argentina onde está situada a Província de Tucuman (Noireau *et al.* 2005; Richer *et al.* 2007) o que dá sustento à maior divergência desta para as colônias bolivianas e brasileiras.

A similaridade genética entre *T. infestans* e *T. platensis* já foi demonstrada anteriormente tanto, por apresentarem híbridos naturais viáveis (Perez *et al.* 2005) quanto por dados moleculares: Garcia *et al.* (2001) pelo uso de COI, 12S e 16S e também, por Barges *et al.* (2006) usando o primeiro espaçador interno transcrito (ITS-1). Estas espécies estão mais relacionadas entre si do que com *T. delpontei*. Estas três espécies juntamente a *T. melanosoma*, *T. rubrovaria*, *T. carcavallo* e *T. infestans* Darck Morphs, pertencem ao complexo *T. infestans* Carcavallo *et al.* (2000). No entanto, Monteiro *et al.* (1999) com base na análise de fragmentos de citocromo b (c1tb), evidenciou que tanto *T. melanosoma* quanto *T. infestans* Darck Morphs Andinos referem-se a variações fenotípicas de *T. infestans*.

T. circummaculata e *T. rubrovaria* (CTA 108; 117, A e C) formaram clado independente, mais derivado de *T. infestans* e *T. platensis* o que pode evidenciar separação mais recente. Tal topografia tem amparo nos resultados de Garcia *et al.* (2001). Os resultados observados para *T. rubrovaria* (108) e *T. rubrovaria* (CTA 117, A e C) com divergência nula, mostram não haver variação geográfica nas populações de Caçapava do Sul e Pelotas, pelo menos quanto ao gene testado.

Resultados inesperados com distância acima de 1%, foram obtidos para os ramos de *T. sordida* 20C e *T. sordida* 26C, procedentes respectivamente de Guairá-SP e Tanhaçu-BA, com 1,0% de divergência e *T. brasiliensis* B e *T. brasiliensis* C, ambos da colônia registrada sob o CTA-076 (1,3%) cuja procedência refere-se aos municípios de São João do Piauí e Conceição do Canindé situados no Estado do Piauí, Brasil. No entanto, estão dentro daqueles atribuídos a populações geográficas (1,3% ± 0,9%) segundo Dujardin *et al.* (2002).

Quanto à divergência genética dos *T. brasiliensis* (CTA 076, B e C), os municípios de São João do Piauí (8°18'45"S; 42°11'15"O) e Conceição do Canindé (7°56'15"S; 41°33'45"O) estão ambos situados no sudeste piauiense, área de domínio geológico da Serra da Capivara e embora as altitudes estejam próximas, 222m para São João do Piauí e 252m para Conceição do Canindé, há muitas barreiras geográficas, determinadas pela presença de montes de cerca 600m de altitude que podem sustentar a diferença observada entre os dois membros da colônia testada por ser o 16S um gene mitocondrial e assim, ser transmitido, sem recombinação significativa, das mães para a prole (Abad-Franch & Monteiro 2005). Desta forma, é provável que esses insetos descendam de fêmeas distintas pertencentes às linhagens fundadoras da colônia desta colônia.

A posição basal no clado correspondente aos *Triatomas* sul-americanos de *T. vitticeps* (Stål 1859) necessita ser melhor avaliada em análises futuras. Esse triatomíneo, ocorrente nos estados brasileiros de Minas Gerais, Bahia, Espírito Santo e Rio de Janeiro é frequentemente coletado pelos moradores de

áreas rurais do Espírito Santo e incriminado pela transmissão do *T. cruzi* no Estado do Rio de Janeiro. Essa espécie apresentou elevada taxa de infecção natural por tripanosomatídeos semelhantes ao *T. cruzi* e índices elevados de domiciliação para o Estado do Espírito Santo. (Santos *et al.* 2006).

Esta análise evidencia a importância do 16S como marcador de espécies de triatomíneos e sua importância em questões de sistemática e taxonomia. No entanto, os resultados aqui obtidos podem ter sofrido influências relacionadas à homogeneidade genética de cada colônia devido ao estado panmítico das mesmas.

Apesar da sua grande longevidade, admitimos que as colônias do SESA consistam um importante acervo para pesquisa. Pois, permitem fazer análises comparativas entre populações recentes com populações que não são mais encontradas como, por exemplo, os *T. infestans* intradomiciliares de várias localidades do Brasil que hoje se encontram erradicados.

A partir dos trabalhos de Garcia & Powell (1998) e Stothart *et al.* (1998) que segundo Galvão (2003), inauguraram a era cladística molecular nos estudos sistemáticos de Triatominae resolveram-se muitos impasses relacionados ao *status* de algumas espécies ou relativos à espécies crípticas, no entanto, acirrou-se a discussão sobre a origem evolutiva deste grupo e as evidências para polifilia, ou parafilia ganharam mais suporte (Monteiro *et al.* 2004; Paula *et al.* 2005). Novas análises com uso de um maior número de marcadores genéticos associadas ainda, aos padrões sistemáticos clássicos de morfologia, ecologia e comportamento, devem ser adicionadas para uma decisão filogenética adequada. Uma vez que isto não tem apenas relevância sistemática, mas, sérias implicações quanto às medidas de controle das espécies de vetores (Scheafer 2003, 2005).

Agradecimentos. À FAPESP (MTM - 05/50225-2) pelo financiamento.

REFERÊNCIAS

- Abad-Franch, F. & F. A. Monteiro. 2005. Molecular research and the control of Chagas disease vectors. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** 77: 437-454.
- Barata, J. M. S. 1998. Macroscopic and exochorial structures of Triatominae eggs (Hemiptera, Reduviidae). Estruturas macroscópicas e exocoriais de ovos de Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). In: R. U. Carcavallo, I. Galíndez-Girón, J. Jurberg, H. Lent - orgs.). **Atlas of Chagas' disease vectors in the Americas. Atlas dos vetores da doença de Chagas nas Américas**. Editora FIOCRUZ, Rio de Janeiro. Vol. II, pp. 409-448.
- Barges, M. D.; D. R. Klisiowicz; F. Panzera; F.; Noireau; A. Marcilla; R. Perez; M. G. Rojas; J. E. R. O'ConnorGonzales-Candelas; C. Galvão; J. Jurberg; R. U. Carcavallo; J. P. Durjardin & S. Mas-Coma. 2006. Origin and phylogeography of the Chagas disease main vector *Triatoma infestans* based on nuclear rDNA sequences and genome size. **Infection, Genetics and Evolution** 6: 42-62.
- Belisário C. J.; G. C. D'Ávila Pessoa & L. Diotaiuti. 2007. Biological aspects of crosses between *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) and *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964 (Hemiptera: Reduviidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 102: 517-521.

- Carbajal de la Fuente, A. L.; F. Noireau & S. S. Catalã. 2008. Inferences about antennal phenotype: the "Triatoma maculata complex" (Hemiptera: Triatominae) is valid? *Acta Tropica* **106**: 16–21.
- Carcavallo, R. U.; I. Galíndez Girón; J. Jurberg; C. Galvão & H. Lent. 1997. **Pictorial keys for tribes, genera and species of the subfamily Triatominae.** In: Carcavallo, R. U., I. Galíndez Girón, J. Jurberg & H. Lent. (Eds.), Atlas of Chagas Disease Vectors in the Americas, vol. 3. FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, pp. 107–244.
- Carcavallo, R. U.; S. I. Curto de Casas; I. A. Sherlock; I. Galíndez Girón; J. Jurberg; C. Galvão; C. A. Mena-Segura & F. Noireau. 1998. **Geographical distribution and alti-latitudinal dispersion.** In: Carcavallo, R.U., I. Galíndez Girón, J. Jurberg & H. Lent. (Eds.), Atlas of Chagas Disease Vectors in the Americas, vol. 3. FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, pp. 747–793.
- Carcavallo, R. U.; J. Jurberg; H. Lent; F. Noireau & C. Galvão. 2000. Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Proposals for taxonomic arrangements. *Entomologia y Vectores* **7**: 1–99.
- Carcavallo, R. U.; J. Jurberg; H. Lent; C. Galvão; M. Steindel & C. J. C. Pinto. 2001. Nova espécie do complexo *oliveriai* (nova denominação para o complexo *matogrossensis*) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **96**: 77–79.
- Corrêa R. R. & H. N. Espínola. 1964. Descrição de *Triatoma pseudomaculata*, nova espécie de Triatomíneo de Sobral, Ceará. *Arquivos de Higiene e Saúde Pública* **29**: 115–127.
- Costa, J.; A. M. Argolo & M. Felix. 2006. Redescription of *Triatoma melanica* Neiva & Lent, 1941, new status (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) *Zootaxa* **1385**: 47–52.
- Costa, J. & M. Felix. 2007. *Triatoma juazeirensis* sp. nov. from the state of Bahia, Northeastern Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **102**: 87–90.
- Felsenstein, J. 2004. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* **17**: 368–376.
- Forero, D.; C. Weirauch & M. Baena. 2004. Synonymy of the reduviid (Hemiptera: Heteroptera) genus *Torrealbaia* (Triatominae) with *Amphibolus* (Harpactorinae), with notes on *Amphibolus venator*. (Klug, 1830). *Zootaxa* **670**: 1–12.
- Galvão, C.; R. Carcavallo; D. Silva Rocha & J. Jurberg. 2003. A checklist of the current species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa* **202**: 1–36.
- Galvão, C. 2003. A sistemática de Triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae), de De Geer ao DNA. In: II Encuentro Nacional de Entomología Médica y Vetrinária. VII Jornadas de Zoología del Uruguay, 13–17 de octubre de 2003. *Montevideo Uruguay. Entomología y Vectores* **10**: 511–530.
- Galvão, C. & V. M. Angulo. 2006. *Belminus corredori*, a new species of Bolboderini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from Santander, Colombia *Zootaxa* **1241**: 61–68.
- García, B. A. & J. R. Powell. 1998. Phylogeny of species of *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae) based on mitochondrial DNA sequences. *Journal of Medical Entomology* **35**: 232–238.
- García, B. A.; E. N. Moriyama & J. R. Powell. 2001. Mitochondrial DNA sequences of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): Phylogenetic relationships. *Journal of Medical Entomology* **38**: 675–683.
- García, B. A.; C. Manfredi; L. Fichera & E. L. Segura. 2003. Short report: Variation in mitochondrial 12S and 16S Ribosomal DNA sequences in natural populations of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **68**: 692–694.
- Gonçalves, T. C. M.; J. Jurberg; J. M. Costa & W. de Souza. 1985. Estudo morfológico comparativo de ovos e ninfas de *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) e *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964 (Hemiptera, Reduviinae, Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **80**: 263–276.
- Harry, M.; I. Galíndez & M. L. Cariou. 1992. Isozyme variability and differentiation between *Rhodnius prolixus*, *R. robustus* and *R. pictipes*, vectors of Chagas disease in Venezuela. *Medical Veterinary Entomology* **6**: 37–43.
- Harry, M. 1993. Isozymic data question the specific status of blood-sucking bugs of genus *Rhodnius*, vectors of Chagas' disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **87**: 492.
- Hypša, V.; D. F. Tietz; J. Zrzavy; R. O. M. Rego; C. Galvão & J. Jurberg. 2002. Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the Asiatic clade. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **23**: 447–457.
- Jurberg, J. 2003. Ferramentas usadas em taxonomia de triatomíneos: O uso múltiplo. In: II Encuentro Nacional de Entomología Médica y Vetrinária. VII Jornadas de Zoología del Uruguay, 13–17 de octubre de 2003, *Montevideo Uruguay. Entomología y Vectores* **10**: 497–509.
- Kumar, S.; K. Tamura & M. Nei. 2004. MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. *Briefings in Bioinformatics* **5**: 150–163.
- Lent, H. & P. Wygodzinsky. 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bulletin of America Museum of Natural History* **163**: 123–520.
- Lent, H. & J. Jurberg. 1978. Estudo comparativo da genitália externa masculina de seis espécies de *Triatoma* Laporte, 1832 que mais freqüentemente habitam o domicílio humano no Brasil (Hemiptera, Reduviidae). *Revista Brasileira de Biologia* **38**: 931–944.
- Lyman, D. F.; F. A. Monteiro; A. A. Escalante; C. Cordon-Rosales; D. N. Wesson; J. P. Dujardin & C. B. Beard. 1999. Mitochondrial DNA sequence variation among Triatominae vectors of Chagas' disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **60**: 377–386.
- Marcilla, A.; M. D. Bagues; F. Abad-Franch; F. Panzera; R. U. Carcavallo; F. Noireau; C. Galvão; J. Jurberg; M. A. Miles; J. P. Dujardin & S. Mas-Coma. 2002. Nuclear rDNA ITS-2 sequences reveal polyphyly of *Panstrongylus* species (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), vectors of *Trypanosoma cruzi*. *Infection, Genetics and Evolution* **1**: 225–235.
- Martínez, E.; T. Chávez; D. Sossa; R. Aranda; V. Benigno & P. Vidaurre. 2007. *Triatoma boliviana* sp. n. de los valles subandinos de La Paz, Bolívia (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), similar a *Triatoma nigromaculata* Stål, 1859. *Boletín del Instituto de Investigación en Salud y Desarrollo* **3**: 1–10.
- Monteiro, F. A.; R. Pérez; F. Panzera; J. P. Dujardin; C. Galvão; D. Rocha; F. Noireau; C. Schofield & C. B. Beard. 1999. Mitochondrial DNA Variation of *Triatoma infestans* Populations and its Implication on the Specific Status of *T. melanosome*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **94**: 229–238.
- Monteiro, F. A.; D. M. Wesson; E. M.; Dotson; C. J. Schofield & C. B. Beard. 2000. Phylogeny and molecular taxonomy of the Rhodniini derived from mitochondrial and nuclear DNA sequences. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **62**: 460–465.
- Monteiro, F. A.; A. A. Escalante & C. B. Beard. 2001. Molecular tools and triatomine systematics: a public health perspective. *Trends in Parasitology* **17**: 344–347.
- Monteiro, F. A.; M. J. Donnelly; C. B. Beard & J. Costa. 2004. Nested clade and phylogeographic analyses of the Chagas disease vector *Triatoma brasiliensis* in Northeast Brazil. *Molecular Phylogenetics Evolution* **32**: 46–56.
- Noireau, F.; M. G. R. Cortez; F. A. Monteiro; A. M. Jansen & F. Torrico. 2005. Can wild *Triatoma infestans* foci in Bolivia jeopardize Chagas disease control efforts? *Trends in Parasitology* **21**: 7–10.
- Patterson, J. S.; C. J. Schofield; J. P. Dujardin; M. A. Miles. 2001. Population morphometric analysis of the tropicopolitan bug *Triatoma rubrofasciata* and relationships with old world species of *Triatoma*: evidence of new world ancestry. *Medicine Veterinary and Entomology* **15**: 443–451.
- Paula, A. S. de; L. Diotaiuti & C. J. Schofield. 2005. Testing the sister-group relationship of the Rhodniini and Triatomini (Insecta:

- Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Molecular Phylogenetics Evolution** **35**: 712–718.
- Poinar, J. R. G. 2005. *Triatoma dominicana* sp. n. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), and *Trypanosoma antiquus* sp. n. (Stereocoraria: Trypanosomatidae), the First Fossil Evidence of a Triatomine-Trypanosomatid Vector Association. **Vector-borne and Zoonotic Diseases** **5**: 72–81.
- Richer W.; P. Kengne; M. R. Cortez; M. M. Perrineau; A. Cohuet; D. Fontenille & F. Noireau. 2007. Active dispersal by wild *Triatoma infestans* in Bolivian Andes. **Tropical Medicine and International Health** **12**: 759–764.
- Sainz, A. C.; L. V. Mauro; E. N. Moriyama & B. A. García. 2004. Phylogeny of triatomine vectors of *Trypanosoma cruzi* suggested by mitochondrial DNA sequences. **Genetica** **121**: 229–240.
- Sandoval, C. M.; E. Pabon; J. Jurberg & C. Galvão. 2007. *Belminus ferroae* n. sp. from the Colombian north-east, with a key to the species of the genus (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Zootaxa** **1443**: 55–64.
- Santos, C. B. dos; G. R. Leite; G. E. M. Ferreira & A. L. Ferreira. 2006. Infecção natural de *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) por fragelados morfológicamente semelhantes ao *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) no Estado do Espírito Santo. **Revista Brasileira de Medicina Tropical** **39**: 89–91.
- Santos, S. M. dos; C. M. Lopes; J. P. Dujardin; F. Panzera; R. Pérez; A. L. Carbajal de la Fuente; R. S. Pacheco & F. Noireau. 2007. Evolutionary relationships based on genetic and phenetic characters between *Triatoma maculata*, *Triatoma pseudomaculata* and morphologically related species (Reduviidae: Triatominae). **Infection, Genetics and Evolution** **7**: 469–475.
- Scheafer, C. W. 2003. Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): Systematic Questions and Some Others. **Neotropical Entomology** **32**: 001–010 (FORUM).
- Scheafer, C. W. 2005. Why are the subfamily relationships of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) important? **Entomologia y Vectores** **12**: 19–35.
- Schmuñis, G. A. 1999. **Iniciativa del Cono Sur**. In Proceedings of the Second International Workshop on Population Biology and Control of Triatominae (Schofield, C. J. and Ponce, C., eds), pp. 26–31.
- Schofield, C. J. 1988. **Biosystematics of Triatominae**. In: **Biosystematics of Haematophagous insects** (ed. M.W. Service) Systematics Association Special Volume 37, pp. 284–312. Clarendon Press, Oxford.
- Schofield, C. J.; J. Jannin & R. Salvatella. 2006. The future of Chagas disease control. **Trends in Parasitology** **22**: 583–588.
- Solano, P.; J. P. Dujardin; C. J. Schofield; C. Romana & M. Tibayrenc. 1996. Isoenzymes as a tool for identification of *Rhodnius* species. **Research and Reviews in Parasitology** **56**: 41–47.
- Stohart, J. R.; Y. Yamamoto; A. Cherchi; A. L. Garcia; S. A. S. Valente; C. J. Schofield; & M. A. Miles. 1998. A preliminary survey of mitochondrial sequence variation in Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) using polymerase chain reaction-based single strand conformational polymorphism (SSPC) analysis and direct sequencing. **Bulletin of Entomological** **88**: 553–560.
- Thompson, J. D.; D. G. Higgins & T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL-W: improving the sensitivity and progressive multiple sequence alignment through sequenced weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acid Research** **22**: 4673–4680.
- W.H.O. 1990. **Tropical Diseases 1990**. TDR/CTD/HH20.1, World Health Organization.
- W.H.O. 1991. **Control of Chagas Disease**. WHO Technical Report Series 811, World Health Organization.
- W.H.O. 2002. **Control of Chagas Disease**. Second Report of the WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series 905: 109.
- Zahler, A. M. & M. B. Roth. 1995. Distinct functions of SR proteins in recruitment of U1 small nuclear ribonucleoprotein to alternative 5' splice sites. **Proceeding of Natural Academy of Science. USA**. **92**: 2642–2646.