



FIOCRUZ

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

**FILOGEOGRAFIA DE *TRITOMA SORDIDA* (STÅL, 1859)
NAS ECORREGIÕES DO CERRADO, CAATINGA E CHACO**

Carla Cristina Moreira Ribeiro

Rio de Janeiro
2014



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

FILOGEOGRAFIA DE *TRITOMA SORDIDA* (STÅL, 1859) NAS ECORREGIÕES DO CERRADO, CAATINGA E CHACO

Carla Cristina Moreira Ribeiro

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde da Fundação Oswaldo Cruz/IOC como requisito parcial para à obtenção do grau de Mestre em Biodiversidade e Saúde.

Orientador: Dr. Cleber Galvão Ferreira
Co-orientador: Dr. Fernando Araújo Monteiro

Rio de Janeiro
2014



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

FILOGEOGRAFIA DE *TRIATOMA SORDIDA* (STÅL, 1859) NAS ECORREGIÕES DO CERRADO, CAATINGA E CHACO

Carla Cristina Moreira Ribeiro

BANCA EXAMINADORA

Dra. Alejandra Saori Araki
Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ

Dra. Daniela Maeba Takiya
Departamento de Zoologia, UFRJ

Dr. Cristiano Valentim da Silva Lazoski
Departamento de Genética, UFRJ

Dra. Karina Alessandra Morelli (Suplente)
Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ

Dr. Gabriel Eduardo Melim Ferreira (Suplente)
Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ

Rio de Janeiro
2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Ribeiro, Carla Cristina Moreira

Filogeografia de *Triatoma sordida* (Stål, 1859) nas ecorregiões do cerrado, caatinga e chaco. Carla Cristina Moreira Ribeiro, 2014. 79p.

Orientador: Dr. Cleber Galvão Ferreira

Co-orientador: Dr. Fernando Araújo Monteiro

Dissertação de Mestrado em Biodiversidade e Saúde, área de concentração em Taxonomia e Sistemática.

Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ

1. *Triatoma sordida*. 2. citocromo b. 3. filogeografia. 4. complexo de espécies. I. Cleber Galvão Ferreira II. Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ III. Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde IV. Mestrado.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Tereza Ribeiro e Antonio Carlos Ribeiro pelos carinhos e cuidados, ao Plínio Nogueira pelo companheirismo e aos meus queridos amigos pelo apoio e confiança.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Dr. Cleber Galvão pela extrema paciência, por estar sempre disposto a ajudar e pelos conselhos sobre o melhor caminho a percorrer encorajando-me a seguir em frente. Muito obrigada pela oportunidade de realizar meu mestrado no Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos.

Agradeço ao meu co-orientador Dr. Fernando Monteiro pelas sugestões e correções que contribuíram imensamente para elaboração desta dissertação. Obrigada pela paciência e ensinamentos. Agradeço também pela oportunidade de realizar meus experimentos no laboratório de Epidemiologia e Sistemática Molecular, onde aprendi muito nestes dois anos e tais conhecimentos estão contribuindo (e irão contribuir) de forma positiva no meu crescimento profissional.

Agradeço aos meus pais Tereza e Carlos pelo apoio e por acreditarem em mim, até mesmo naqueles momentos em que nem mesmo eu acreditava, seria impossível ter chegado até aqui sem vocês. Agradeço agora e sempre a Deus por ter me dado à honra de ter sido filha de pessoas tão maravilhosas.

Agradeço ao meu namorado Plínio por aguentar minhas reclamações e inseguranças e por sempre acreditar que eu posso ir muito além do que imagino. Seu companheirismo e amizade foram importantíssimos nesta etapa (e em muitas outras) da minha vida.

Agradeço a Karina Morelli pelo enorme apoio e por ser uma pessoa tão maravilhosa, profissional que eu tenho como espelho, pois possui as três coisas que, para mim, são fundamentais: dedicação, capacidade e o respeito com aqueles que estão iniciando o caminho do “mundo científico”. Agradeço por poder dizer que somos amigas e por sempre poder contar com você.

Agradeço ao Márcio Pavan pelos ensinamentos, pelas infinitas ajudas que foram muito importantes na elaboração deste trabalho e por ser uma pessoa extremamente gentil e prestativa. Você também é um espelho para mim e profissionais como você certamente acrescentam muito para a ciência em nosso país.

Agradeço a Marina por seu grande apoio, tanto moral quanto na elaboração desta dissertação. Você é um exemplo de pessoa: dedicada, responsável, muito competente e centrada. Faz quase sete anos que nos conhecemos (passou rápido né?) e ainda aprendo muito com você.

Agradeço a Andréia pelos conselhos valiosíssimos que vou levar comigo onde for. Agradeço também a minha “irmã gêmea” Jessica pelo apoio e carinho que foram muito importantes para mim, a Carolina por me fazer rir com seu jeitinho meigo e

maluquinho de ser, a Joana por estar sempre disposta a ajudar, a tirar minhas dúvidas sobre esses programas “complicados” e a Paloma por sempre me mostrar que desistir nunca é o caminho, que a perseverança e determinação é o único modo de se conquistar seus sonhos e nunca, nunca mesmo, ficar reclamando dos problemas. Espero que jamais nos afastemos e que possamos manter nossa amizade, pois pessoas como vocês são raras. Muito obrigada por tudo.

Agradeço ao Dr. Rodrigo Gurgel-Gonçalves por ter cedido as amostras de *T. sordida* utilizadas neste estudo e por estar sempre disposto a ajudar.

Agradeço a Dra. Alejandra Saori Araki por ter aceitado o convite para participar da banca examinadora e pelas revisões realizadas nesta dissertação, contribuindo imensamente para o enriquecimento deste trabalho. Agradeço também aos integrantes da banca examinadora, Dra. Daniela Maebe Takiya, Dr. Cristiano Valentim da Silva Lazoski, Dr. Gabriel Eduardo Melim Ferreira e Dra. Karina Alessandra Morelli, por terem aceitado o convite e pela atenção e paciência.

Agradeço a Deus pelas suas bênçãos em minha vida e por ser meu maior conforto nos momentos difíceis.

**A maior glória na vida não é nunca cair,
mas se levantar depois de cada queda.**

Nelson Mandela

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	VII
LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES	VIII
RESUMO	IX
ABSTRACT	X
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Doença de Chagas	1
1.2. Subfamília Triatominae	3
1.3. Gênero <i>Triatoma</i> e o subcomplexo <i>Triatoma sordida</i>	4
1.4. <i>Triatoma sordida</i>	7
2. JUSTIFICATIVA	11
3. OBJETIVOS.....	12
3.1. Objetivo geral	12
3.2. Objetivos específicos	12
4. MATERIAL E MÉTODO	13
4.1. Descrição das amostras estudadas.....	13
4.2. Extração do DNA genômico, PCR e sequenciamento.....	16
4.3. Edição das sequências	17
4.4. Filogenia e genealogia molecular	17
4.5. Genética de populações	18
4.5.1. Análise de polimorfismo das populações.....	19
4.5.2. Análise molecular de variância.....	19
4.5.3. Níveis de estruturação populacional (F_{st}).....	20
4.5.4. Testes de neutralidade	20
4.5.5. Expansão populacional	21
5. RESULTADOS	22
5.1. Identificação morfológica das amostras e edição de sequências	22
5.2. Filogenia de <i>T. sordida</i>	23
5.3. Rede de haplótipos.....	26
5.4. Definição das populações de <i>T. sordida</i>	29
5.5. Variabilidade das sequências do gene <i>cyt b</i> e análise da divergência molecular ...	30
5.6. Diversidade genética das populações de <i>T. sordida</i>	32
5.7. Estruturação populacional de <i>T. sordida</i>	33
5.8. Teste de neutralidade.....	34
5.9. <i>Mismatch distribution</i>	35
6. DISCUSSÃO.....	38
6.1. Filogenia e o status taxonômico de <i>T. sordida</i>	38
6.2. Variabilidade populacional	46
6.3. Origem e dispersão de <i>T. sordida</i>	48
7. CONCLUSÕES	51
8. REFERÊNCIAS	52
9. APÊNDICE	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelagem de nicho ecológico projetada como distribuição potencial da espécie <i>T. sordida</i>	8
Figura 2. Sítios amostrados da espécie <i>T. sordida</i> (pontos em vermelho) e <i>T. garciabesi</i> (ponto em azul)	15
Figura 3. Morfologia externa da cabeça e tórax de <i>T. sordida</i> (A) e <i>T. garciabesi</i> (B) ...	22
Figura 4. Árvore filogenética de <i>Neighbor-Joining</i> construída a partir do fragmento de 505pb do gene <i>cyt b</i> , com base na matriz de distância K2- <i>p</i> dos haplótipos encontrados em cada localidade	24
Figura 5. Árvores filogenéticas de <i>Neighbor-Joining</i> (A) e Máxima verossimilhança (B) construídas a partir do fragmento de 505pb do gene <i>cyt b</i> , com base na matriz de distância K2- <i>p</i> e HKY, respectivamente, contendo as amostras analisadas e outras espécies relacionadas à <i>T. sordida</i>	25
Figura 6. Gráfico de pizza dos haplótipos presentes em cada localidade amostrada ...	27
Figura 7. Rede genealógica dos 23 haplótipos amostrados do fragmento do gene <i>cyt b</i> de <i>T. sordida</i>	28
Figura 8. Mapa contendo as sete populações de <i>T. sordida</i> definidas por SAMOVA	30
Figura 9. Sítios variáveis do fragmento do gene <i>cyt b</i> observados no alinhamento dos haplótipos das subpopulações de <i>T. sordida</i> analisadas.....	32
Figura 10. Resultados das análises de <i>Mismatch distribution</i>	36
Figura 11. Árvore filogenética observada na figura 5A demonstrando a formação de dois grupos filogeneticamente distintos	41
Figura 12. Visão dorsal das espécies <i>Triatoma sordida</i> (A) e <i>Triatoma matogrossensis</i> (B).....	43
Figura 13. Mapa mostrando o possível centro de endemismo de <i>T. sordida</i> e sua dispersão	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos, complexos e subcomplexos do gênero <i>Triatoma</i>	5
Tabela 2. Amostras analisadas de <i>T. sordida</i> e <i>T. garciabesi</i>	14
Tabela 3. Amostras sequenciadas de <i>T. sordida</i> e <i>T. garciabesi</i>	23
Tabela 4. Análise espacial molecular de variância (SAMOVA) e a análise molecular de variância (AMOVA) para o agrupamento de sete populações.	29
Tabela 5. Divergência molecular média entre as sequências das populações de <i>T. sordida</i> comparadas par-a-par, utilizando o modelo de distância K2- <i>p</i>	31
Tabela 6. Diversidade haplotípica (H_d) e nucleotídica (π) intrapopulacionais de <i>T. sordida</i>	33
Tabela 7. Valores de estruturação populacional (F_{st}) a partir de comparações par-a-par entre as sequências das diferentes populações.	34
Tabela 8. Testes de neutralidade de Tajima (D) e Fu (F_s).	35
Tabela 9. Resultados dos índices (τ , θ e M) para os testes das hipóteses de súbitas expansões geográfica e demográfica.	37
Tabela 10. Divergência molecular média entre as sequências de <i>T. sordida</i> e espécies relacionadas, utilizando o modelo de distância K2- <i>p</i>	41

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

α - nível de significância
°C - graus Celsius
 μL - microlitro
 μM - micromolar
AMOVA - análise molecular de variância
A - adenina
C - citocina
COI - citocromo *c* oxidase I
cyt *b* - citocromo *b*
D - Índice de neutralidade Tajima (1989)
DNA - ácido desoxirribonucléico
dNTP - desoxirribonucleotídeo trifosfato
F_S - Índice de neutralidade
F_{st} - Índice de fixação Wright (1978)
G - guanina
Gpi - *locus* glicose-6-fosfato isomerase
ldh2 - isocitrato desidrogenase
ITS-2 - segundo espaçador interno transcrito ribossomal
K2-p - Kimura 2-parâmetros
Mdh2 - melato desidrogenase
MgCl₂ - cloreto de magnésio
ng - nanograma
OTUs – unidades taxonômicas operacionais
pb - pares e base
PCR - reação em cadeia da polimerase
Pep-1 - *locus* aminopeptidase 1
Pep-2 - *locus* aminopeptidase 2
phi (Φ) - Índice de variância, análogos aos F de Wright (1978)
r - índice do limite irregular
SAMOVA - análise espacial molecular de variância
SSD - soma do quadrado dos desvios
theta (θ) - parâmetro mutacional
T - timina
U - unidade funcional

RESUMO

Triatoma sordida é um triatomíneo nativo de regiões de clima tipicamente seco e de altas temperaturas. Apresenta ampla distribuição, ocorrendo no Brasil, Argentina, Paraguai e Bolívia. É um importante vetor secundário da doença de Chagas sendo frequentemente capturado em ecótopos artificiais próximos a habitações humanas, como galinheiros, currais e estábulos. Por ser uma espécie autóctone e apresentar populações silvestres e peridomésticas que podem ocasionalmente recolonizar áreas previamente tratadas, principalmente após a eliminação dos vetores de maior importância epidemiológica, estratégias tradicionais de controle vetorial, como o uso de inseticidas residuais, podem ser ineficazes para eliminação de *T. sordida*. Por estas razões, torna-se necessário o desenvolvimento de novas medidas de vigilância e controle destinadas especificamente a este vetor. Estudos moleculares têm demonstrado alta diversidade genética entre populações de *T. sordida*, sugerindo que esta espécie representa na verdade um complexo de espécies crípticas que podem apresentar diferenças quanto à relevância epidemiológica. Deste modo, para a elaboração e aplicação de melhores estratégias de controle contra esse vetor é fundamental que uma correta identificação taxonômica de *T. sordida* seja realizada, além da delimitação precisa de sua distribuição geográfica. Um estudo filogeográfico de espécimes de *T. sordida* coletados em nove localidades no Brasil e uma na Argentina foi realizado utilizando um fragmento de 510 pb do gene mitocondrial citocromo b (*cyt b*). As análises filogenéticas revelaram que as populações de *T. sordida* amostradas nesse estudo formam um grupo monofilético, filogeneticamente distinto de populações de *T. sordida* da Bolívia (*T. sordida* grupos 1 e 2). Interessantemente, análise das amostras de Rochedo em Mato Grosso do Sul sugerem a ocorrência de um processo recente de especiação. Resultados das análises populacionais revelaram baixos níveis de fluxo gênico entre as populações estudadas (valores de F_{ST} entre 0,22 e 1,00). As sequências de *cyt b* das populações de *T. sordida* apresentaram baixa diversidade nucleotídica (valores de π entre 0,0000 e 0,0077) e 23 haplótipos foram detectados (três deles compartilhados entre diferentes localidades). A população identificada como Poxoréu/Formosa/Lontra apresentou valores negativos e significativos nos testes de neutralidade (ressaltando que o teste de Fu apresentou valor-*p* limítrofe) o que juntamente com os resultados obtidos a partir das análises de *mismatch distribution* e da rede de haplótipos, indicam expansão súbita e recente dessa população. Isto sugere que, possivelmente, a ecorregião do cerrado brasileiro seja o centro de origem e dispersão de *T. sordida*.

ABSTRACT

Triatoma sordida is a triatomine species native to regions of typically dry weather and high temperatures. It presents a wide distribution, occurring in Brazil, Argentina, Paraguay and Bolivia. It is an important secondary vector for Chagas disease being often captured in artificial ecotopes close to human dwellings, such as chicken coops, corrals and stables. Because it is an autochthonous species with sylvatic and peridomestic populations that can occasionally recolonize previously treated areas (mainly after the elimination of vectors of greater epidemiological importance) traditional vector control strategies, such as the use of residual insecticides, may be ineffective against *T. sordida*. For these reasons, the development of new measures of surveillance and control intended specifically for this vector are required. Molecular studies have shown high genetic diversity among *T. sordida* populations, suggesting that this species represents, actually, a cryptic species complex that may conceal units with differences in epidemiological relevance. Thereby, to elaborate better control strategies against this vector it is important to determine the taxonomic status of *T. sordida* populations and the limits of their geographic distribution. A phylogeographic study of *T. sordida* specimens collected from nine locations in Brazil and one in Argentina was carried out using a fragment of 510pb of the mitochondrial gene cytochrome b (cyt *b*). The phylogenetic analyses revealed that the *T. sordida* populations sampled consist in a monophyletic group distinct of *T. sordida* populations of Bolivia (*T. sordida* groups 1 and 2). Interestingly, the analysis of Mato Grosso do Sul samples suggests the occurrence of a recent speciation process. Results of population analyses revealed low levels of genic flow among the studied populations (F_{st} values between 0.22 and 1.00). Nucleotide diversity was low (π values between 0 and 0.0077) and twenty three haplotypes were detected (three of them shared among different locations). The population identified as Poxoréu/Formosa/Lontra showed negative and significant values in tests of neutrality (the Fu test gave borderline *p*-values), which along with the obtained results from mismatch distribution analysis and from the haplotype network, indicate a sudden and recent expansion of this population. This indicates that, possibly, the Brazilian cerrado ecoregion is the center of origin and dispersion of *T. sordida*.

1. Introdução

1.1. Doença de Chagas

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é uma infecção sistêmica crônica causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. É transmitida, principalmente, através do contato de fezes contaminadas de insetos vetores pertencentes à subfamília Triatominae com a corrente sanguínea ou mucosas dos hospedeiros. O ciclo antroponóico teve início após a domiciliação desses vetores, provocada pelo desmatamento e construção de habitações próximas a florestas, o que possibilitou a circulação do *T. cruzi* não apenas entre animais silvestres, mas ainda entre animais domésticos e o homem (Coura & Borges-Pereira, 2010).

A doença de Chagas representa um importante problema de saúde pública na América Latina, ocorrendo predominantemente em áreas rurais e em desenvolvimento, afetando cerca de 8 milhões de pessoas com 10 mil mortes por ano (OMS, 2010; OMS/TDR, 2012). Por ser uma das doenças parasitárias de maior impacto socioeconômico nestes países, iniciativas multinacionais coordenadas pela Organização Pan-Americana de Saúde foram realizadas com o objetivo de interromper a transmissão da infecção. Por não haver vacinas para proteção de indivíduos suscetíveis e nem tratamentos específicos para a fase crônica da doença, foi proposto, em 1991, na chamada Iniciativa do Cone Sul, a interrupção da transmissão mediada pela eliminação do vetor epidemiologicamente mais relevante, o *Triatoma infestans*, e a triagem de bancos de sangue (Schofield *et al.*, 2006).

O modelo de controle da transmissão implementado pelos países do Cone Sul foi adaptado posteriormente em outras iniciativas, como a dos países andinos, em 1996, da América Central, em 1997, e mais recentemente a Iniciativa dos países amazônicos, em 2004 (Dias, 2007). Essas ações preventivas reduziram substancialmente a incidência da doença, que passou de 700 mil novos casos em 1990 para 40 mil em 2006, principalmente devido à eliminação do *T. infestans* no Brasil, Uruguai, Chile, oeste do Paraguai e em algumas províncias da Argentina (OMS/TDR, 2007). Embora a prevalência, incidência e mortalidade tenham sido reduzidas, a

tripanossomíase americana ainda é a quarta doença tropical negligenciada mais importante, permanecendo endêmica em grande parte da América Latina (Hotez *et al.*, 2008). Isto se deve, principalmente, à ocorrência de reinfestações ocasionais de áreas previamente tratadas por populações silvestres de triatomíneos autóctones, como o restabelecimento de colônias de *T. infestans* em áreas domésticas na Argentina e de *Rhodnius prolixus* na Venezuela e Colômbia (Gürtler *et al.*, 1994; Fitzpatrick *et al.*, 2008). A reinfestação pode ocorrer também a partir de focos peridomésticos residuais após as aplicações de inseticidas (Cecere *et al.*, 1997). A dificuldade das campanhas de controle em eliminar insetos de áreas peridomiliares, por apresentarem inúmeros locais inacessíveis à borrifação, pode, portanto, contribuir para a manutenção da transmissão da doença ao homem (Diotaiuti *et al.*, 2000; Cecere *et al.*, 2006).

A capacidade de algumas espécies (consideradas anteriormente como insetos exclusivamente silvestres) de colonizar ambientes artificiais, como *T. rubrovaria*, *Panstrongylus lutzi*, *P. geniculatus*, *P. rufotuberculatus*, *R. stali* e *Eratyrus mucronatus*, representa um problema adicional para as campanhas de controle em razão do risco de domiciliação dessas espécies e possível restabelecimento da transmissão (Schofield *et al.*, 1999; Reyes-Lugo & Rodriguez-Acosta, 2000; Silveira & Dias, 2011).

Conseqüentemente, é fundamental o constante monitoramento de áreas tratadas e a elaboração e aplicação de novas estratégias de controle melhor adaptadas aos novos e diferentes padrões epidemiológicos. Para isso, é necessário o conhecimento da ecologia, a precisa identificação e o correto mapeamento das áreas de ocorrência de diferentes espécies de triatomíneos, em especial, das espécies autóctones, que auxiliarão na determinação de sua importância epidemiológica (Guhl *et al.*, 2009).

1.2. Subfamília Triatominae

A subfamília Triatominae pertence à família Reduviidae e é caracterizada por agrupar insetos hematófagos obrigatórios que compartilham características morfológicas não observadas em outros reduvídeos, associadas ao hábito picador-sugador (Lent & Wygodzinsky, 1979). Os triatomíneos possuem desenvolvimento hemimetabólico, apresentando cinco estádios de ninfa antes de atingirem a fase adulta, necessitando de, no mínimo, uma alimentação de sangue em cada ínstar para completarem seu desenvolvimento (Lent & Wygodzinsky, 1979). Alguns desses insetos são altamente adaptados a certas fontes de alimento, como espécies do gênero *Psammolestes* que são associadas a ninhos de pássaros da família Furnariidae, enquanto outras, tais como *P. megistus*, *P. geniculatus*, *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata*, são mais generalistas e podem se adaptar a novos ambientes e colonizar biótopos artificiais mais facilmente (Costa *et al.*, 1998; Freitas *et al.*, 2005; Patterson *et al.*, 2009; Gurgel-Gonçalves & Cuba, 2011).

A subfamília Triatominae é composta atualmente por 148 espécies e duas espécies fósseis, distribuídas em cinco tribos e 18 gêneros (Galvão *et al.*, 2003; Schofield & Galvão, 2009; Abad-Franch *et al.*, 2013; Poinar, 2013). É predominantemente encontrada no continente americano, entretanto, a espécie *Triatoma rubrofasciata* é amplamente distribuída em áreas de portos do Novo e Velho Mundo. Um grupo de seis espécies de *Triatoma* é encontrado no continente Asiático e o gênero *Linshcosteus*, com seis espécies descritas, ocorre somente no subcontinente Indiano (Galvão *et al.*, 2003).

Todos os triatomíneos são considerados potenciais vetores da doença de Chagas, entretanto, somente cerca de 20 espécies pertencentes aos gêneros *Rhodnius*, *Triatoma* e *Panstrongylus* têm sido capazes de colonizar habitações humanas (Patterson, 2007). Dentre essas espécies, *T. infestans*, *R. prolixus* e *T. dimidiata* são consideradas vetores de maior importância epidemiológica (Dias, 2009; Rassi *et al.*, 2010).

A partir de estudos das relações filogenéticas entre as espécies pertencentes à subfamília Triatominae, diferentes interpretações sobre a origem dos triatomíneos têm sido observadas (Schaefer, 2003; Tartarotti *et al.*, 2006). Schofield em 1988

propôs uma origem polifilética da subfamília com base em análises biogeográficas e ecológicas. Posteriormente, outros estudos morfológicos, de morfometria e de análises de sequências de DNA mitocondrial e DNA ribossomal corroboraram essa hipótese, principalmente em relação às tribos Triatomini e Rhodniini, sugerindo que o hábito hematófago tenha surgido várias vezes dentro de cada linhagem de Reduviidae predadores, que por sua vez, geraram diversas tribos de Triatominae (Gorla *et al.*, 1997; de Paula *et al.*, 2005; Patterson, 2007). Entretanto, a monofilia da subfamília suportada por estudos morfológicos como de Lent & Wygodzinsky (1979) e Usinger e colaboradores (1966) foi também verificada por análises moleculares de um grande número de taxa da família Reduviidae, combinando sequências de DNA nuclear e DNA mitocondrial (Weirauch & Munro, 2009; Patterson & Gaunt, 2010).

1.3. Gênero *Triatoma* e o subcomplexo *Triatoma sordida*

O gênero *Triatoma* inclui o maior número de taxa dentro da subfamília Triatominae, com aproximadamente 80 espécies descritas (Schofield, 2000). Grande parte dessas espécies é encontrada na América Latina e Estados Unidos e um pequeno grupo de seis espécies ocorrem no sudeste da Ásia (Galvão *et al.*, 2003). *T. rubrofasciata*, espécie-tipo do gênero, é encontrada em áreas portuárias de vários países tropicais e subtropicais. Sua ocorrência geográfica ampla é provavelmente consequência de dispersão passiva a partir de embarcações provenientes da América do Sul (Gorla *et al.*, 1997).

Por ser consideravelmente diverso em relação ao número de espécies e variabilidade morfológica, o gênero *Triatoma* é subdividido em vários complexos, de acordo com as similaridades morfológicas, distribuição geográfica e relações evolutivas entre espécies. Diferentes classificações têm sido propostas para o gênero, como a de Lent & Wygodzinsky (1979) que o dividiu em dois grupos (Rubrofasciata e Protracta) e 11 complexos (*Infestans*, *Circummaculata*, *Protracta*, *Flavida*, *Rubrofasciata*, *Recurva*, *Nigromaculata*, *Dispar*, *Lecticularia* e *Phyllosoma*, *Spinolai*). Essa classificação teve como base características morfológicas de adultos e ninfas. Carcavallo e colaboradores (2000) revisaram os trabalhos publicados após 1979 e revalidaram o gênero *Meccus*,

agrupando as espécies dentro do complexo *T. phyllosoma*. Recentemente, Schofield & Galvão (2009) organizaram o gênero em três principais grupos: (1) espécies da América do Sul (grupo Infestans); (2) espécies da América do Norte (grupo Rubrofasciata, que inclui *T. rubrofasciata* e espécies que ocorrem no continente asiático); e (3) um grupo de cinco espécies que ocorrem nos Andes (grupo Dispar), como descrito na (Tabela 1).

Tabela 1. Grupos, complexos e subcomplexos do gênero *Triatoma*.

Grupo	Complexo	Subcomplexo
Rubrofasciata	<i>Phyllosoma</i>	<i>Triatoma dimidiata</i>
		<i>Triatoma phyllosoma</i> (=Meccus)
		<i>Flavia</i> (=Nesotriatoma)
		<i>Rubrofasciata</i>
Dispar	<i>Protracta</i>	<i>Lecticularia</i>
		<i>Dispar</i>
		<i>Infestans</i>
Infestans	<i>Infestans</i>	<i>Triatoma brasiliensis</i>
		<i>Triatoma infestans</i>
		<i>Triatoma maculata</i>
		<i>Triatoma matogrossensis</i>
		<i>Triatoma rubrovaria</i>
		<i>Triatoma sordida</i>
	<i>Spinolai</i> (=Mepraia)	

Adaptado de Schofield & Galvão, 2009.

O subcomplexo *Triatoma sordida* inclui quatro espécies, *T. sordida*, *T. guasayana*, *T. garciabesi* e *T. patagonica*, que ocupam uma extensa área da América do Sul, predominantemente em regiões com períodos de seca bem marcados, denominadas diagonal de formações abertas ou diagonal de áreas secas, que compreendem os biomas do cerrado, caatinga e chaco seco (Carcavallo *et al.*, 2000; Carvalho e Almeida, 2011). A sobreposição parcial da distribuição geográfica, e a alta similaridade e grande plasticidade morfológica e cromática dificultam a identificação e discriminação das espécies pertencentes a este subcomplexo (Gorla *et al.*, 1993; Carcavallo *et al.*, 2000).

Carcavallo e colaboradores (1967) identificaram diferenças morfológicas entre espécimes de *T. sordida* do nordeste da Argentina (região úmida), que eram grandes e de coloração clara, e espécimes do noroeste (região semi-árida), que eram menores e

mais escuros. Os últimos foram descritos por esses autores como uma nova espécie, denominada *T. garciabesi*. Entretanto, alguns anos depois, Lent & Wygodzinsky (1979) as sinonimizaram. Posteriormente, com base em diferenças morfológicas, citogenéticas e isoenzimáticas, a espécie foi revalidada por Jurberg e colaboradores (1998). Dados adicionais de morfometria, nicho ecológico e de sequências de DNA mitocondrial (mtDNA) têm reafirmado a validade taxonômica de *T. garciabesi* (Sainz *et al.*, 2004; Gurgel-Gonçalves *et al.*, 2011).

Apesar da similaridade morfológica entre *T. sordida* e *T. guasayana*, especialmente nos estádios ninfais, estudos de isoenzimas, morfometria e citogenética têm indicado que são de fato espécies distintas (Gorla *et al.*, 1993; Panzera *et al.*, 1997). Dentre as quatro espécies do subcomplexo *Triatoma sordida*, *T. patagonica* é a espécie mais facilmente distinguível, principalmente através do padrão de coloração (Lent & Wygodzinsky, 1979). Entretanto, seu *status* taxonômico foi questionado por Gorla e colaboradores (1993) após análises de morfometria multivariável combinada com comparações das estruturas das antenas e genitália.

Nos últimos anos, estudos utilizando marcadores moleculares para inferência das relações evolutivas entre as espécies do gênero *Triatoma* têm demonstrado que muitos complexos e subcomplexos desse gênero não constituem grupos naturais (Hypsa *et al.*, 2002; Marcilla *et al.*, 2002; Justi *et al.*, 2014; Rúa *et al.*, 2014). As análises de fragmentos do DNA mitocondrial dos genes 12S e 16S do RNA ribossomal, citocromo *c* oxidase I (COI) e citocromo *b* (*cyt b*) sugerem que o subcomplexo *Triatoma sordida* não represente um grupo monofilético (García *et al.*, 2001; Hypsa *et al.*, 2002; Sainz *et al.*, 2004). Apesar da grande semelhança morfológica entre as espécies pertencentes a esse subcomplexo, análises filogenéticas têm demonstrado que as espécies *T. garciabesi* e *T. sordida* são mais relacionadas à espécie *T. matogrossensis*, pertencente ao subcomplexo *Triatoma matogrossensis*, do que às outras espécies do subcomplexo. Já *T. guasayana* e *T. patagonica* são filogeneticamente mais relacionadas aos membros pertencentes ao subcomplexo *Triatoma rubrovaria* (Sainz *et al.*, 2004; Almeida *et al.*, 2009; Gardim *et al.*, 2013). As informações sobre as relações de parentesco dentro do subcomplexo *Triatoma sordida*, assim como para alguns complexos do gênero *Triatoma*, ressaltam a necessidade de uma profunda revisão sobre a classificação do gênero (Justi *et al.*, 2014).

Embora os complexos específicos não sejam uma categoria taxonômica reconhecida pelo Código Internacional de Nomenclatura Zoológica, é importante que uma correta classificação desses agrupamentos seja realizada já que muitas vezes informações epidemiológicas de determinados vetores são extrapoladas para espécies com estreitas relações de parentesco (Schaefer, 2003).

1.4. *Triatoma sordida*

T. sordida é extensamente distribuída na América do Sul, encontrada principalmente na região central e norte da Argentina, na região central do Paraguai e da Bolívia e em 11 estados no Brasil (Bahia, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo e Tocantins) (Figura 1) (Lent & Wygodzinsky; 1979; Bar & Wisnivesky-Colli, 2001; Jurberg *et al.*, 1998; Gurgel-Gonçalves *et al.*, 2011). Essa espécie ocorre normalmente em regiões áridas e é a espécie do gênero *Triatoma* com maior distribuição no cerrado brasileiro (Gurgel-Gonçalves *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2013). Os principais ecótopos naturais da espécie são ninhos de pássaros e ocos e cascas de árvores. Alimenta-se de uma variedade de hospedeiros, com maior preferência por aves (Rocha e Silva *et al.*, 1977; Diotaiuti *et al.*, 1993). Esse triatomíneo ocorre predominantemente no ambiente peridomiciliar, sendo a espécie da subfamília Triatominae mais frequentemente capturada nesse ecótopo no Brasil (Diotaiuti *et al.*, 1998; Pelli *et al.*, 2007; Almeida *et al.*, 2008).

T. sordida é considerada um importante vetor da doença de Chagas em razão da alta taxa de infecção por *T. cruzi* de *T. sordida* encontrado em palmeiras (*Butia yatay* e *Acrocomia aculeata*) e de sua alta capacidade de dispersão (Forattini *et al.*, 1979; Forattini *et al.*, 1983; Bar & Wisnivesky-Colli, 2001). Além disso, paralelamente às campanhas de controle contra os vetores de maior importância epidemiológica, principalmente com relação às populações de *T. infestans*, foi observada uma tendência de *T. sordida* a invadir ambientes domiciliares anteriormente colonizados por essa espécie (Dias, 1988; Diotaiuti *et al.*, 1993). A competitiva exclusão de *T. sordida* por *T. infestans*, provavelmente causada pela maior capacidade de obtenção

de alimento pela última, pode ter atuado como um fator limitante à formação de colônias de *T. sordida* em ambientes domiciliares (Noireau *et al.*, 1996; Oscherov *et al.*, 2004).



Figura 1. Modelagem de nicho ecológico projetada como distribuição potencial da espécie *T. sordida*. Os quadrados indicam os pontos de ocorrência da espécie *T. sordida* na América do Sul. As áreas sombreadas em preto e cinza indicam a projeção estimada de sua ocorrência. As áreas em preto representam regiões com alta probabilidade de ocorrência da espécie e as áreas em cinza representam baixa probabilidade (com base em valores de predições da distribuição geográfica que variam de 0 a 100). Adaptado de Gurgel-Gonçalves *et al.*, 2011.

Análises de eletroforese de isoenzimas de populações de *T. sordida* da Bolívia realizadas por Noireau e colaboradores (1998) revelaram diferenças nas frequências alélicas e na taxa de migração dos *loci* *Mdh2* e *Idh2* entre amostras de diferentes localidades da região do chaco. Esse estudo evidenciou a ocorrência de duas prováveis espécies crípticas em *T. sordida* na Bolívia, identificadas como grupo 1 e grupo 2. Tais espécies apresentam diferentes distribuições geográficas e capacidade de dispersão

(Noireau *et al.*, 1999a). *T. sordida* grupo 2 supostamente ocorre em áreas silvestres e peridomésticas, e sua distribuição geográfica parece ser restrita ao chaco boliviano. Já *T. sordida* grupo 1 apresenta distribuição mais ampla e maior capacidade de invadir ambientes intradomiciliares (Noireau *et al.*, 1999a). Para determinar se a estruturação e variabilidade das populações de *T. sordida* do Brasil eram similares às verificadas na Bolívia, Monteiro e colaboradores (2009) analisaram perfis de isoenzimas em quatro populações coletadas em Minas Gerais e observaram baixa variabilidade genética e alta estruturação populacional. Esses resultados são similares ao nível de diferenciação genética observado por Noireau e colaboradores (1999b) em populações de *T. sordida* grupo 1 coletadas em Santa Cruz na Bolívia.

Alta variabilidade genética entre populações de *T. sordida* da Argentina e do Brasil foi identificada por Panzera e colaboradores (1997) ao analisarem características cromossômicas e padrões isoenzimáticos de *T. sordida*, *T. guasayana* e *T. patagonica*. Diferenças alélicas entre as duas populações foram observadas em três (*Gpi*, *Pep-1* e *Pep-2*) dos 19 *loci* analisados. Amostras de *T. sordida* da Argentina apresentaram ausência de heterocromatina autossômica durante o processo meiótico, o que não foi observado nas amostras do Brasil, que apresentaram heterocromatina em cerca de 30% do comprimento total dos cromossomos autossômicos. Diferenças no padrão de hidrocarbonetos cuticulares também foram observadas entre as populações de *T. sordida* do Brasil e da Argentina. No estudo realizado por Calderón-Fernández & Juárez (2013) as populações de *T. sordida* coletadas em Rondonópolis no Brasil e Córdoba na Argentina apresentam diferenças significantes em vários hidrocarbonetos, e algumas dessas variações foram similares às verificadas entre *T. sordida* e *T. garciabesi*.

A variabilidade genética entre populações de *T. sordida* observada, principalmente, através das análises citogenéticas e isoenzimáticas sugerem que essa espécie tenha sofrido um processo recente de especiação e que pode representar na verdade um complexo de, pelo menos, duas espécies crípticas (Noireau *et al.*, 1998).

Diversos estudos têm utilizado sequências de DNA mitocondrial (mtDNA) para determinar o relação filogenética entre diferentes gêneros e espécies de triatomíneos (Lyman *et al.*, 1999; Monteiro *et al.*, 2003; García *et al.*, 2003; Cortez *et al.*, 2007). Sequências parciais do gene *cty b* são comumente usadas em tais análises e tem sido observado que esse gene apresenta altos níveis de polimorfismo intra e

interpopulacional, e maior número de sítios variáveis quando comparado a outros genes mitocondriais, como COI e 16S, sugerindo que seja um marcador informativo para determinação da estrutura populacional e para comparações entre espécies próximas desse subfamília (Pfeiler *et al.*, 2006; Mas-Coma & Bargues, 2009; Blandón-Naranjo *et al.*, 2010; Monteiro *et al.*, 2013). Por esta razão, um estudo filogeográfico de diferentes populações de *T. sordida* do Brasil e da Argentina foi realizado através de sequenciamento do DNA mitocondrial, utilizando, como marcador, um fragmento do gene *cyt b*, a fim de determinar a variabilidade genética de *T. sordida* nas localidades amostradas.

2. Justificativa

Em 1859, Stål descreveu *T. sordida* como pertencente ao gênero *Conorhinus* Laporte, 1833 (sinônimo do gênero *Triatoma*). Posteriormente, Actis e colaboradores (1964) identificaram duas distintas populações dessa espécie ocorrendo na Argentina e no Brasil através da análise de eletroforese de proteínas da hemolinfa. Décadas depois, *T. sordida* foi identificada como um complexo de espécies isomórficas através, predominantemente, de estudos citogenéticos e isoenzimáticos (Panzera *et al.*, 1997; Jurberg *et al.*, 1998; Noireau *et al.*, 1998). Tais dados evidenciaram a alta diversidade genética em *T. sordida* e ressaltaram a necessidade da realização de mais estudos que possam determinar o correto status taxonômico de determinadas populações, seu nível de variação genética e estruturação populacional.

Dados filogenéticos derivados do emprego de marcadores mitocondriais têm contribuído para a detecção de espécies crípticas e para o esclarecimento sobre o processo de especiação em triatomíneos (Monteiro *et al.*, 2003; 2004; Dorn *et al.*, 2009; Abad-Franch *et al.*, 2013). Entretanto, atualmente, não há na literatura estudos populacionais de *T. sordida* baseados em sequenciamento de DNA mitocondrial. Assim, o presente estudo fornecerá informações relevantes acerca da variabilidade e estruturação populacional e da possibilidade de existência de espécies crípticas em amostras de populações de *T. sordida* do Brasil e da Argentina.

Em virtude dos processos de desmatamento de suas áreas de ocorrência e do progressivo controle dos principais vetores da doença de Chagas, a importância de *T. sordida* como vetor da doença têm aumentado (Forattini *et al.*, 1979; 1983; Oscherov *et al.*, 2004; Portillo-Quintero & Sánchez-Azofeifa, 2010). Os resultados que serão mostrados adiante poderão auxiliar no planejamento e execução de melhores estratégias de controle desse vetor, visto que a utilização de inseticidas residuais pode não ser eficaz contra *T. sordida* autóctone em regiões onde é sinantrópica, por apresentar focos extradomiciliares (peridoméstico e silvestre) que podem ocasionalmente recolonizar áreas previamente tratadas (Guhl *et al.*, 2009).

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Analisar a diversidade e a estruturação genética de populações de *T. sordida* das ecorregiões do cerrado, caatinga e chaco e inferir sua relação filogenética com espécies do subcomplexo *Triatoma sordida*.

3.2. Objetivos específicos

1. Determinar, a partir da análise filogenética de um fragmento do gene mitocondrial *cyt b*, se as populações de *T. sordida* amostradas formam um grupo monofilético.
2. Quantificar a variabilidade intraespecífica observada em *T. sordida* através da determinação dos parâmetros de diversidade nucleotídica (π) e haplotípica (Hd).
3. Determinar os níveis de estruturação genética das populações estudadas através da estimativa do índice de fixação (F_{ST}) e da análise molecular de variância (AMOVA).

4. Material e Método

4.1. Descrição das amostras estudadas

Foram analisados espécimes de *T. sordida* coletados no ano de 2008 no peridomicílio de nove localidades do Brasil e de uma localidade da Argentina (Tabela 2).

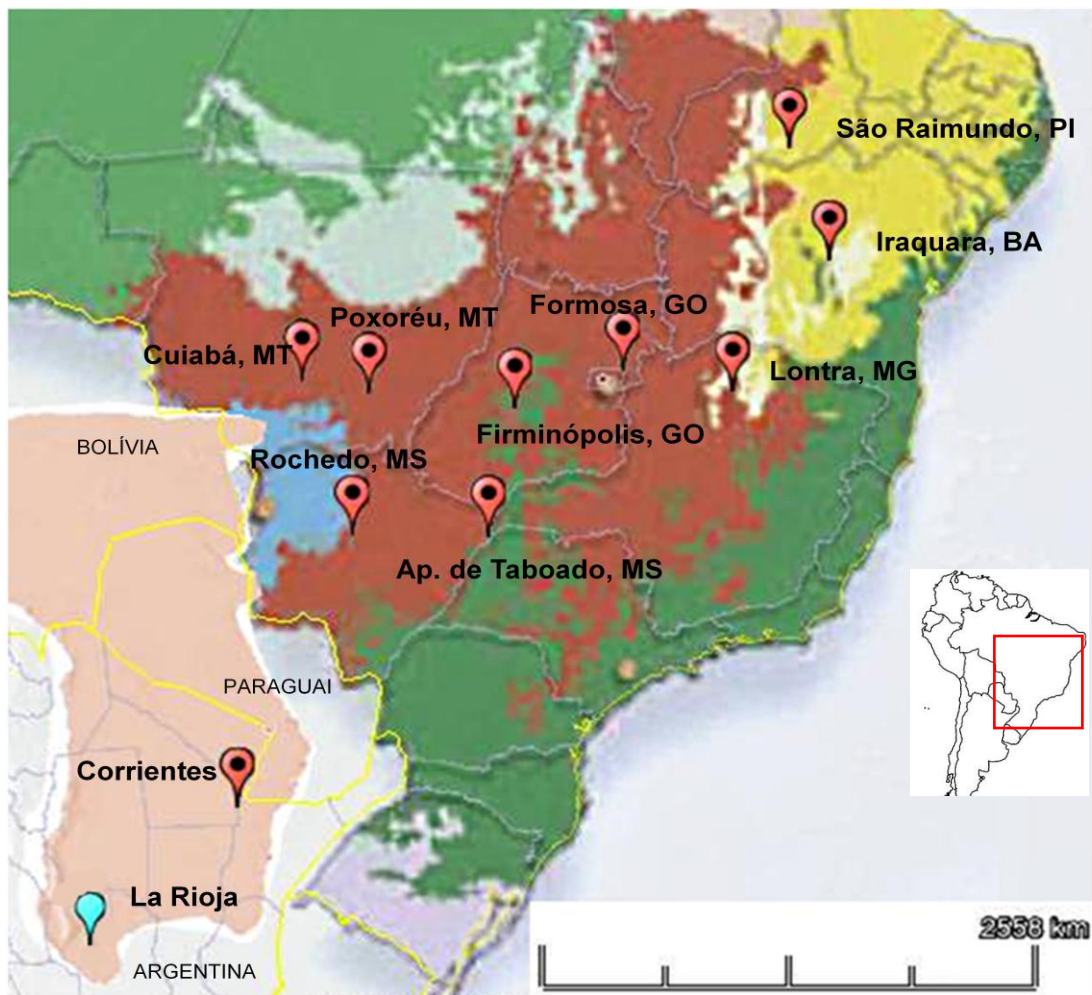
A identificação morfológica dos espécimes foi realizada com base em Lent & Wygodzinsky (1979). Para a identificação molecular, as amostras analisadas foram comparadas filogeneticamente com uma sequência de *T. sordida* coletada no Estado de Minas Gerais, Brasil, depositada no banco de sequências do laboratório de Epidemiologia e Sistemática Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz. Esta sequência foi utilizada como referência para determinar se os espécimes identificados morfológicamente como *T. sordida* e posteriormente sequenciados, pertenciam de fato à espécie em questão.

Amostras coletadas em La Rioja na Argentina e identificadas morfológicamente como *T. garciabesi* foram analisadas com o intuito de realizar inferências de parentesco com *T. sordida*, já que estas espécies são morfológicamente muito similares e ocorrem em simpatria na região central da Argentina.

Tabela 2. Amostras analisadas de *T. sordida* e *T. garciabesi*.

Espécie	Localidade/ Estado/País	Coordenadas geográficas	Código da localidade	Geração	N^a	Ecorregião
<i>T. sordida</i>	Cuiabá, MT, Brasil	15,58° S; 56,10° O	MTC	F1	9	Cerrado
	Poxoréu, MT, Brasil	15,83° S; 54,38° O	MTP	F1	9	Cerrado
	Rochedo, MS, Brasil	19,96° S; 54,87° O	MSR	F1	9	Cerrado
	Lontra, MG, Brasil	15,90° S; 44,30° O	MGL	F1	9	Cerrado
	Formosa, GO, Brasil	15,56° S; 47,27° O	GOO	Parental	9	Cerrado
	Firminópolis, GO, Brasil	16,66° S; 50,31° O	GOI	F1	9	Florestas do Alto Paraná
	Aparecida de Taboado, MS, Brasil	20,08° S; 51,08° O	MSA	F1	9	Florestas do Alto Paraná
	São Raimundo, PI, Brasil	09,01° S; 42,66° O	PIS	Parental	9	Caatinga
	Iraquara, BA, Brasil	12,26° S; 41,60° O	BAI	Parental	9	Caatinga
	Corrientes, COR, Argentina	27,18° S; 58,18° O	ARC	Parental	9	Chaco úmido
<i>T. garciabesi</i>	La Rioja, LR, Argentina	18,30° S; 12, 66° O	GAR	Parental	4	Chaco seco
	Total		-		94	

^a, número de espécimes analisados; **MT**: Mato Grosso; **MS**: Mato Grosso do Sul; **MG**: Minas Gerais; **GO**: Goiás; **PI**: Piauí; **BA**: Bahia; **COR**: Corrientes; **LR**: La Rioja.



Ecorregiões

- | | |
|---|--|
| ■ Amazônia | ■ Pantanal |
| ■ Caatinga | ■ Pampa |
| ■ Cerrado | ■ Chaco |
| ■ Mata Atlântica | |

Figura 2. Sítios amostrados da espécie *T. sordida* (pontos em vermelho) e *T. garciabesi* (ponto em azul). Mapa adaptado do Google Earth (2014).

4.2. Extração do DNA genômico, PCR e sequenciamento

O DNA foi extraído a partir de quatro pernas de indivíduos adultos utilizando o kit *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega) seguindo as instruções para extração do material genético de tecido animal sugerido pelo fabricante.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada para amplificação de um fragmento de 510pb do gene *cyt b* utilizando os iniciadores senso *CYT B7432F*, 5'-GGACG(AT)GG(AT)ATTTATTATGGATC (Monteiro *et al.*, 2003) e antisenso *CYT BR*, 5'-ATTACTCCTCTAGCTTATTAGGAATTG (Lyman *et al.*, 1999) em concentração final de 0,4 µM, tampão 1x, dNTP 0,25 mM, MgCl₂ 3 mM, 2,5 U de Taq DNA polimerase e 3 µL de DNA em um volume final de 50 µL. As reações foram submetidas, no termociclador *Mastercycler* (Eppendorf), à 1 ciclo de 95°C por 1 minuto, seguida de 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 51°C por 30 segundos, 72°C por 45 segundos, e uma etapa final de 10 minutos de extensão a 72°C.

A purificação dos produtos foi realizada utilizando o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) seguindo as instruções para purificação de produto de PCR.

As reações de sequenciamento foram realizadas para ambas as fitas de DNA, utilizando 2 µL de DNA molde (5-20 ng), 0,37 µL de Tampão 5x (Applied Biosystems), 0,25 µL de *BigDye* (Applied Biosystems), 0,25 µL de cada iniciador (3,2 µM) e 2,13 µL de água deionizada em volume final de 5µL. A ciclagem da reação consistiu em 35 ciclos de 96°C por 15 segundos, 50°C por 10 segundos e 60°C por 4 minutos.

Os produtos da reação de sequenciamento foram purificados através da precipitação com isopropanol e etanol, para remoção dos di-deoxinucleotídeos excedentes. Os produtos purificados foram ressuspensos em formamida *Hi-Di™* (Applied Biosystems), desnaturados a 95°C por 5 minutos e sequenciados em sequenciador automático de 48 capilares *ABI 3730* (Applied Biosystems), pertencente à Plataforma Genômica PDTIS-FIOCRUZ.

4.3. Edição das sequências

As sequências senso e antisenso de cada amostra foram editadas utilizando o programa *SeqMan Lasergene* versão 7 (DNASar, Inc.) e as sequências consenso de todos os espécimes analisados foram alinhadas no programa *BioEdit Sequence Alignment Editor 7.2* (Hall, 1999) usando o método de alinhamento múltiplo *ClustalW* (Thompson *et al.*, 1994).

4.4. Filogenia e genealogia molecular

A identificação molecular e filogenia das populações de *T. sordida* foram realizadas a partir da análise das sequências do gene mitocondrial *cyt b* no programa *MEGA v 6.06* (Tamura *et al.*, 2013). Sequências de *T. garciabesi* (La Rioja, Argentina), *T. guasayana* (Santa Cruz, Bolívia) e *T. matogrossensis* (Camapuã, Mato Grosso do Sul, Brasil) foram adicionadas às análises com o objetivo de demonstrar o relacionamento entre as amostras estudadas e outras espécies filogeneticamente próximas a *T. sordida*. Amostras de *T. sordida* grupo 1 e grupo 2 (Santa Cruz, Bolívia) também foram adicionadas às análises a fim de verificar o relacionamento entre os espécimes deste estudo e populações de *T. sordida* da Bolívia. Essas sequências foram obtidas no banco de sequências do laboratório de Epidemiologia e Sistemática Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, com exceção das sequências de *T. garciabesi* que foram geradas neste estudo. Uma sequência do gene *cyt b* de *T. vitticeps*, obtida do banco de dados do GenBank (código de acesso KF826896), foi utilizada como grupo externo.

A árvore filogenética foi construída seguindo o método de reconstrução de topologia de *Neighbor-Joining* (NJ; Saitou & Nei, 1987), escolhido por ser esse um algoritmo capaz de gerar árvores de maneira rápida e eficiente (Saitou & Nei, 1987; Nei & Kumar, 2000). A matriz de distância utilizada foi a de Kimura 2-parâmetros (K2-p; Kimura, 1980), que atribui pesos distintos às taxas de transição e transversão. A confiabilidade da árvore filogenética construída foi testada com 1000 replicações de *bootstrap*.

O método de Máxima Verossimilhança (ML; Felsenstein, 1973) também foi utilizado por ser eficiente na reconstrução de filogenias (Kuhner & Felsenstein, 1994; Huelsenbeck, 1995). Esse método calcula a probabilidade, assumindo um dado modelo evolutivo, de uma determinada topologia (e comprimento dos ramos) representar a melhor estimativa da história evolutiva das sequências de DNA analisadas (i.e. A árvore ML é aquela que tem a topológica de maior valor de verossimilhança). O modelo evolutivo usado foi o de Hasegawa-Kishino-Yano (HKY; Hasegawa *et al.*, 1985) que foi escolhido utilizando o programa jModelTest 2.1.4 (Posada, 2008) com base no critério de informação Bayesiano (BIC – *Bayesian Information Criterion*) (Schwarz, 1978). Esse modelo atribui pesos distintos às taxas de transição e transversão e permite que as bases nitrogenadas tenham frequências diferentes na sequência analisada. A confiabilidade da árvore filogenética construída foi testada com 1000 replicações de *bootstrap*.

A genealogia dos haplótipos foi representada por uma rede construída com o programa *Network* v 4.6.1.2 (*Fluxus Technology Ltd.* 2004-2014) utilizando o algoritmo de *Median-Joining* (Bandelt *et al.*, 1999). Esse algoritmo permite a análise de dados multiestado (como é o caso de sequências de DNA) e tem como premissa a ausência de recombinação e de que sítios ambíguos não são frequentes. A genealogia é construída a partir da identificação de grupos de haplótipos correlacionados baseado na distância entre as sequências e no parâmetro epsilon (ϵ), que é a medida ponderada da distância genética, formando uma rede com base no critério de parcimônia (Bandelt *et al.*, 1999). Não foram dados valores diferentes para as transições e transversões.

4.5. Genética de populações

As diversidades haplotípica (H_d) (Nei, 1987) e nucleotídica (π) (Nei & Li, 1979), a análise molecular de variância (AMOVA), os níveis de estruturação populacional (F_{ST}) (Weir & Cockerham, 1984), e os testes de neutralidade de Tajima (D) (Tajima, 1989) e

Fu (F_S) (Fu, 1997) e de expansão populacional foram calculados para o estudo de genética de populações, conforme explicitado nos tópicos subsequentes.

4.5.1. Análise de polimorfismo das populações

A variabilidade populacional de *T. sordida* foi estimada através do cálculo das diversidades haplotípicas (H_d) (Nei, 1987) e nucleotídicas (π) (Nei & Li, 1979) utilizando o programa *Arlequin* v.3.5.1.2 (Excoffier *et al.* 2005).

4.5.2. Análise molecular de variância

A estimativa da divergência genética entre as “subpopulações” (definidas neste estudo como o conjunto de indivíduos coletados em uma mesma localidade) foi realizada a partir da análise molecular de variância (AMOVA) e da análise espacial molecular de variância (SAMOVA) utilizando-se o programa SAMOVA 1.0 (Dupanloup *et al.*, 2002). Cada conjunto de subpopulações que foram agrupadas a partir da análise de variância foi denominado “população”. Para a formação dos agrupamentos são utilizados os percentuais de divergência genética entre os indivíduos de diferentes subpopulações e suas coordenadas geográficas. Para a escolha do melhor agrupamento, foi considerado o pressuposto de que a variação genética entre diferentes populações deve ser maior que do que dentro de uma mesma população em razão da ocorrência de fluxo gênico entre espécimes contidos nas subpopulações. Foram testados diferentes agrupamentos (de 2 a 9 populações) e os índices de variância Φ_{SC} , Φ_{ST} e Φ_{CT} foram analisados. Esses índices estimam a divergência genética entre os indivíduos contidos em uma subpopulação (Φ_{SC}) entre as subpopulações contidas em uma população (Φ_{ST}) e entre as subpopulações contidas em populações distintas (Φ_{CT}).

4.5.3. Níveis de estruturação populacional (F_{st})

As populações agrupadas por SAMOVA foram comparadas a partir de estimativas de estruturação populacional, utilizando os valores estatísticos de F_{st} obtidos nas comparações par-a-par entre as sequências (Weir & Cockerham, 1984), no programa *Arlequin* v.3.5.1.2 (Excoffier *et al.*, 2005). Por se tratar de uma análise de comparações múltiplas, o nível de significância alfa ($\alpha= 0,05$) foi corrigido pelo procedimento de Bonferroni (Rice, 1989).

4.5.4. Testes de neutralidade

Os testes de neutralidade de Tajima e F_u foram calculados no programa *Arlequin* v.3.5.1.2 (Excoffier *et al.*, 2005) a fim de verificar se as populações evoluem de acordo com a teoria neutra de evolução molecular.

O teste D de Tajima se baseia na relação entre o número médio de diferenças par a par (θ_π) e o número observado de sítios segregantes em relação ao tamanho da amostra (θ_s). De acordo com a teoria neutra de evolução molecular, a diferença entre θ_π e θ_s deve ser igual a zero (Tajima, 1989). Caso a diferença entre esses valores seja significativamente positiva ($\theta_\pi > \theta_s$), esse resultado pode indicar a ocorrência de seleção balanceadora (na qual os genótipos heterozigotos são favorecidos) ou seleção diversificadora (na qual os genótipos que contêm os alelos menos frequentes são favorecidos). Se a diferença entre os parâmetros for significativamente negativa ($\theta_\pi < \theta_s$), o resultado pode sugerir expansão populacional ou diminuição de mutações levemente deletérias na população, consequência de seleção purificadora.

O teste de neutralidade de F_u é calculado pela probabilidade de observar uma amostra aleatória neutra com um número de alelos semelhantes ou menor do que o valor observado, dado o número de diferenças par-a-par (F_u , 1997). Esse teste foi utilizado por ser mais sensível na detecção de expansão populacional súbita.

4.5.5. Expansão populacional

Foram realizadas análises de *Mismatch distribution* utilizando o programa *Arlequin* v.3.5.1.2 (Excoffier *et al.*, 2005) para verificar se as populações estudadas sofreram expansões demográfica e geográfica. Somente as populações que apresentaram valores significativamente negativos em ambos os testes de neutralidade foram utilizadas. *Mismatch distribution* é a distribuição do número de diferenças entre pares de haplótipos observados. Essa distribuição é multimodal em amostras obtidas de populações em equilíbrio demográfico e é unimodal em populações que passaram recentemente por uma expansão demográfica ou por uma expansão da área de distribuição geográfica (Rogers & Harpending, 1992; Ray *et al.*, 2003). Para testar a hipótese de expansão demográfica, foram estimados três parâmetros: mutacional inicial (θ_0) e final (θ_1), ou seja, antes e depois da expansão, e o tempo estimado em gerações desde a expansão (τ). Para testar a hipótese de expansão geográfica, os parâmetros estimados foram: mutacional ($\theta=\theta_0=\theta_1$), τ e o valor absoluto de migrantes (M). A significância da distribuição *mismatch* foi calculada pela soma dos quadrados dos desvios entre os valores observados e esperados e pelo índice de irregularidade da distribuição observada (r). Foi utilizado o nível de significância de 5% em 2.000 replicações de *bootstrap*.

5. Resultados

5.1. Identificação morfológica das amostras e edição de sequências

Foram analisados um total de 94 espécimes identificados morfológicamente de acordo com a chave proposta por Lent & Wygodzinsky (1979), 90 foram identificados como pertencentes à espécie *T. sordida* e quatro à espécie *T. garciabesi*. A discriminação morfológica entre *T. sordida* e *T. garciabesi* é realizada, principalmente, através do tamanho da região anteocular e dos artículos do rostro, tendo como referência a distância entre o bordo anterior dos olhos e os tubérculos anteníferos, além do tamanho e ornamentação do pronoto e do escutelo (*T. garciabesi* possui proporções menores destas estruturas em relação a *T. sordida*) (Figura 3).

Ao término da extração do DNA, amplificação do gene *cyt b* e sequenciamento, foi possível analisar 93 espécimes (Tabela 3). Após a exclusão dos iniciadores e edição das sequências obtidas, foi gerado um alinhamento de 505pb. Não foi possível realizar as análises com o fragmento completo de 510pb, pois as porções inicial 5' e final 3' dos cromatogramas foram excluídas devido à baixa qualidade do sequenciamento nestas regiões (picos com ruído e sobrepostos).

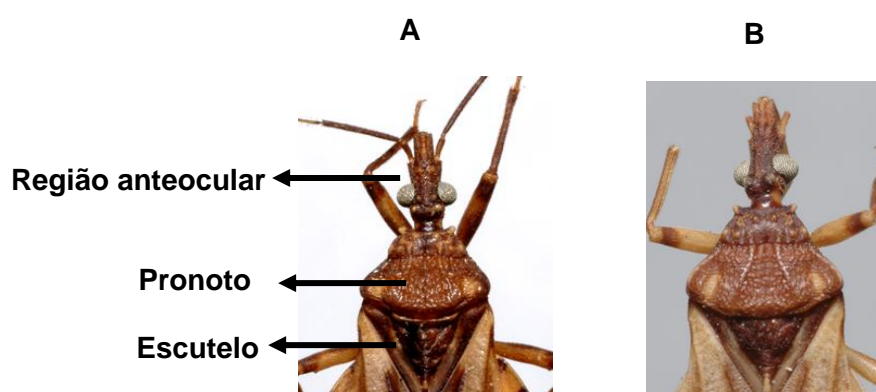


Figura 3. Morfologia externa da cabeça e tórax de *T. sordida* (A) e *T. garciabesi* (B). Vista dorsal. As setas indicam as estruturas morfológicas externas utilizadas para a discriminação entre as duas espécies.

Tabela 3. Número de amostras sequenciadas de *T. sordida* e *T. garciabesi* por localidade.

	Localidade (Código)	Número de sequências
<i>T. sordida</i>	MTC	9
	MTP	9
	GOO	8
	GOI	9
	MSA	9
	MSR	9
	PIS	9
	MGL	9
	BAI	9
	ARC	9
	<i>T. garciabesi</i>	GAR
Total	-	93

5.2. Filogenia de *T. sordida*

A topologia da árvore filogenética revelou que as sequências do gene *cyt b* das amostras de *T. sordida* analisadas formam um clado monofilético que inclui a sequência referência de *T. sordida*. Deste modo, foi possível inferir que os espécimes desse estudo pertencem a essa espécie (Figura 4). Entretanto, duas amostras coletadas em Rochedo em Mato Grosso do Sul identificadas como MSR01 e MSR13 apresentaram alta divergência genética em comparação às sequências dos demais espécimes analisados, incluindo os coletados na mesma localidade (de 3,3 a 4,1%) (Apêndice 1). Por essa razão, tais amostras foram retiradas das análises de genética de populações.

Para verificar a relação filogenética entre os espécimes de *T. sordida* do presente estudo e *T. sordida* dos grupos 1 e 2, *T. garciabesi*, *T. guasayana* (subcomplexo *Triatoma sordida*) e *T. matogrossensis* (subcomplexo *Triatoma matogrossensis*), árvores filogenéticas foram construídas através dos métodos de NJ e ML utilizando os modelos evolutivos de Kimura 2-*p* e HKY, respectivamente (Figura 5). Os dois métodos de reconstrução geraram árvores com topologias iguais (i.e. mesmo relacionamento entre as espécies).

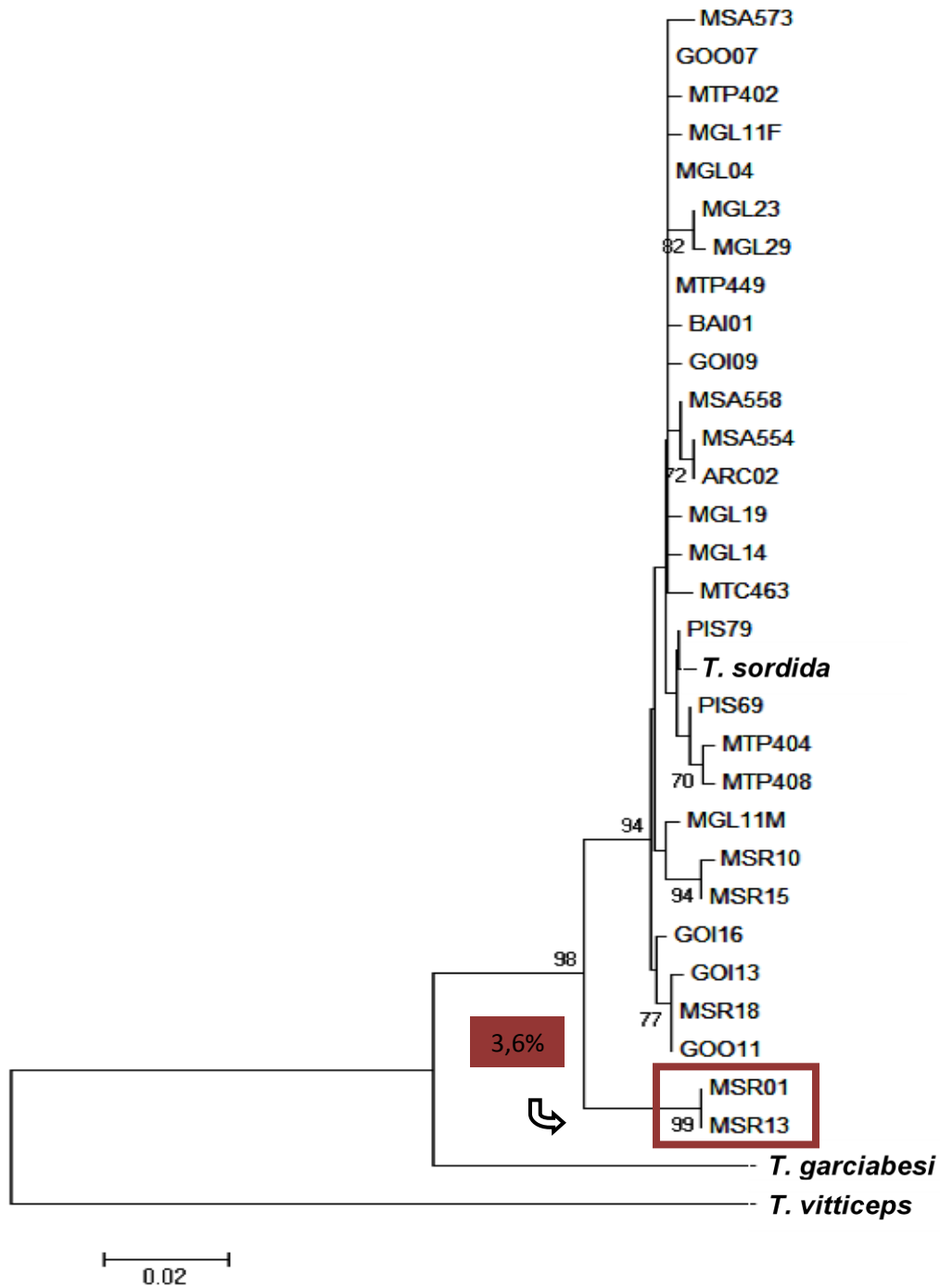


Figura 4. Árvore filogenética de *Neighbor-Joining* construída a partir do fragmento de 505pb do gene *cyt b*, com base na matriz de distância K2-p dos haplótipos encontrados em cada localidade. A confiança dos agrupamentos foi testada por *bootstrap* e somente valores acima de 70 são mostrados. Devido ao estreito grau de parentesco entre as subpopulações não foi possível inferir as relações evolutivas entre elas, entretanto, observa-se que as amostras MSR01 e MSR13 são geneticamente divergentes. O retângulo vermelho mostra a divergência genética média das duas amostras em relação às demais sequências do estudo. A amostra identificada como *T. sordida* foi utilizada como sequência referência para *T. sordida*.

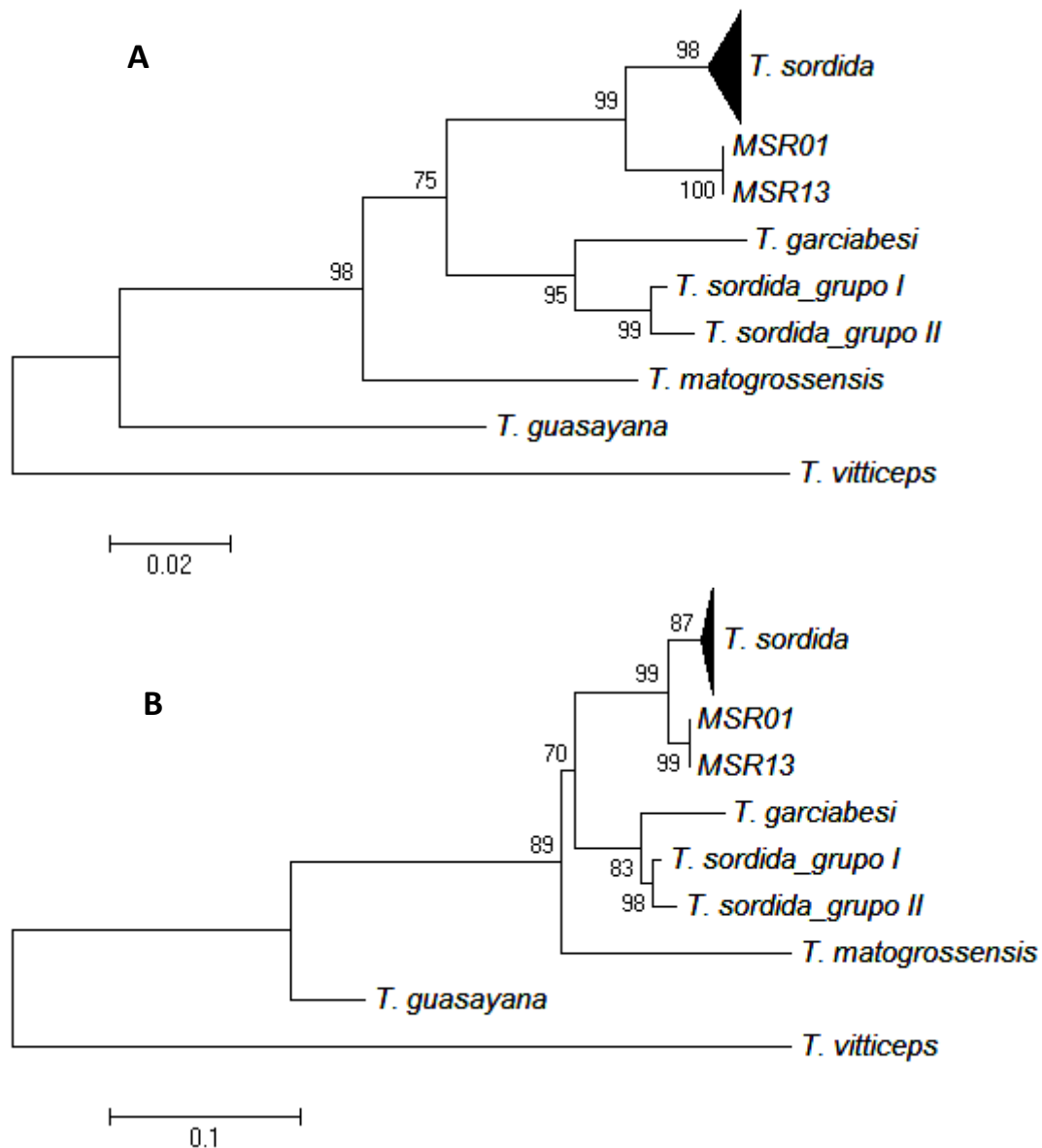
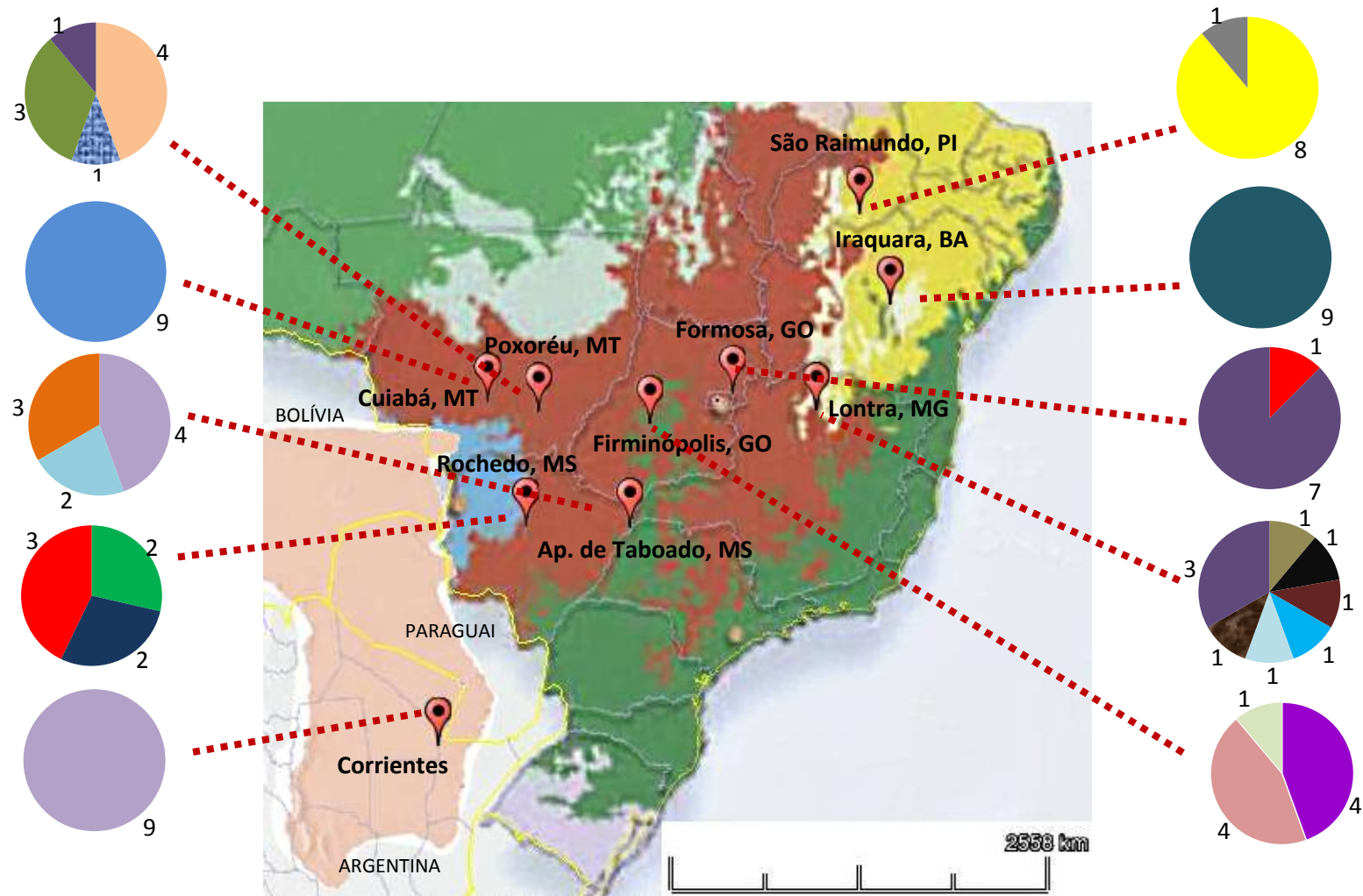


Figura 5. Árvores filogenéticas de Neighbor-Joining (A) e Máxima verossimilhança (B) construídas a partir do fragmento de 505pb do gene *cyt b*, com base na matriz de distância K2-p e HKY, respectivamente, contendo as amostras analisadas e outras espécies relacionadas à *T. sordida*. A confiança dos agrupamentos foi testada por *bootstrap* e somente valores acima de 70 são mostrados. As árvores filogenéticas de NJ e ML apresentam topologias iguais. Observar-se que *T. sordida* do estudo forma um clado monofilético distinto das demais espécies. A espécie *T. vitticeps* foi utilizada como grupo externo.

5.3. Rede de haplótipos

Foi encontrado um total de 24 haplótipos do gene *cyt b*, entretanto, um (referente às amostras MSR01 e MSR13) não foi considerado nesta análise por apresentar uma alta divergência genética quando comparado aos outros haplótipos. Sendo assim, para a construção da rede de haplótipos, foram utilizadas 87 amostras, representando 23 haplótipos (Figura 6). Uma riqueza de haplótipos exclusivos de cada localidade foi observada, com apenas três (1, 3 e 20) compartilhados entre diferentes localidades.

Observando a genealogia da rede haplotípica foi possível verificar que pelo menos um haplótipo de cada população é originado do haplótipo 1 (Figura 7). Por apresentar maior distribuição geográfica (ocorrendo em Lontra, Formosa e Poxoréu) e ter localização interna na rede, esse haplótipo foi considerado como provável haplótipo ancestral. O tipo de rede observada (“em forma de estrela”) é característico de populações que sofreram expansão demográfica e/ou geográfica repentina.



- | | |
|--------------|--------------|
| Haplótipo 1 | Haplótipo 13 |
| Haplótipo 2 | Haplótipo 14 |
| Haplótipo 3 | Haplótipo 15 |
| Haplótipo 4 | Haplótipo 16 |
| Haplótipo 5 | Haplótipo 17 |
| Haplótipo 6 | Haplótipo 18 |
| Haplótipo 7 | Haplótipo 19 |
| Haplótipo 8 | Haplótipo 20 |
| Haplótipo 9 | Haplótipo 21 |
| Haplótipo 10 | Haplótipo 22 |
| Haplótipo 11 | Haplótipo 23 |
| Haplótipo 12 | |

Figura 6. Gráfico de pizza dos haplótipos presentes em cada localidade amostrada. O haplótipo 1 é compartilhado entre Poxoréu, Formosa e Lontra, o 3 entre Ap. de Taboado e Corrientes e o 20 entre Formosa e Rochedo. Mapa retirado do Google Earth 2014.

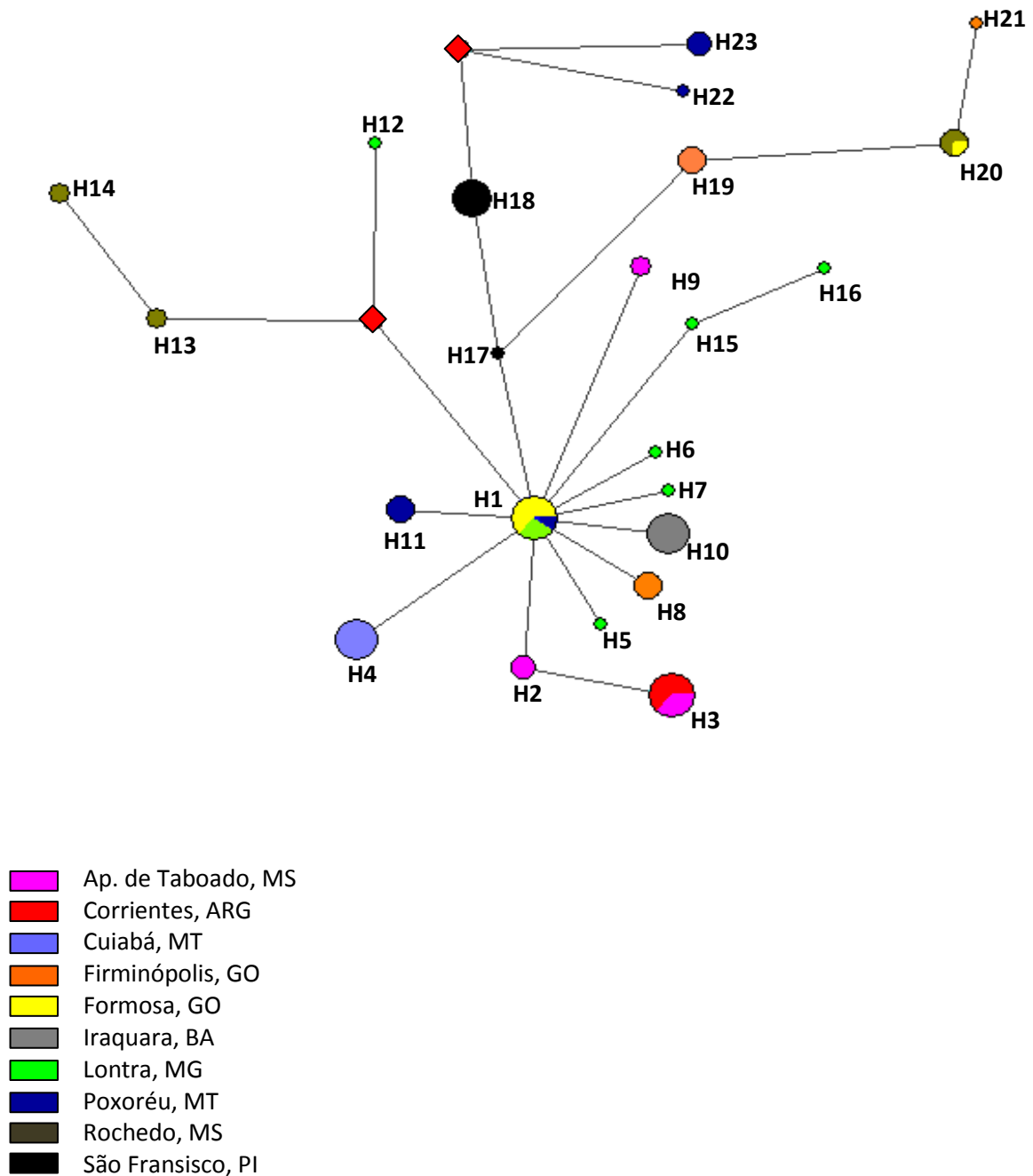


Figura 7. Rede genealógica dos 23 haplótipos amostrados do fragmento do gene *cyt b* de *T. sordida*. Quanto maior o tamanho dos ramos, maior o número de mutações entre as sequências. Cada nó representa um haplótipo e o tamanho do nó é proporcional à quantidade de indivíduos que compartilham aquele haplótipo. O losango vermelho representa haplótipos não amostrados ou extintos. Cada subpopulação foi representada por uma cor. Note que, pelo menos, um haplótipo de cada subpopulação é derivado de um haplótipo central encontrado na população de Poxoréu/Formosa/Lontra.

5.4. Definição das populações de *T. sordida*

A partir do teste de diferentes agrupamentos através do programa SAMOVA (Dupanloup *et al.*, 2002) as subpopulações de *T. sordida* foram agrupadas em sete populações ($\Phi_{ct} = 0,48$; $p < 0,05$) definidas como: 1. Cuiabá; 2. Poxoréu, Formosa e Lontra; 3. Firminópolis; 4. Rochedo; 5. São Raimundo; 6. Iraquara e 7. Aparecida de Taboado e Corriente (Figura 8; Tabela 4). Os resultados obtidos para todos os agrupamentos podem ser observados no Apêndice 1.

Tabela 4. Análise espacial molecular de variância (SAMOVA) e a análise molecular de variância (AMOVA) para o agrupamento de sete populações (Cuiabá; Poxoréu/Formosa/Lontra; Firminópolis; Rochedo; São Raimundo; Iraquara; Aparecida de Taboado/Corriente.

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma dos quadrados dos desvios (SDS)	Componentes de variação	Porcentagem de variação	Índice Φ
Entre populações	6	81,447	0,90155 Va	48,67	$\Phi_{sc} = 0,26^*$
Entre as subpopulações dentro das populações	3	8,704	0,25104 Vb	13,55	$\Phi_{st} = 0,62^*$
Dentro das subpopulações	77	53,895	0,69993 Vc	37,78	$\Phi_{ct} = 0,48^*$

Φ_{sc} : divergência genética entre os indivíduos contidos em uma subpopulação; Φ_{st} : entre as subpopulações contidas em uma população; Φ_{ct} : entre as subpopulações contidas em populações distintas. * $p < 0,05$

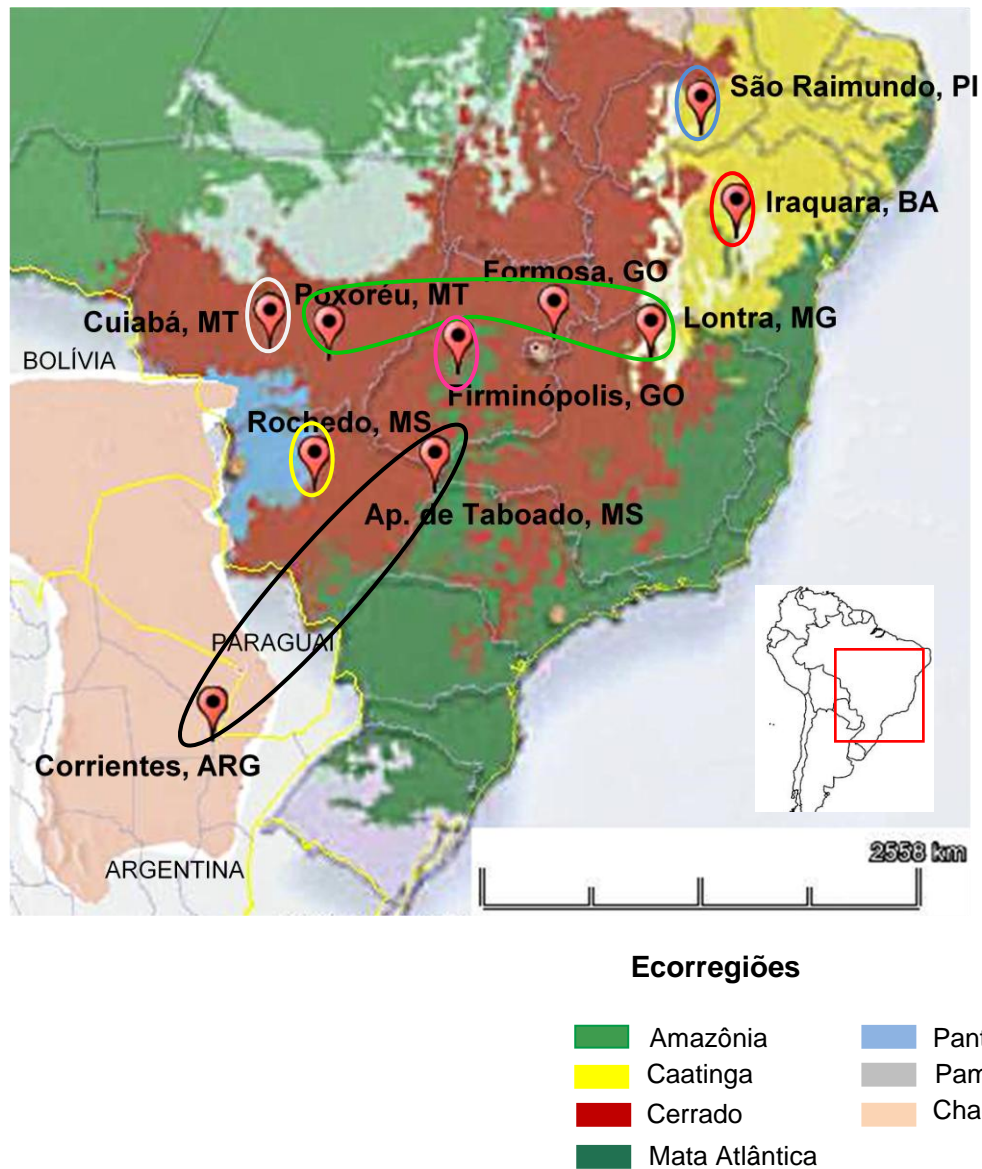


Figura 8. Mapa contendo as sete populações de *T. sordida* definidas por SAMOVA. Cada população é circulado em distintas cores. Mapa adaptado do Google Earth, 2014.

5.5. Variabilidade das sequências do gene *cyt b* e análise da divergência molecular

Após a retirada das sequências do fragmento do gene *cyt b* referentes às amostras MSR01 e MSR13, foram verificados 29 sítios polimórficos dentre os 505pb do fragmento analisado (Figura 9). Foi observado que 72% das substituições foram transições na 3ª base do códon. Cinco substituições não sinônimas ocorreram devido a quatro polimorfismos na 1ª base (adenina↔guanina) e um na 2ª base do códon

(timina↔citocina). A composição total de nucleotídeos das sequências de *cyt b* analisadas foi de aproximadamente 27% T, 28% A, 30% C e 13% G.

A comparação par-a-par das 87 sequências de *T. sordida* revelou uma variação molecular intraespecífica de 0,2 a 1,6% (Apêndice 2) com divergência média entre as populações variando de 0,5 a 1,3% (Tabela 5). As maiores divergências foram encontradas entre as populações de Rochedo e Cuiabá e entre Rochedo e Ap. de Taboado/Corriente (1,3%). Dentre todas as populações, a de Rochedo exibiu as maiores divergências intra (0,9%) e interespecífica (cerca de 1%).

Tabela 5. Divergência molecular média entre as sequências das populações de *T. sordida* comparadas par-a-par, utilizando o modelo de distância K2-p.

Populações	1	2	3	4	5	6	7
1. Poxoréu (MT), Formosa (GO), Lontra (MG)	0,007						
2. Cuiabá (MTC)	0,008	0,000					
3. Rochedo (MSR)	0,012	0,013	0,009				
4. Ap. de Taboado (MS), Corrientes (ARG)	0,007	0,007	0,013	0,004			
5. Firminópolis (GOI)	0,008	0,009	0,011	0,009	0,008		
6. São Raimundo (PIS)	0,006	0,007	0,012	0,006	0,007	0,002	
7. Iraquara (BAI)	0,006	0,006	0,011	0,005	0,007	0,005	0,000

Na diagonal e em vermelho, a divergência molecular média intrapopulacional.

	1111	1111222233	3444444444
	124781223	5689468916	900012346
	1759981470	7311153907	436727656
MTP449	AGATATTTTG	TAGGTTAGAA	TCAGAAGTA
MTP404C...	.G.....	..G.G....
MTP408G....G...	..G.G....
MTP402C....
MTC463C.....	.T.....
MSR10	G.GC...G.A	..A.....
MSR15	..GC...G.A	..A.....
MSR18A.....A.G
MSA573A...T.
MSA558	C.....
GOI09C.
GOI16A.....	..G...A..
GOI13	.A.....	..A.....A.G
PIS69G.G....
PIS79G.....
BAI01C....
MGL14C.
MGL11F	C.....
MGL11M	..G.....	..A...A..
MGL19G.....
MGL23TG....
MGL29	.A.....TG....
ARC02	C..A.....

Figura 9. Sítios variáveis do fragmento do gene *cyt b* observados no alinhamento dos haplótipos das subpopulações de *T. sordida* analisadas. Cada amostra representa um dos 23 haplótipos observados no conjunto de dados. Os números acima de cada nucleotídeo demonstram a posição do sítio na sequência analisada e os pontos mostram que naquele sítio as sequências possuem os mesmos nucleotídeos que a sequência consenso (MTP449).

5.6. Diversidade genética das populações de *T. sordida*

A variabilidade genética das sete populações de *T. sordida* definidas por SAMOVA foi verificada através do cálculo de H_d e π de cada população. Altos valores de diversidade haplotípica foram encontrados nas populações de Poxoréu/Formosa/Lontra ($0,80 \pm 0,06$), Rochedo ($0,79 \pm 0,11$) e Firminópolis ($0,66 \pm 0,10$) e baixa diversidade nucleotídica foi observada em todas as populações (Tabela 6). Por apresentarem um único haplótipo, os valores da diversidade haplotípica e nucleotídica das populações de Cuiabá e Iraquara foram nulos.

Tabela 6. Diversidade haplotípica (Hd) e nucleotídica (π) intrapopulacionais de *T. sordida*.

Populações	N	Hd (DP)	π (DP)	Haplótipos
MTP, GOO, MGL	26	0,80 ($\pm 0,06$)	0,0048 ($\pm 0,0030$)	1, 5, 6, 7, 11, 12, 15, 16, 20, 22 e 23
MTC	9	0,00 ($\pm 0,00$)	0,0000 ($\pm 0,0000$)	4
MSR	7	0,79 ($\pm 0,11$)	0,0077 ($\pm 0,0050$)	13, 14 e 20
MSA, ARG	18	0,46 ($\pm 0,12$)	0,0020 ($\pm 0,0016$)	2, 3 e 9
GOI	9	0,66 ($\pm 0,10$)	0,0052 ($\pm 0,0035$)	8, 19, 21
PIS	9	0,22 ($\pm 0,16$)	0,0004 ($\pm 0,0006$)	17 e 18
BAI	9	0,00 ($\pm 0,00$)	0,0000 ($\pm 0,0000$)	10

Os números apresentados na coluna “Haplótipos” correspondem aos citados anteriormente na Figura 5. **MTP**: Poxoréu, MT, BR; **GOO**: Formosa, GO, BR; **MGL**: Lontra, MG, BR; **MTC**: Cuiabá, MT, BR; **MSR**: Rochedo, MS, BR; **MSA**: Ap. de Taboado, MS, BR; **ARG**: Corrientes, AR; **GOI**: Firminópolis, GO, BR; **PIS**: São Raimundo, PI, BR; **BAI**: Iraquara, BA, BR; **N**: número de sequências analisadas em cada população; **DP**: desvio padrão.

5.7. Estruturação populacional de *T. sordida*

Para verificar a estruturação populacional dos agrupamentos obtidos na análise molecular de variância foi calculado o valor de F_{st} com comparação par-a-par entre as sequências das diferentes populações.

Após a realização do teste de Bonferroni, o nível de significância alfa foi corrigido para 0,002. Todas as comparações par-a-par apresentaram valores de F_{st} altos e significativos, o que indica grande diferenciação genética entre as populações (Hartl & Clark, 2010) (Tabela 7). Os valores de F_{st} encontrados demonstram haver baixo fluxo gênico entre as populações, o que é evidenciado pelo pequeno número de haplótipos compartilhados entre elas.

Tabela 7. Valores de estruturação populacional (F_{st}) a partir de comparações par-a-par entre as sequências das diferentes populações.

Populações	1	2	3	4	5	6	7
1. Poxoréu (MT), Formosa (GO), Lontra (MG)	0,00						
2. Cuiabá (MT)	0,52	0,00					
3. Rochedo (MS)	0,46	0,73	0,00				
4. Ap. de Taboado (MS), Corrientes (ARG)	0,42	0,82	0,68	0,00			
5. Firminópolis (GO)	0,22	0,68	0,34	0,58	0,00		
6. São Raimundo (PI)	0,38	0,97	0,70	0,79	0,55	0,00	
7. Iraquara (BA)	0,35	1,00	0,67	0,76	0,58	0,96	0,00

O índice de significância alfa foi corrigido para 0,002 pelo procedimento de Bonferroni. Todos os valores foram significativos ($p < 0,002$).

5.8. Teste de neutralidade

Para determinar se alguma população de *T. sordida* estudada evoluiu de acordo com a teoria neutra da evolução molecular, foi realizado o teste de neutralidade de Tajima (D). A hipótese nula foi rejeitada para a população de Poxoréu/Formosa/Lontra que apresentou um valor negativo e significativo ($D = -1,60$; $p < 0,05$), indicando que esta população sofreu súbita expansão populacional ou uma diminuição na frequência de mutações levemente deletérias (Tabela 8).

O teste de neutralidade de Fu (F_S) foi utilizado para auxiliar na detecção de expansão populacional súbita. Os valores de F_S também foram negativos ($F_S = -3,77$), entretanto, o valor de p foi limítrofe ($p = 0,02$) (Tabela 8).

Tabela 8. Testes de neutralidade de Tajima (D) e Fu (F_S).

Populações	Tajima (D)	<i>p</i>	Fu (F _S)	<i>p</i>
Poxoréu (MT), Formosa (GO), Lontra (MG)	-1,60	0,04*	-3,77	0,02
Cuiabá (MT) †	0,00	1,00	-	-
Rochedo (MS)	1,89	0,99	2,85	0,92
Ap. de Taboado (MS), Correintes (ARG)	-0,28	0,42	1,23	0,77
Firminópolis (GO)	0,90	0,82	2,51	0,89
São Raimundo (PI)	-1,08	0,10	-0,26	0,15
Iraquara (BA) †	0,00	1,00	-	-

Somente a provável população ancestral Poxoréu/Formosa/Lontra apresentou valores significativamente negativos. Para os testes D e F_S os valores *p*<0,05 e *p*<0,02, respectivamente, são considerados significativos em um intervalo de confiança de 95%. * Valor significativo, † populações não analisadas pelo teste F_S por possuírem somente um haplótipo.

5.9. Mismatch distribution

Somente na população Poxoréu/Formosa/Lontra foram testadas as hipóteses de expansão demográfica e geográfica, pois foi a única que apresentou valor negativo e significativo no teste de neutralidade de Tajima (D) e valores muito negativos no teste de Fu (F_S), apesar do valor-*p* não ter sido significativo. Nessa análise, a hipótese nula testada foi de expansão repentina da população Poxoréu/Formosa/Lontra no bioma do cerrado.

O padrão de *mismatch distribution* das frequências observadas e esperadas para o número de diferenças par-a-par foi multimodal (Figura 10), entretanto, as frequências observadas não diferiram significativamente dos valores esperados para os modelos de expansão demográfica e espacial. Os valores de *p* calculados pela soma do quadrado dos desvios (SSD) e do limite irregular da distribuição (*r*) foram maiores que os 5% do nível de significância para os dois testes de expansão (Tabela 9). Altos valores do índice *r* são comumente verificados em populações em equilíbrio demográfico e valores mais baixos são típicos de populações em expansão (Harpending, 1994). Os baixos valores do limite irregular da distribuição observada (*r*_{obs}) encontrados para as duas hipóteses são indicativos de expansão populacional.

A inconsistência verificada entre o padrão de distribuição da frequência observada e esperada e o valor-*p* calculado pela SSD e pelo limite irregular pode estar

relacionada ao pequeno tamanho amostral da população Poxoréu/Formosa/Lontra (N=26).

Os valores dos padrões mutacionais (θ), das estimativas de expansão (τ) e o valor absoluto de migrantes (M) podem ser observados na Tabela 9.

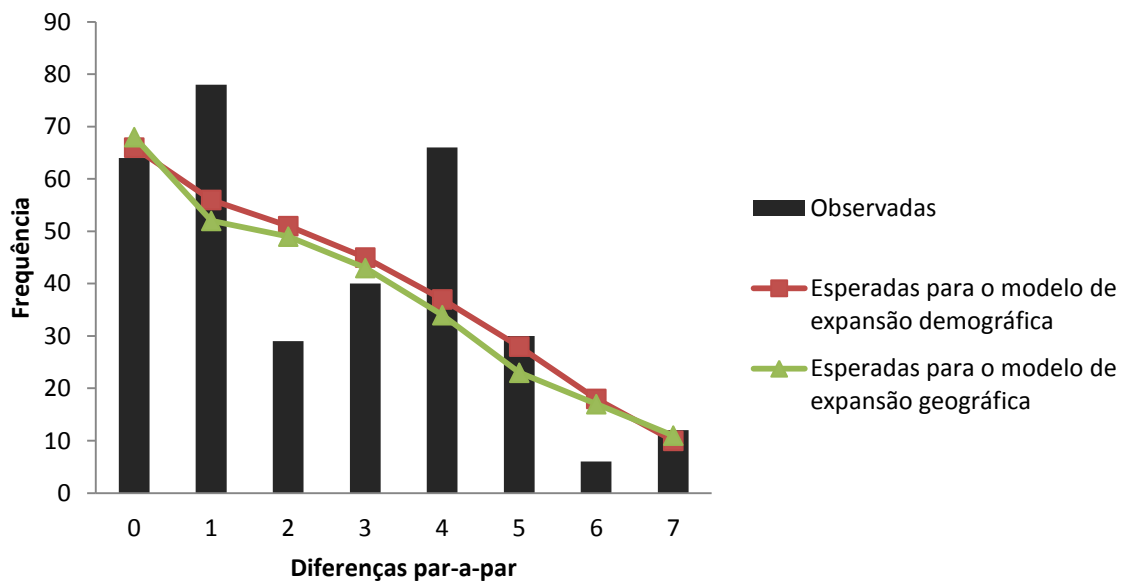


Figura 10. Resultados das análises de *Mismatch distribution*. O eixo X representa o número de diferenças encontradas entre as sequências da população Poxoréu/Formosa/Lontra da espécie *T. sordida* comparadas par-a-par. O eixo Y representa os valores de frequências observadas e esperadas na população.

Tabela 9. Resultados dos índices (τ , θ e M) para os testes das hipóteses de súbitas expansões geográfica e demográfica.

População Poxoréu/Formosa/Lontra			
Expansão geográfica		Expansão demográfica	
τ	1,704	τ	4,346
θ	2,101	θ_0	0,000
M	2,857	θ_1	3,977
SSD	0,021	SSD	0,018
P(SSD_{sim} ≥ SSD_{obs})	0,382	P(SSD_{sim} ≥ SSD_{obs})	0,500
Índice r	0,051	Índice r	0,051
P (r_{sim} ≥ r_{obs})	0,702	P (r_{sim} ≥ r_{obs})	0,630

Para os dois testes, as hipóteses nulas de expansão não foram rejeitadas ($p > 0,05$). **SSD**: soma do quadrado dos desvios; **P_{SSD}**: valor- p de SSD; **P_r**: valor- p do limite irregular; **Índice r**: limite irregular da distribuição observada.

6. Discussão

6.1. Filogenia e o status taxonômico de *T. sordida*

A definição de espécie em triatomíneos, assim como para outros organismos, tende a diferir de acordo com os critérios utilizados para o agrupamento de indivíduos ou espécimes (Mishler & Brandon, 1987). Em estudos filogenéticos, o conceito de espécie que agrupa indivíduos baseado em padrões de ancestralidade e descendência, ou seja, onde uma espécie é representada por um agrupamento monofilético é o mais adequado para a discriminação de diferentes espécies e, por esta razão, foi o conceito adotado nesta dissertação (Donoghue, 1985; Mishler & Theriot, 2000).

A construção da árvore filogenética de *Neighbour-Joining* dos haplótipos do gene mitocondrial *cyt b* gerados possibilitou determinar que as subpopulações de *T. sordida* estudadas formam um grupo monofilético. As distâncias genéticas verificadas não ultrapassaram 2%, com exceção de somente um haplótipo (espécimes MSR01 e MSR13; maiores detalhes abaixo) (Apêndice 2). A partir da adição de sequências do fragmento desse marcador de outras espécies relacionadas a *T. sordida* nas análises filogenéticas, foi possível verificar que as amostras de *T. sordida* analisadas tem como grupo irmão o agrupamento que inclui *T. garciabesi* e *T. sordida* grupos 1 e 2. *T. matogrossensis* divergiu em média 10,5% dos espécimes analisados, sendo filogeneticamente mais relacionada a esses do que *T. guasayana*, em que se verificou divergência interespecífica média de 15,8% (Figura 5).

Diversos estudos têm utilizado marcadores moleculares para a distinção entre as espécies da subfamília Triatominae, entretanto, ainda não há consenso sobre o nível ideal de divergência genética entre sequências que caracterize os taxa atualmente aceitos. Hebert e colaboradores (2003), objetivando facilitar a identificação da biodiversidade, propuseram a utilização de um pequeno fragmento do genoma mitocondrial para a identificação e discriminação de espécies, metodologia que veio a ser denominada DNA *barcoding*. Um fragmento de 650pb do gene mitocondrial COI foi escolhido como *barcode*, sendo proposto que valores de divergência entre sequências acima de 2,7% indicariam a ocorrência de espécies crípticas (Hebert *et al.*, 2003;

2004a). Entretanto, é importante ressaltar que as divergências intra e interespecíficas sugeridas para a “delimitação” de espécies devem ser associadas a informações adicionais, tais como dados morfológicos, ecológicos e comportamentais, para que alguma hipótese taxonômica com base no DNA *barcoding* possa ser proposta (Hebert *et al.*, 2004b; Smith *et al.*, 2005).

Em triatomíneos, o marcador mitocondrial *cyt b* é frequentemente utilizado na resolução de questões taxonômicas e tem sido muito útil na detecção de distintas espécies, sobretudo de espécies crípticas (Monteiro *et al.*, 1999; 2000; Martínez *et al.*, 2006; Pavan & Monteiro, 2007). Para o gênero *Triatoma*, Monteiro e colaboradores (2004), ao analisarem a variabilidade genética entre algumas espécies do complexo *Triatoma brasiliensis*, sugeriram 8% como valor de divergência interespecífica para esse marcador. Altos níveis de divergência também foram verificados por Rúa e colaboradores (2011) entre populações de *T. sanguissuga* (cerca de 5%). Entretanto, as divergências do gene *cyt b* entre algumas espécies próximas do gênero *Rhodnius* parecem ser menores que em *Triatoma*. Monteiro e colaboradores (2003) observaram que entre espécies crípticas de *R. robustus* (denominadas como *R. robustus* I, II, III e IV) os fragmentos da sequência desse marcador variam de 2% a 4,4%. Divergências similares também foram verificadas entre *R. robustus* I e *R. prolixus* (3,3%) e entre *R. brethesi* e *R. stali* (4%) (Monteiro *et al.*, 2003; Pavan, 2009).

Apesar das diferenças no nível de divergência genética desse marcador mitocondrial que caracteriza o relacionamento entre espécies pertencentes a gêneros diferentes (*Triatoma* e *Rhodnius*), existe uma lacuna entre a variação intra e a interespecífica. No gênero *Triatoma*, as divergências intraespecíficas são inferiores a 2% e em *Rhodnius* parecem não ultrapassar 1,5% (Monteiro *et al.*, 2003; Waleckx *et al.*, 2011). A eficiência na identificação de espécies utilizando um determinado marcador depende do nível de separação entre as variações intra e interespecíficas, denominada “*barcoding gap*”. A existência desta lacuna permite determinar o limiar ideal a ser utilizado para a discriminação entre espécies próximas (Meyer & Paulay, 2005).

Neste estudo, a variabilidade genética entre os espécimes de *T. sordida* analisados foi consistente com a divergência intraespecífica observada para o fragmento do gene *cyt b* em outras espécies de *Triatoma*, como 0,2% em *T.*

phylossoma, 1,9% em *T. recurva* e cerca de 2% em *T. infestans* (Villalobos *et al.*, 2011; Pfeiler *et al.*, 2006; Monteiro *et al.*, 1999, respectivamente). Contudo, duas amostras identificadas como MSR01 e MSR13, coletadas na localidade de Rochedo, Mato Grosso do Sul, divergiram de 3,3% a 4,1% das outras amostras analisadas, formando um clado com alto valor de *bootstrap* (Figura 4). Por essa razão foram consideradas como espécimes representativos de uma possível nova espécie ou subespécie ocorrendo em simpatria com *T. sordida* no estado de Mato Grosso do Sul. Essa divergência genética foi similar à divergência observada entre *Triatoma brasiliensis brasiliensis* e *T. b. macromelasoma* (2,7%) (Monteiro *et al.*, 2004). Esses dois “morfortipos” de *T. brasiliensis* foram posteriormente revalidados como subespécies por Costa e colaboradores (2013) baseados em análises morfológicas comparativas de todos os membros do complexo *Triatoma brasiliensis*, além de informações ecológicas, biológicas e isoenzimáticas adicionais.

Deste modo, com provável exceção da população de Rochedo, não foi detectada a ocorrência de espécie críptica nas localidades de *T. sordida* analisadas. Esse resultado corrobora o observado por Monteiro e colaboradores (2009) em populações do Estado de Minas Gerais, Brasil, utilizando marcadores aloenzimáticos. Dos 28 *loci* analisados por esses autores, nenhum apresentou diferenças fixas entre tais populações.

A distância genética que separa as amostras de *T. sordida* deste estudo e *T. sordida* grupos 1 e 2 (8%) foi similar à observada entre *T. sordida* e *T. garciabesi* (9%) (Tabela 10) demonstrando que se tratam de espécies distintas. As análises filogenéticas indicaram a existência de um complexo específico incipiente formando dois grupos distintos que divergem entre si em 8,5%: (1) um representado por *T. sordida* de áreas secas do Brasil e chaco úmido na Argentina e (2) outro formado por *T. sordida* grupos 1 e 2 da província de Santa Cruz, na Bolívia e *T. garciabesi* de La Rioja na Argentina, ambas províncias localizadas na ecorregião do chaco (Figura 11).

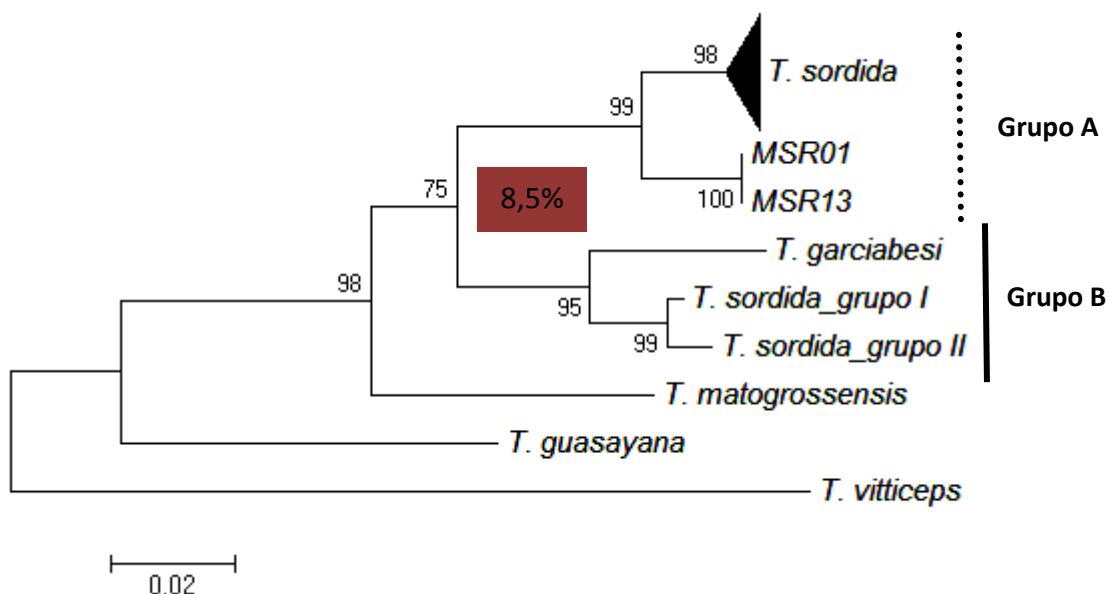


Figura 11. Árvore filogenética observada na figura 5A demonstrando a formação de dois grupos filogeneticamente distintos. É possível verificar dois agrupamentos com distâncias genéticas similares a outros grupos de *Triatoma*. O agrupamento denominado Grupo A representa as amostras de *T. sordida* deste estudo e o Grupo B inclui *T. garciabesi* e *T. sordida* grupos 1 e 2.

Tabela 10. Divergência molecular média entre as sequências de *T. sordida* e espécies relacionadas, utilizando o modelo de distância K2-p.

Espécies	1	2	3	4	5	6
1. <i>T. sordida</i>						
2. <i>T. sordida</i> (MSR01 e MSR13)	0,035					
3. <i>T. sordida</i> grupo 1	0,084	0,082				
4. <i>T. sordida</i> grupo 2	0,089	0,087	0,010			
5. <i>T. guasayana</i>	0,166	0,150	0,134	0,140		
6. <i>T. garciabesi</i>	0,093	0,092	0,042	0,047	0,146	
7. <i>T. matogrossensis</i>	0,109	0,101	0,116	0,124	0,146	0,101

As amostras identificadas morfologicamente como *T. sordida* que divergiram mais que 3% foram consideradas unidades taxonômicas distintas (*T. sordida* grupos 1 e 2, *T. sordida* (MSR01 e MSR13) e *T. sordida*). A espécie identificada como *T. sordida* inclui todos os espécimes analisados neste estudo, com exceção das amostras MSR01 e MSR13.

O relacionamento filogenético verificado entre *T. sordida* e *T. matogrossensis* foi consistente com o observado por Gardim e colaboradores (2014) ao analisarem o mesmo fragmento do gene *cyt b* e outros genes mitocondriais (fragmentos dos genes COI e 16S) para inferir as relações filogenéticas entre espécies do subcomplexo *Triatoma brasiliensis* e outras pertencentes a diferentes gêneros da tribo Triatomini (incluindo espécies do subcomplexo *Triatoma sordida* e *Triatoma matogrossensis*). Esses autores observaram que *T. sordida* foi geneticamente muito próxima a *T. matogrossensis*, formando um clado filogeneticamente relacionado a algumas espécies do subcomplexo *Triatoma matogrossensis*, como *T. vandae*, *T. williami* e *T. guazu*. A proximidade genética entre *T. sordida* e *T. matogrossensis* foi primeiramente demonstrada por García e colaboradores (2001) através das análises dos genes mitocondriais COI, 16S e 12S. Posteriormente, Sainz e colaboradores (2004) verificaram a formação de um agrupamento entre *T. sordida*, *T. garciabesi* e *T. matogrossensis* fortemente suportado nas análises filogenéticas utilizando os genes 12S e 16S.

T. sordida e *T. matogrossensis* são facilmente distinguidas morfologicamente, com marcadas diferenças no tamanho, estrutura da cabeça e do escutelo e na coloração (Figura 12). *T. matogrossensis* tem distribuição restrita à região centro-oeste do Brasil, ocorrendo em simpatria com populações de *T. sordida* nos Estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. Atualmente, poucas informações sobre sua ecologia estão disponíveis na literatura. Segundo Carcavallo e colaboradores (2000), esta espécie é provavelmente associada a ninhos de pássaros e esconderijos de mamíferos. Foi encontrada invadindo áreas peridomiciliares, o que pode indicar uma possível tendência desta espécie para a domiciliação (Noireau *et al.*, 2002).

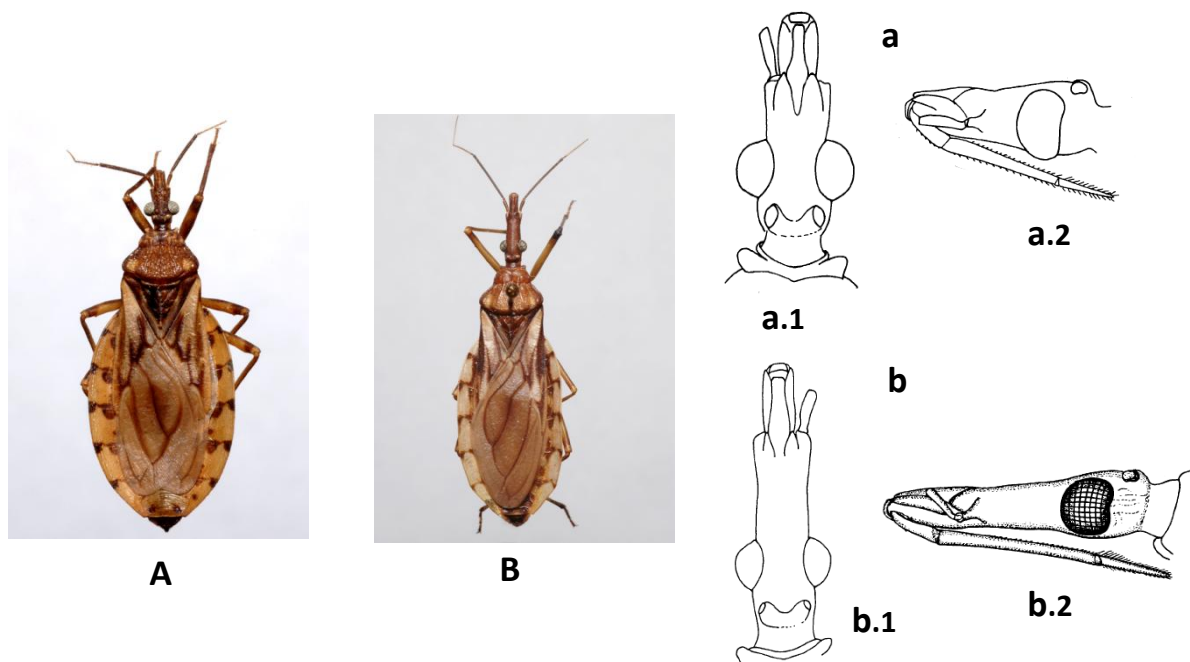


Figura 12. Visão dorsal das espécies *Triatoma sordida* (A) e *Triatoma matogrossensis* (B). a: estrutura da cabeça, visão dorsal (a.1) e lateral (a.2) de *T. sordida*; b: estrutura da cabeça, visão dorsal (b.1) e lateral (b.2) de *T. matogrossensis*. Essas espécies apresentam distintos tamanhos e padrões de coloração, com *T. sordida* medindo 14-20 mm e de coloração clara e *T. matogrossensis* medindo de 24-30 mm e geralmente marrom escuro. Na figura **12.a** e **12.b** é possível visualizar a diferença da estrutura da cabeça entre as espécies. *T. sordida* possui a região ante-ocular 3 vezes mais longa que a pós-ocular, já em *T. matogrossensis* essa região é 5 vezes maior. As imagens **A** e **B** não estão na mesma escala. As imagens **A** e **B** foram obtidas do Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos. Imagens **a** e **b** foram adaptadas de Lent & Wygodzinsky, 1979.

Dentre as espécies analisadas, *T. guasayana* foi a mais basal, divergindo em média 14,7% de *T. sordida* (incluindo as população de *T. sordida* deste estudo e *T. sordida* grupos 1 e 2) e *T. garciabesi* (Tabela 10). Tais resultados corroboram o observado por Garcia e colaboradores (2001) e Almeida e colaboradores (2009), utilizando outros marcadores mitocondriais, como os genes 12S, 16S e COI. Esses autores verificaram que *T. guasayana* é mais próxima a *T. circummaculata*, *T. rubrovaria* e *T. carcavalloi* que a *T. sordida*.

Os resultados observados neste estudo evidenciam que o subcomplexo *Triatoma sordida* atualmente proposto por Schofield & Galvão (2009) não representa

um agrupamento monofilético já que *T. matogrossensis* foi filogeneticamente mais relacionada a algumas espécies desse subcomplexo (*T. sordida* e *T. garciabesi*) do que *T. guasayana*. Em 2002, Hypsa e colaboradores, baseados nas análises das relações filogenéticas entre 57 espécies pertencentes às tribos Rhodniini, Linshcosteini e Triatomini propuseram que *T. sordida* e *T. garciabesi* fossem agrupadas a espécies previamente classificadas por Carcavallo e colaboradores (2000) como pertencentes aos complexos *Triatoma macula* e *matogrossensis*, formando um complexo denominado *T. sordida*. Já *T. guasayana* e *T. patagonica* foram agrupadas às espécies *T. circummaculata*, *T. klugi* e *T. rubrovaria*, formando o complexo denominado *T. circummaculata*.

As similaridades fenotípicas (e não genotípicas) entre *T. sordida* e as outras espécies do subcomplexo podem refletir uma convergência morfológica em razão de adaptações a pressões ecológicas mais do que uma ancestralidade comum entre essas espécies (Dujardin *et al.*, 1999). Em triatomíneos, a ideia de que espécies próximas, do ponto de vista fenotípico, possam ser consequência de convergência morfológica parece ser o caso de espécies pertencentes ao gênero *Panstrongylus*. Essas espécies são distinguidas de outros gêneros, principalmente, através da distância entre a inserção dos tubérculos anteníferos e os olhos, característica esta considerada uma sinapomorfia do grupo. Patterson e colaboradores (2009) afirmaram que as variações no tamanho dos olhos observadas entre esses insetos podem estar relacionadas à adaptação aos seus diferentes habitat. Segundo esses autores, tais variações influenciam na distância da inserção das antenas, o que pode indicar, juntamente com a provável não-monofilia do gênero (Hypsa *et al.*, 2002; Marcilla *et al.*, 2002; Justi *et al.*, 2014), que essa característica diagnóstica seja resultante de convergência adaptativa, ou seja, que represente, na verdade, um carácter homoplásico que teria surgido independentemente em diferentes linhagens.

De modo semelhante, uma possível explicação para a proximidade genética verificada entre *T. sordida* e *T. matogrossensis* seria a ocorrência de divergência morfológica ocasionada por adaptações a diferentes tipos de habitat ecológicos ou diferentes hospedeiros. Esse pode ser o caso de *T. infestans*, *T. platensis* e *T. delpontei*. As duas últimas espécies são morfológica e ecologicamente mais similares, entretanto, as diferenças citogenéticas e moleculares são mais altas entre elas do que entre *T.*

infestans e *T. platensis*. Isso indica que fatores ecológicos são importantes na diferenciação morfológica entre *T. platensis* e *T. infestans* (Usinger *et al.*, 1966; Panzera *et al.*, 1995; Pereira *et al.*, 1996; Bargues *et al.*, 2006).

Em populações de *T. sordida* da Bolívia, Noireau e colaboradores (1998) identificaram, através da análise de isoenzimas, que dois *loci* (*Mdh2* e *Idh2*) não apresentaram nenhum alelo em comum entre espécimes silvestres de *T. sordida* de duas localidades da região do chaco boliviano, representando, deste modo, *loci* diagnósticos entre eles. Esse resultado, associado à distribuição simpátrica desses espécimes, demonstrou isolamento reprodutivo e, conseqüentemente, a ocorrência de duas espécies distintas, segundo o conceito biológico de espécie, que foram denominadas *T. sordida* grupo 1 e grupo 2. Contudo, neste estudo, o status taxonômico desses grupos não pôde ser confirmado, já que a variabilidade genética entre os grupos 1 e 2 foi similar a variação intraespecífica observada entre os espécimes de *T. sordida* analisados (Tabela 10). Uma possível explicação é de que tenha ocorrido introgressão de DNA mitocondrial decorrente de um evento de hibridação entre as duas espécies. Evidências de introgressão têm sido verificada em triatomíneos, como entre *R. robustus* e *R. prolixus* (Fitzpatrick *et al.*, 2008) e entre *T. b. brasiliensis* e *T. b. macromelasoma* (Monteiro *et al.*, 2004), e também em outros insetos hematófagos, como, por exemplo, em dípteros dos gêneros *Lutzomyia* (entre *L. townsendi* e *L. youngi*) e *Anopheles* (*A. sinensis* e *A. kleini*) (Testa *et al.*, 2002; Choochote *et al.*, 2014). Outra possível explicação é a ocorrência de separação recente entre as espécies.

Em *T. sordida*, verificamos que a divergência intraespecífica do fragmento do gene *cyt b* não ultrapassa 2% e que os valores interespecíficos são comumente maiores que 3%. Os espécimes analisados neste estudo foram obtidos a partir de 10 diferentes localidades abrangendo uma considerável extensão geográfica que inclui as regiões nordeste, sul e centro-oeste do Brasil e a região nordeste da Argentina, o que provavelmente possibilitou estimar a variabilidade genética intraespecífica de *T. sordida*.

Os resultados aqui apresentados indicam a necessidade de uma reavaliação da classificação das populações que compõem essa espécie, já que, como observado nas análises filogenéticas, tanto *T. sordida* grupo 1 quanto grupo 2 são geneticamente

distintas de *T. sordida* do Brasil e de parte da Argentina, apresentando valores de distância genética consistentes com o nível de divergência observado entre espécies distintas de *Triatoma*. Isso sugere que *T. sordida* representa, na verdade, um grupo de, pelo menos, três espécies crípticas, com uma espécie ocorrendo no cerrado, caatinga e chaco úmido (e talvez outra ocorrendo em simpatria com essa no estado de Mato Grosso do Sul) e duas distribuídas no chaco seco boliviano. Foi possível determinar também a precisa distribuição geográfica de *T. sordida* nas áreas amostradas, já que as subpopulações analisadas formam um grupo monofilético.

Assim, para uma correta identificação e discriminação de *T. sordida* é fundamental que outros estudos moleculares utilizando marcadores nucleares de um grande número de espécimes abrangendo toda a sua área de distribuição geográfica sejam realizados. Posteriormente, análises complementares, como estudos morfométricos (Dujardin, 2008), poderão ser utilizados para a determinação de características diagnósticas das diferentes linhagens ou grupos, auxiliando na identificação dos taxa que compõem o complexo *T. sordida*.

6.2. Variabilidade populacional

A partir das análises de AMOVA e SAMOVA concluiu-se que as 10 subpopulações amostradas poderiam ser agrupadas em sete populações de *T. sordida*. Essas populações apresentaram altos valores de F_{st} indicando baixo fluxo gênico entre *T. sordida* de diferentes localidades. A estruturação genética das populações de *T. sordida* verificada pode auxiliar na determinação da extensão da área geográfica necessária para realização de um controle eficiente desse vetor nas áreas estudadas.

As sequências de *cyt b* das populações de *T. sordida* apresentaram baixa diversidade nucleotídica (π entre 0,0000 e 0,0077), entretanto, foram encontrados 23 haplótipos, dos quais somente três foram compartilhados entre distintas localidades, sendo um comum às localidades de Poxoréu, Formosa e Lontra, outro a Ap. de Taboado e Corrientes e um compartilhado entre Rochedo e Formosa. Esses resultados evidenciam a presença de muitos haplótipos raros com poucos sítios polimórficos.

O perfil haplotípico das populações de *T. sordida* estudadas pode indicar a ocorrência de expansão populacional súbita e recente ou a ação de seleção purificadora que proporcionaria uma diminuição do número de mutações levemente deletérias. A partir dos testes de neutralidade e das análises de *mismatch distribution* foi possível determinar que a população de Poxoréu/Formosa/Lontra sofreu expansões demográfica e geográfica recentes e súbitas. A rede genealógica corrobora esses resultados por apresentar distribuição dos haplótipos em forma de “estrela”, com o provável haplótipo ancestral ocorrendo somente na população Poxoréu/Formosa/Lontra e dando origem a, pelo menos, um haplótipo de cada população.

A população de *T. sordida* proveniente de Rochedo no Estado de Mato Grosso do Sul apresentou valores altos de divergência genética par-a-par interespecífica em comparação às outras populações do estudo (Tabela 5). Nesta população também foram encontrados dois espécimes que divergiram em média 3,6% das outras amostras analisadas formando um clado com alto valor de *bootstrap* nas análises filogenéticas (Figura 4). Esses resultados podem indicar a ocorrência de um processo recente de especiação nessa população. Contudo, somente nove espécimes desta localidade foram analisados e, por esta razão, outros estudos moleculares utilizando um maior número amostral são necessários para auxiliar no esclarecimento desta questão.

A partir do alinhamento do fragmento de 505pb do gene *cyt b* dos 87 espécimes analisados, verificou-se que a porcentagem de sítios polimórficos das populações de *T. sordida* é de aproximadamente 6% (29 sítios segregantes). Esse resultado foi similar ao observado em outras espécies de *Triatoma*, como em populações silvestres de *T. infestans* da Bolívia (9%) e em populações silvestres e peridomésticas de *T. dimidiata* (10,17%) (Blandón-Naranjo *et al.*, 2010; Waleckx *et al.*, 2011). Baixa composição de conteúdo AT (55%) foi verificada nas sequências analisadas, o que divergiu do observado no gene *cyt b* de outros triatomíneos (em torno de 64%) e do esperado para genes mitocondriais em insetos (Beard *et al.*, 1993; Dotson & Beard, 2001; Martínez *et al.*, 2006). Curiosamente, as sequências analisadas de *T. matogrossensis* e *T. garciabesi* também apresentaram baixa porcentagem desses nucleotídeos (59,8 e 58,2%, respectivamente), enquanto que a sequência de *T.*

guasayana apresentou riqueza de A e T similar à verificada em outros triatomíneos (61,8%).

6.3. Origem e dispersão de *T. sordida*

A distribuição geográfica de *T. sordida* abrange grande parte das florestas e formações tropicais de clima sazonal seco com vegetação aberta que inclui as províncias biogeográficas do cerrado, caatinga e chaco (Carvalho & Almeida, 2011). Neste estudo, dentre todas as subpopulações analisadas, cinco foram coletadas no cerrado, duas na caatinga e uma no chaco, totalizando 72 espécimes coletados nessas ecorregiões. Entretanto, duas subpopulações dos Estados de Goiás e Mato Grosso do Sul foram coletadas em áreas de Florestas do Alto Paraná. Essa floresta faz parte do complexo de ecorregiões terrestres do bioma Mata Atlântica e estende-se do oeste do Brasil até leste do Paraguai, abrangendo também a província de Misiones, na Argentina (Di Bitetti *et al.*, 2003). O crescente processo de fragmentação e degradação da Mata Atlântica do Alto Paraná, causada principalmente pela expansão da agricultura, pode ter favorecido a dispersão de *T. sordida* para essa região por propiciar o aumento do número de ecótopos ideais para essa espécie, como árvores secas ou mortas (Di Bitetti *et al.*, 2003; Diotaiuti *et al.*, 1993).

Forattini e colaboradores (1971; 1980), baseados na distribuição geográfica de *T. sordida* e na ocorrência desse inseto em áreas de feições paisagísticas que correspondem, predominantemente, às encontradas no domínio do cerrado, propuseram que o centro de endemismo de *T. sordida* estaria situado em áreas de formações abertas desta ecorregião. Segundo esses autores, a formação de novos espaços abertos, caracterizados por apresentar clima seco e temperaturas elevadas, teria estimulado a dispersão de *T. sordida*. O processo de destruição das áreas de ocorrências desta espécie, causada pela intensificação das atividades humanas, foi também associada como fator dispersivo, já que, quando seu habitat natural é descaracterizado e suas ofertas alimentares são reduzidas, *T. sordida* pode invadir áreas domiciliares quando essas oferecem condições apropriadas a sua sobrevivência (Diotaiuti *et al.*, 1993; Forattini *et al.*, 1979) (Figura 13).

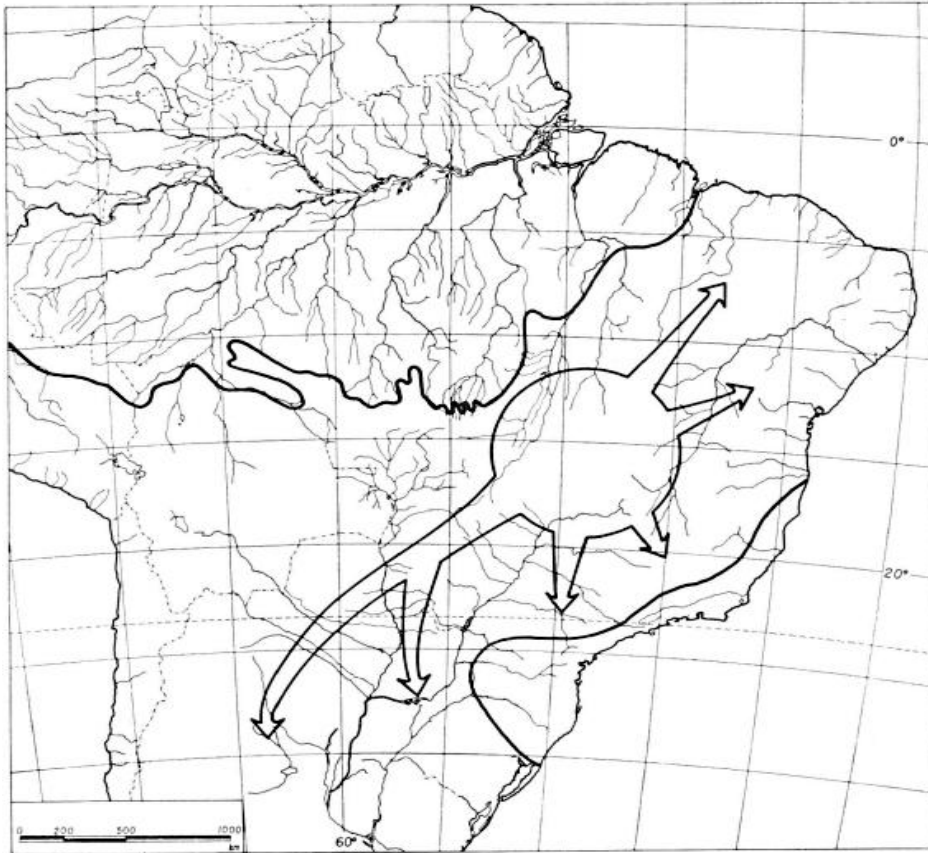


Figura 13. Mapa mostrando o possível centro de endemismo de *T. sordida* e sua dispersão. As linhas indicam os limites das potenciais áreas de domiciliação desse vetor no Brasil. Adaptado de Forattini *et al.*, 1980.

Entretanto, Carcavallo e colaboradores (2000) propuseram que *T. sordida* tenha se originado na região do chaco, caracterizada por floresta subtropical seca que ocupa o leste da Bolívia, o centro-oeste do Paraguai e norte da Argentina. Esta hipótese foi proposta com base em dois argumentos: (1) na provável ocorrência de espécie críptica no chaco boliviano, com *T. sordida* grupo 2 apresentando restrita distribuição geográfica (chaco) e alta variabilidade genética em comparação as populações de *T. sordida* grupo 1 da Bolívia e populações do Brasil (Noireau *et al.*, 1998; 1999; 1999a; Monteiro *et al.*, 2009); (2) por ser uma região onde as quatro espécies pertencentes ao subcomplexo *Triatoma sordida* (*T. sordida*, *T. garciabesi*, *T. guasayana* e *T. patagonica*) são simpátricas.

A provável expansão populacional súbita verificada na população de Poxoréu/Formosa/Lontra suporta a hipótese sugerida por Forattini e colaboradores (1980) de origem e dispersão de *T. sordida* na ecorregião do cerrado. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que as populações de *T. sordida* tenham se originado na região centro-oeste do Brasil abrangendo os Estados de Mato Grosso do Sul, Goiás e Minas Gerais, que apresentam, predominantemente, vegetação de formação típica do cerrado. A subsequente dispersão desta espécie para o nordeste brasileiro e para a região sul da América do Sul pode ter sido decorrente de transporte passivo através de seus hospedeiros. O fato de ninfas de primeiro estágio de *T. sordida* terem sido encontradas em ninhos de *Passer domesticus* (pardais) de áreas domiciliares no Brasil e em ninhos de pássaros silvestres, como por exemplo, *Anumbius annumbi* (cochicho) e *Pseudoseisura lophotes* (coperete), pode indicar uma possível migração passiva dessa espécie através de ninfas entre penas de pássaros, desde que o hospedeiro tenha hábitos migratórios que possam explicar a sua atual distribuição (Forattini *et al.*, 1971; Lent & Wygodzinsky, 1979). Outra possibilidade é o transporte ativo através do voo, visto que *T. sordida* é capaz de voar longas distâncias e apresenta maior capacidade de dispersão em comparação a *T. infestans* (Schofield *et al.*, 1991; McEwen & Lehane, 1993). Além disso, Noireau & Dujardin (2001) verificaram que populações silvestres de *T. sordida* apresentaram capacidade de dispersão através do voo sob condições de clima seco e quente, o que pode indicar que esse tenha sido um dos principais meios de dispersão dessa espécie, já que *T. sordida* ocorre, principalmente, em regiões áridas.

Deste modo, a progressiva dispersão de *T. sordida* associada a sua capacidade de adaptar-se a uma variedade de ecótopos, tanto naturais quanto artificiais, e de alimentar-se de diferentes tipos de hospedeiros podem ter contribuído para a atual distribuição desta espécie na América do Sul, com predominante ocorrência no Brasil (Barretto, 1967; Diotaiuti *et al.*, 1993; Gurgel-Gonçalves *et al.*, 2011).

7. Conclusões

- As amostras de *T. sordida* analisadas formaram um grupo monofilético, com divergências genéticas menores que 2%, indicando que as populações de *T. sordida* do Brasil e de parte da Argentina são coespecíficas. Contudo, na localidade de Rochedo em Mato Grosso do Sul, duas amostras (identificadas como MSR01 e MSR13) divergiram em média 3,6% dos outros espécimes analisados, o que pode indicar a ocorrência de um processo recente de especiação nesta localidade.
- Segundo os dados observados neste estudo, *T. sordida* representa um grupo de, no mínimo, três espécies crípticas. Dessas espécies, uma ocorre no cerrado, caatinga e chaco úmido e outras duas estão distribuídas no chaco seco boliviano (*T. sordida* grupos 1 e 2).
- A estrutura populacional estimada por F_{ST} foi alta, demonstrando a ocorrência de baixo fluxo gênico entre as populações de *T. sordida* analisadas.
- A presença de muitos haplótipos raros com poucos sítios polimórficos, o valor negativo e significativo verificado no teste de neutralidade de Tajima, o valor negativo obtido no teste de Fu e a obtenção de uma genealogia em forma de estrela, indicam que a população de Poxoréu/Formosa/Lontra sofreu uma recente e súbita expansão populacional. Deste modo, é possível que as populações de *T. sordida* tenham se originado na região centro-sul do Brasil e se expandido ou dispersado através de transporte passivo (através de seus hospedeiros) ou transporte ativo (através do voo). A ampla distribuição de *T. sordida* pode estar associada à capacidade dessa espécie de se adaptar a diferentes ecótopos e fontes de alimento.

8. Referências

- Abad-Franch F., Pavan M. G., Jaramillo-O N., Palomeque F. S., Dale C., & Monteiro F. A. (2013). *Rhodnius barretti*, a new species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) from western Amazonia. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 108: 92–99.
- Actis A. S., Traversa O. C., & Carcavallo R. U. (1964). Taxonomic studies on *Triatoma* by electrophoresis. Proceedings of First International Congress Parasitol, Editora Roma, 1010–1011.
- Almeida P. S., Júnior W. C., Obara M. T., Santos H. R., Maria J., & Faccenda O. (2008). Levantamento da fauna de Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) em ambiente domiciliar e infecção natural por Trypanosomatidae no Estado de Mato Grosso do Sul. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 41: 374–380.
- Almeida C. E., Marcet P. L., Gumiel M., Takiya D. M., Cardozo-de-Almeida M., Pacheco R. S, et al. (2009). Phylogenetic and phenotypic relationships among *Triatoma carcavalloei* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) and related species collected in domiciles in Rio Grande do Sul State, Brazil. *Journal of Vector Ecology : Journal of the Society for Vector Ecology*, 34: 164–173.
- Bandelt H. J., Forster P., & Röhl A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 37–48.
- Bar M. E., & Wisnivesky-Colli C. (2001). *Triatoma sordida* Stål 1859 (Hemiptera, Reduviidae: Triatominae) in palms of northeastern Argentina. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 96: 895–899.
- Bargues M. D., Klisiowicz D. R., Panzera F., Noireau F., Marcilla A., Perez R., et al. (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: 46–62.
- Barretto M. P. (1967). Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Tripanosoma cruzi*. XVII. Contribuição para o estudo dos focos naturais da Riptonossomose Americana, com especial referência à região nordeste do Estado de São paulo, Brasil. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 1: 22–36.
- Beard C. B., Hamm D. M., & Collins F. H. (1993). The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae*: DNA sequence, genome organization, and comparisons with mitochondrial sequences of other insects. *Insect Molecular Biology*, 2: 103–124.
- Blandón-Naranjo M., Zuriaga M. A., Azofeifa G., Zeledón R., & Bargues M. D. (2010). Molecular evidence of intraspecific variability in different habitat-related populations of *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) from Costa Rica. *Parasitology Research*, 106: 895–905.
- Calderón-Fernández G. M., & Juárez M. P. (2013). The cuticular hydrocarbons of the *Triatoma sordida* species subcomplex (Hemiptera: Reduviidae). *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 108: 778–784.

- Carcavallo R. U., Cichero J. A., Martínez A., Prosen A. F., & Ronderos R. (1967). Uma nueva especie del gênero *Triatoma* Laporte (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Jorn. Entomoepidemiol. Argentinas*, 2: 43-48.
- Carcavallo R. U., Jurberg J., Lent H., Noireau F., & Galvão C (2000). Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): Proposals for taxonomic arrangements. *Entomología y Vectores*, 7: 1-99.
- Carvalho C. J. B., & Almeida E. A. B. (2011). Biogeografica da América do Sul: Padrões & Processos.. Editora *Roca*, São Paulo, 306p.
- Cecere M. C., Gürtler R. E., Canale D., Chuit R., & Cohen J. E. (1997). The role of the peridomiliary area in the elimination of *Triatoma infestans* from rural Argentine communities. *Revista Panamericana de Salud Pública/ Pan American Journal of Public Health*, 1: 273–279.
- Cecere M. C., Vázquez-prokopec G. M., Ceballos L. A., Gurevitz J. M., Zárate, J. E., Zaidenberg M., *et al.* (2006). Comparative Trial of Effectiveness of Pyrethroid Insecticides Against Peridomestic Populations of *Triatoma infestans* in Northwestern Argentina. *Journal of Medical Entomology*, 43: 902–909.
- Choochote W., Min G. S., Intapan P. M., Tantrawatpan C., Saeung A., Lulitanond V. (2014). Evidence to support natural hybridization between *Anopheles sinensis* and *Anopheles kleini* (Diptera: Culicidae): possibly a significant mechanism for gene introgression in sympatric populations. *Parasites & Vectors*, 7: 1–13.
- Cortez M. R., Emperaire L., Piccinali R. V., Gürtler R. E., Torrico F., Jansen A. M., *et al.* (2007). Sylvatic *Triatoma infestans* (Reduviidae, Triatominae) in the Andean valleys of Bolivia. *Acta Tropica*, 102: 47–54.
- Costa J., Almeida J. R., Britto C., Marchon-silva V., & Pacheco R. S. (1998). Ecotopes, natural infection and trophic resources of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 93: 7–13.
- 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.
- Coura J. R., & Borges-Pereira J. (2010). Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Tropica*, 115: 5–13.
- De Paula A. S., Diotaiuti L., & Schofield C. J. (2005). Testing the sister-group relationship of the Rhodniini and Triatomini (Insecta: Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 35: 712–718.
- Di Bitetti M. S., Placci G., Dietz L. A. (2003). Visão de biodiversidade da Ecorregião Florestas do Alto Paraná - Bioma Mata Atlântica -. *World Wildlife Fund*, 155p.
- Dias J. C. P. (1988). Controle de Vetores da Doença de Chagas no Brasil e Riscos da Reinvasão Domiciliar por Vetores Secundários. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 83: 387 – 391.

- Dias J. C. P. (2007). Southern Cone Initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of transfusional Chagas disease. Historical aspects, present situation, and perspectives. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 102: 11–18.
- Dias J. C. P. (2009). Elimination of Chagas disease transmission: perspectives. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104: 1–45.
- Diotaiuti L., Loiola C. F., Falcão P. L., & Dias J. C. P. (1993). The Ecology of *Triatoma sordida* in Natural Environments in Two Different Regions of the State of Minas Gerais, Brazil. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 35: 237–245.
- Diotaiuti L., Vaz B., Azeredo D. M., Cristina S., Busek U., & Fernandes J. (1998). Controle do *Triatoma sordida* no peridomicílio rural do município de Porteirinha, Minas Gerais, Brasil, 3: 21–25.
- Diotaiuti L., Filho O. F. F., Carneiro F. C. F., Dias J. C. P., Pires H. H. R., & Schofield C. J. (2000). Aspectos operacionais do controle do *Triatoma brasiliensis*. *Cad. Saúde Pública*, 16: 61–67.
- Donoghue M. J. A Critique of the Biological Species Concept and Recommendations for a Phylogenetic Alternative. *The Bryologist*, 3: 172–181.
- Dorn P. L., Calderon C., Melgar S., Moguel B., Solorzano E., Dumonteil E., *et al.* (2009). Two distinct *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) taxa are found in sympatry in Guatemala and Mexico. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3: e393.
- Dotson E. M., & Beard C. B. (2001). Sequence and organization of the mitochondrial genome of the Chagas disease vector, *Triatoma dimidiata*. *Insect Molecular Biology*, 10: 205–215.
- Dujardin J. P., Panzera P., & Schofield C. J. (1999). Triatominae as a model of morphological plasticity under ecological pressure. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 94: 223–228.
- Dujardin J. P. (2008). Morphometrics applied to medical entomology. *Infection, Genetics and Evolution*, 8: 875–890.
- Dupanloup I., Schneider S., & Excoffier L. (2002). A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, 11: 2571–2581.
- Excoffier L., Laval G., & Schneider S. (2005). Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47–50.
- Felsenstein J. (1973). Maximum likelihood and minimum-steps methods for estimating evolutionary trees from data on discrete characters. *Systematic Zoology*, 22: 240–249.
- Fitzpatrick S., Feliciangeli M. D., Sanchez-Martin M. J., Monteiro F. A., & Miles M. (2008). Molecular genetics reveal that silvatic *Rhodnius prolixus* do colonise rural houses. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2: e210.
- Forattini O. P., Rocha e Silva E. O., Ferreira O. A., Rabello E. X., & P. D. G. B. (1971). Aspectos ecológicos da Tripanossomose Americana. III — Dispersão local de triatomíneos, com especial referência ao *Triatoma sordida*. *Revista Saúde Pública*, 5: 193–205.

Forattini O. P., Ferreira O. A., & Paulo S. (1979). Aspectos ecológicos da tripanossomíase americana. XV - Desenvolvimento, variação e permanência de *Triatoma sordida*, *Panstrongylus megistus* e *Rhodnius neglectus* em ecótopos artificiais. *Revista Saúde Pública*, 13: 220–234.

Forattini O. P. (1980). Biogeográfica, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. *Revista Saúde Pública*, 14: 265–299.

Forattini O. P., Ferreira O. A., Rabello E. X., Barata J. M. S., & Santos J. L. F. (1983). Aspectos Ecológicos da Tripanossomíase Americana. XVII - Desenvolvimento da domiciliação triatomínea regional, em centro de endemismo de *Triatoma sordida*. *Revista Saúde Pública*, 17: 159–199.

Freitas S. P. C., Lorosa E. S., Rodrigues D. C. S., Freitas A. L. C., & Gonçalves T. C. M. (2005). Fontes alimentares de *Triatoma pseudomaculata* no Estado do Ceará, Brasil. *Revista Saúde Pública*, 39: 27–32.

Fu Y. X. (1997). Statistical Test of Neutrality of Mutations Against Population Growth, Hitchhiking and Background Selection. *Genetics Society of America*, 147: 915–925.

Galvão C., Carcavallo R., Rocha D. S., & Jurberg, J. (2003). A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic note. *Zootaxa*, 202: 1–36.

García B. A., Manfredi C., Fichera L., & Segura E. L. (2003). Short report: variation in mitochondrial 12S and 16S ribosomal DNA sequences in natural populations of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 68: 692–694.

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.

Gardim S., Almeida C. E., Takiya D. M., Oliveira J., Araújo R. F., Cicarelli R. M. B., *et al.* (2014). Multiple mitochondrial genes of some sylvatic Brazilian *Triatoma*: Non-monophyly of the *T. brasiliensis* subcomplex and the need for a generic revision in the Triatomini. *Infection, Genetics and Evolution*, 23: 74–79.

Gardim S., Rocha C. S., Almeida C. E., Takiya D. M., da Silva M. T. A., Ambrósio D. L., *et al.* (2013). Evolutionary relationships of the *Triatoma matogrossensis* subcomplex, the endemic triatoma in Central-Western Brazil, based on mitochondrial DNA sequences. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 89: 766–774.

Gorla D. E., Jurberg J., Catalá S. S., & Schofield C. J. (1993). Systematic of *T. sordida*, *T. guasayana* and *T. patagonica* (Hemiptera, Reduviidae). *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 88: 379 – 385.

Gorla D. E., Dujardin J. P., & Schofield C. J. (1997). Biosystematics of Old World Triatominae. *Acta Tropica*, 63: 127–140.

Guhl F., Pinto N., & Aguilera G. (2009). Sylvatic triatominae: a new challenge in vector control transmission. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104: 71–75.

- Gurgel-Gonçalves R., & Cuba C. A. C. (2011). Infestation of thornbird nests (Passeriformes: Furnariidae) by *Psammolestes tertius* (Hemiptera: Reduviidae) across Brazilian Cerrado and Caatinga ecoregions. *Zoologia (Curitiba, Impresso)*, 28: 411–414.
- Gurgel-Gonçalves R., Ferreira J. B. C., Rosa A. F., Bar M. E., & Galvão C. (2011). Geometric morphometrics and ecological niche modelling for delimitation of near-sibling triatomine species. *Medical and Veterinary Entomology*, 25: 84–93.
- 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*, 2012: 1–15.
- Gürtler R. E., Petersen R. M., Cecere M. C., Schweigmann N. J., Chuit R., Gualtieri, J. M., *et al.* (1994). Chagas disease in north-west Argentina: risk of domestic reinfestation by *Triatoma infestans* after a single community-wide application of deltamethrin. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 88: 27–30.
- Hall T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium*, 41: 95–98.
- Harpending H. C. (1994). Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology*, 66: 591–600.
- Hartl D. L., & Clark A. G. *Princípios de genética de populações.* (2010). 4ª edição. Editora Arned, Porto Alegre, 660p.
- Hasegawa M., Kishino H., & Yano T. (1985). Dating of the Human-Ape Splitting by a Molecular Clock of Mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 22: 160-174.
- Hebert P. D. N., Cywinska A., Ball S. L., & DeWaard J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceeding of Royal Society/Biological Sciences*, 270: 313–321.
- Hebert P. D. N., Penton E. H., Burns J. M., Janzen D. H., & Hallwachs W. (2004a). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: 14812–14817.
- Hebert P. D. N., Stoeckle M. Y., Zemlak T. S., & Francis C. M. (2004b). Identification of Birds through DNA Barcodes. *PLoS Biology*, 2: e312.
- Hotez P. J., Bottazzi M. E., Franco-Paredes C., Ault S. K., & Periago M. R. (2008). The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2: e300.
- Huelsenbeck J. P. (1995). Performance of Phylogenetic Methods in Simulation. *Systematic Biology*, 44: 17–48.
- Hypsa V., Tietz D. F., Zrzavý J., Rego R. O. M., Galvao C., & Jurberg J. (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.

Juberg J., Galvão C., Lent H., Monteiro F. A., Lopes C. M., Panzera F., *et al.* (1998). Revalidação de *Triatoma garciabesi* Carcavallo, Cichero, Martínez, Prosen & Ronderos, 1967 (Hemiptera: Reduviidae). *Entomologia Y Vectores*, 5: 107–122.

Justi S. A., Russo C. A. M., Mallet J. R. D. S., Obara M. T., & Galvão C. (2014). Molecular phylogeny of Triatomini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Parasites & Vectors*, 7: 149.

Kimura M. (1980). A Simple Method for Estimating Evolutionary Rates of Base Substitutions Through Comparative Studies of Nucleotide Sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111–120.

Kuhner M. K., & Felsenstein J. (1994). A simulation comparison of phylogeny algorithms under equal and unequal evolutionary rates. *Molecular Biology and Evolution*, 11: 459–468.

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: 123–520.

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

Marcilla A., Bargues M. D., Abad-Franch F., Panzera F., Carcavallo R. U., Noireau F., *et al.* (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 F. H., Villalobos G. C., Cevallos A M., Torre P. D., Lacleste J. P., Alejandro-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.

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.

McEwen P. K., & Lehane M. J. (1993). Factors influencing flight initiation in the triatomine bug *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae). *International Journal of Tropical Insect Science*, 14: 461–464.

Meyer C.P., & Paulay G. 2005. DNA Barcoding: Error Rates Based on Comprehensive Sampling. *PLoS Biology*, 3: e422.

Mishler B. D., & Brandon R. N. (1987). Individuality, Pluralism, and the Phylogenetic Species Concept. *Biology and Philosophy*, 2: 397–414.

Mishler B. D., & Theriot E. C. (2000). "The phylogenetic species concept (*sensu* Mishler and Theriot): Monopyly, apomorphy, and phylogenetic species concepts", in Wheeler E. Q., & Meier R. (orgs), Species concepts and phylogenetic theory. *New York: Columbia University Press*, 44–54.

- Monteiro F. A., Pérez R., Panzera F., Dujardin J. P., Galvão C., Rocha D., *et al.* (1999). Mitochondrial DNA variation of *Triatoma infestans* populations and its implication on the specific status of *T. melanosoma*. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 94: 229–238.
- Monteiro F. A., Wesson D. M., Dotson E. M., Schofield C. J., & Beard C. B. (2000). Phylogeny and molecular taxonomy of the Rhodniini derived from mitochondrial and nuclear DNA sequences. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 62: 460–465.
- 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.
- 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.
- Monteiro F. A., Jurberg J., & Lazoski C. (2009). Very low levels of genetic variation in natural peridomestic populations of the Chagas disease vector *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) in southeastern Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 81: 223–227.
- Monteiro F. A., Peretolchina T., Lazoski C., Harris K., Dotson E. M., Abad-Franch F., *et al.* (2013). Phylogeographic pattern and extensive mitochondrial DNA divergence disclose a species complex within the Chagas disease vector *Triatoma dimidiata*. *PLoS One*, 8: e70974.
- Nei M., & Li W. H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76: 5269–5273.
- Nei M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Editora *Columbia University*, New York, USA.
- Nei M., & Kumar S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Editora *Oxford University*, New York, 333p.
- Noireau F., Brenière F., Cardozo L., Bosseno M. F., Vargas F., Peredo C., & Medinacelli M. (1996). Current spread of *Triatoma infestans* at the expense of *Triatoma sordida* in Bolivia. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 91: 271–272.
- Noireau F., Gutierrez T., Zegarra M., Flores R., Brenière F., Cardozo L., Dujardin J. P. (1998). Cryptic speciation in *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) from the Bolivian Chaco. *Tropical Medicine and International Health*, 3: 364–372.
- Noireau F., Gutierrez T., Flores R., Breniere F., Bosseno M. F., & Wisnivesky-Colli C. (1999a). Ecogenetics of *Triatoma sordida* and *Triatoma guasayana* (Hemiptera: reduviidae) in the Bolivian chaco. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 94: 451–457.
- Noireau F., Zegarra M., Ordoñez J., Gutierrez T., & Dujardin J. P. (1999b). Genetic structure of *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) domestic populations from Bolivia: application on control interventions. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 94: 347–351.

- Noireau F., & Dujardin J. P. (2001). Flight and nutritional status of sylvatic *Triatoma sordida* and *Triatoma guasayana*. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 96: 385–389.
- Noireau F., dos Santos S. M., Gumiel M., Dujardin J. P., Soares M. S., Carcavallo R., *et al.* (2002). Phylogenetic relationships within the oliveirai complex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Infection, Genetics and Evolution*, 2: 11–17.
- OMS., & TDR. (2007). Reporte sobre la enfermedad de Chagas. *Grupo de Trabajo Científico*, 96p.
- OMS. (2010). Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases First WHO report on neglected tropical diseases. *Frist WHO report on neglected tropical disease*, 172p.
- OMS., & TDR. (2012). Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis. *World Health Organization Technical Report Series*, (975), 100p.
- Oscherov E. B., Damborsky M. P., Bar M. E., & Gorla D. E. (2004). Competition between vectors of Chagas disease, *Triatoma infestans* and *T. sordida*: effects on fecundity and mortality. *Medical and Veterinary Entomology*, 18: 323–328.
- Panzer F., Perez R., Panzer 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.
- Panzer F., Hornos S., Pereira J., Cesteu R., Canale D., Diotaiuti L., Dujardin J. P., & Perez R. (1997). Genetic variability and geographic differentiation among three species of Triatomine bugs (Hemiptera - Reduviidae). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 57: 732–739.
- Patterson J. S. (2007). Comparative morphometric and molecular genetic analyses Triatominae (Reduviidae: Hemiptera). *Tese de Doutorado Em Filosofia*.
- Patterson J. S., Barbosa S. E., & Feliciangeli M. D. (2009). On the genus *Panstrongylus* Berg 1879: evolution, ecology and epidemiological significance. *Acta Tropica*, 110: 187–199.
- Patterson J. S., & Gaunt M. W. (2010). Phylogenetic multi-locus codon models and molecular clocks reveal the monophyly of haematophagous reduviid bugs and their evolution at the formation of South America. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 56: 608–621.
- Pavan M. G., & Monteiro F. A. (2007). A multiplex PCR assay that separates *Rhodnius prolixus* from members of the *Rhodnius robustus* cryptic species complex (Hemiptera: Reduviidae). *Tropical Medicine & International Health*, 12: 751–758.
- Pavan M. G. (2009). Filogeografia de *Rhodnius pictipes* (Hemiptera: Reduviidae) na região amazônica. Dissertação de Mestrado. Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ. Rio de Janeiro. 127p.
- Pelli A., Alves M., Sarmiento F. R., Martins E., Alves S., Abel M., & Eduardo L. (2007). Parâmetros populacionais para *Triatoma sordida* Stål, 1859, o vetor mais frequente da doença de Chagas no Triângulo Mineiro (Heteroptera, Triatominae). *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 40: 25–28.

- Pereira J., Dujardin J. P., Salvatella A., & Tibayrenc M. (1996). Enzymatic variability and phylogenetic relatedness among *Triatoma infestans*, *T. platensis*, *T. delpontei* and *T. rubrovaria*. *Heredity*, 77: 47–54.
- Pereira J. M., Almeida P. S., Sousa A. V., Paula A. M., Machado R. B., & Gurgel-Gonçalves R. (2013). Climatic factors influencing triatomine occurrence in Central-West Brazil. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 108: 335–341.
- Pfeiler E., Bitler B. G., Ramsey J. M., Palacios-Cardiel C., & Markow T. A. (2006). Genetic variation, population structure, and phylogenetic relationships of *Triatoma rubida* and *T. recurva* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the Sonoran Desert, insect vectors of the Chagas' disease parasite *Trypanosoma cruzi*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 41: 209–221.
- Poinar G. J. (2013). *Panstrongylus hispaniolae* sp. n. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), a new fossil triatomine in Dominican amber, with evidence of gut flagellates. *Palaeodiversity*, 6: 1–8.
- Portillo-Quintero C. A., & Sánchez-Azofeifa G. A. (2010). Extent and conservation of tropical dry forests in the Americas. *Biological Conservation*, 143: 144–155.
- Posada D. (2008). jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25: 1253–1256.
- Rassi A. Jr, Rassi A., Marin-Neto J. A. (2010). Chagas disease. *Lancet*, 375: 1388–1402.
- Ray N., Currat M., & Excoffier L. (2003). Intra-Deme Molecular Diversity in Spatially Expanding Populations. *Molecular Biology and Evolution*, 20: 76–86.
- Reyes-Lugo M., Rodriguez-Acosta A. (2000). Domiciliation of the sylvatic Chagas disease vector *Panstrongylus geniculatus* (Triatominae: Reduviidae) in Venezuela. *Medicine and Hygiene*, 94: 508.
- Rice W. R. (1989). Analyzing Tables of Statistical Tests. *Evolution*, 43: 223–225.
- Rocha e Silva E. O., Souza J. M. P., Andrade J. C. R., Mello C. S., & Ferreira O. A. (1977). Preferência alimentar (entre sangue humano e ave) dos *Triatoma sordida* encontrados em casas habitadas da região norte do estado de São Paulo - Brasil. *Revista Saúde Pública*, 11: 258–269.
- Rogers A. R., Harpending H. (1992). Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9: 552 – 569.
- Rúa N., Stevens L., & Dorn P. L. (2011). High genetic diversity in a single population of *Triatoma sanguisuga* (LeConte, 1855) inferred from two mitochondrial markers: Cytochrome b and 16S ribosomal DNA. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 11: 671–677.
- Rúa N. M., Bustamante D. M., Menes M., Stevens L., Monroy C., William Kilpatrick C., et al. (2014). Towards a Phylogenetic approach to the composition of species complexes in the

North and Central American Triatoma, Vectors of Chagas Disease. *Infection, Genetics and Evolution*.

Sainz A. C., Mauro L. V, Moriyama E. N., & García B. A. (2004). Phylogeny of triatomine vectors of *Trypanosoma cruzi* suggested by mitochondrial DNA sequences. *Genetica*, 121: 229–240.

Saitou N., & Nei M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406–425.

Schaefer C. W. (2003). Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): Systematic Questions and Some Others. *Neotropical Entomology*, 32: 1–10.

Schofield C. J. (1988). Biosystematics of the Triatominae. *Biosystematics of Haematophagous Insects*, 37: 284–312.

Schofield C. J., Lehane M. J., McEwan P., Catalá S. S., & Gorla D. E. (1991). Dispersive flight by *Triatoma sordida*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 85: 676–678.

Schofield C. J., Diotaiuti L., & Dujardin J. P. (1999). The process of domestication in Triatominae. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 94: 375–378.

Schofield C. J. (2000). Biosystematics and evolution of the Triatominae Biosistemática e evolução de triatomíneos. *Cad. Saúde Pública*, 16: 89–92.

Schofield C. J., Jannin J., & Salvatella R. (2006). The future of Chagas disease control. *Trends in Parasitology*, 22: 583–588.

Schofield C. J., & Galvão C. (2009). Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Tropica*, 110: 88–100.

Schwarz G. (1978). Estimating the dimension of a model. *The Annals of Statistics*, 6: 461–464.

Silveira A. C., & Dias J. C. P. (2011). O controle da transmissão vetorial. *História Sobre a Doença de Chagas No Brasil*, 44: 52–63.

Smith M. A., Fisher B. L., & Hebert P. D. N. (2005). DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: the ants of Madagascar. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 360: 1825–1834.

Tajima F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585–595.

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., & Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725–2729.

Tartarotti E., Azeredo-Oliveira M. T. V, & Ceron C. R. (2006). Phylogenetic approach to the study of Triatomines (Triatominae, Heteroptera). *Brazilian Journal of Biology*, 66: 703–708.

Testa J. M., Montoya-Lerma J., Cadena H., Oviedo M., & Ready P. D. (2002). Molecular identification of vectors of *Leishmania* in Colombia: mitochondrial introgression in the *Lutzomyia townsendi* series. *Acta Tropica*, *84*: 205 – 218.

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.

Usinger R. L., Wygodzinsky P., & Ryckman R. E. (1966). The biosystematics of Triatominae. *Annual Review of Entomology*, *11*: 309–330.

Villalobos G., Martínez-Hernández F., de la Torre P., Laclette J. P., & Espinoza B. (2011). Entomological indices, feeding sources, and molecular identification of *Triatoma phyllosoma* (Hemiptera: Reduviidae) one of the main vectors of Chagas disease in the Istmo de Tehuantepec, Oaxaca, Mexico. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *85*: 490–497.

Waleckx E., Salas R., Huamán N., Buitrago, R., Bosseno M. F., Aliaga C., *et al.* ... Brenière, S. F. (2011). New insights on the Chagas disease main vector *Triatoma infestans* (Reduviidae, Triatominae) brought by the genetic analysis of Bolivian sylvatic populations. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, *11*: 1045–1057.

Weir B. S., Cockerham C. C. (1984). Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution*, *38*: 1358–1370.

Weirauch C., & Munro J. B. (2009). Molecular phylogeny of the assassin bugs (Hemiptera: Reduviidae), based on mitochondrial and nuclear ribosomal genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *53*: 287–299.

9. Apêndice

Apêndice 1. Teste de agrupamento das populações utilizando a análise espacial molecular de variância (SAMOVA) e a análise molecular de variância (AMOVA).

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma dos quadrados dos desvios (SDS)	Componentes de variação	Porcentagem de variação	Índice Φ	valor-p
2 Grupos: [(MTP, MSR, MSA, GOO, GOI, PIS, BAI, MGL, ARC)x MTC]						
Entre populações	1	17,995	0,53766 Va	24,46	$\Phi_{SC}=0,57$	0,00
Entre as subpopulações dentro das populações	8	72,156	0,96067 Vb	43,70	$\Phi_{St}=0,68$	0,00
Dentro das subpopulações	77	53,895	0,69993 Vc	31,84	$\Phi_{Ct}=0,24$	0,11
3 Grupos: [(MSA, ARC)x(MTP, MTC, GOO, GOI, PIS, BAI, MGL)x(MSR)]						
Entre populações	2	38,936	0,66225 Va	31,42	$\Phi_{SC}=0,51$	0,00
Entre as subpopulações dentro das populações	7	51,216	0,74548 Vb	35,37	$\Phi_{St}=0,66$	0,00
Dentro das subpopulações	77	53,895	0,69993 Vc	33,21	$\Phi_{Ct}=0,31$	0,0019
4 Grupos: [(MSA, ARC)x (MTC, GOO, GOI, BAI, MGL)x(MSR)x(MTP, PIS)]						
Entre populações	3	53,769	0,64328 Va	33,02	$\Phi_{SC}=0,46$	0,00
Entre as subpopulações dentro das populações	6	36,383	0,60515 Vb	31,06	$\Phi_{St}=0,64$	0,00
Dentro das subpopulações	77	53,895	0,69993 Vc	35,92	$\Phi_{Ct}=0,33$	0,0019
5 Grupos: [(MSA, ARC)x (MTP, GOO, GOI, BAI, MGL)x(PIS)x(MTC)x(MSR)]						
Entre populações	4	66,885	0,83351 Va	42,08	$\Phi_{SC}=0,38$	0,00
Entre as subpopulações dentro das populações	5	23,266	0,44740 Vb	22,59	$\Phi_{St}=0,64$	0,00
Dentro das subpopulações	77	53,895	0,69993 Vc	35,34	$\Phi_{Ct}=0,42$	0,00

Continuação

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma dos quadrados dos desvios (SDS)	Componentes de variação	Porcentagem de variação	Índice Φ	valor-p
6 Grupos: [(MSA, ARC)x(MSR)x(PIS)x(MTC)x(GOO, GOI, BAI, MGL)x(MTP)]						
Entre populações	5	73,978	0,82238 Va	43,24	$\Phi_{SC}=0,35$	0,00
Entre as subpopulações dentro das populações	4	16,173	0,37963 Vb	19,96	$\Phi_{St}=0,63$	0,00
Dentro das subpopulações	77	53,895	0,69993 Vc	36,80	$\Phi_{Ct}=0,43$	0,00
7 Grupos: [(MSA, ARC)x(BAI)x(MSR)x(MTC)x(MTP, GOO, MGL)x(PIS)x(GOI)]						
Entre populações	6	81,447	0,90155 Va	48,67	$\Phi_{SC} =0,26$	0,00
Entre as subpopulações dentro das populações	3	8,704	0,25104 Vb	13,55	$\Phi_{St}=0,62$	0,00
Dentro das subpopulações	77	53,895	0,69993 Vc	37,78	$\Phi_{Ct}=0,48$	0,00098
8 Grupos: [(MSA, ARG)x(PIS)x(GOO, MGL)x(MTC)x(MSR)x(BAI)x(MTP)x(GOI)]						
Entre populações	7	87,230	1,03083 Va	56,71	$\Phi_{SC} =0,11$	0,00
Entre as subpopulações dentro das populações	2	2,921	0,08705 Vb	4,79	$\Phi_{St}=0,61$	0,00
Dentro das subpopulações	77	53,895	0,69993 Vc	38,50	$\Phi_{Ct}=0,56$	0,00196
9 Grupos: [(GOO, MGL)x(MSA)x(MTP)x(BAI)x(MSR)x(GOI)x(MTC)x(PIS)x(ARG)]						
Entre populações	8	89,286	1,07477 Va	59,90	$\Phi_{SC} =0,02$	0,00
Entre as subpopulações dentro das populações	1	0,865	0,01951 Vb	1,09	$\Phi_{St}=0,60$	0,0371
Dentro das subpopulações	77	53,895	0,69993 Vc	39,01	$\Phi_{Ct}=0,59$	0,0117

Simulação realizada por SAMOVA (com dois a nove grupos). Após as análises verificou-se que as subpopulações estavam agrupadas em sete populações ($\Phi_{CT} = 0.48$; $P = 0.00098$). **MTP**: Poxoréu, MT, BR; **GOO**: Formosa, GO, BR; **MGL**: Lontra, MG, BR; **MTC**: Cuiabá, MT, BR; **MSR**: Rochedo, MS, BR; **MSA**: Ap. de Taboado, MS, BR; **ARG**: Corrientes, AR; **GOI**: Firminópolis, GO, BR; **PIS**: São Raimundo, PI, BR; **BAI**: Iraquara, BA, BR.

Apêndice 2. Divergência molecular (%) entre os haplótipos encontrados em cada localidade comparados par-a-par, utilizando o modelo de distância K2-p.

Haplótipos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	
1.MTP402																												
2.MTP404	1,0																											
3.MTP408	1,0	0,4																										
4.MTP449	0,2	0,8	0,8																									
5.MTC463	0,6	1,2	1,2	0,4																								
6.MSR01	3,5	4,1	3,7	3,3	3,7																							
7.MSR10	1,4	2,0	2,0	1,2	1,6	3,7																						
8.MSR15	1,2	1,8	1,8	1,0	1,4	3,5	0,2																					
9.MSR18	0,8	1,4	1,4	0,6	1,0	3,1	1,4	1,2																				
10.MSA554	0,6	1,2	1,2	0,4	0,8	3,7	1,6	1,4	1,0																			
11.MSA573	0,6	1,2	1,2	0,4	0,8	3,7	1,6	1,4	1,0	0,8																		
12.MSA558	0,4	1,0	1,0	0,2	0,6	3,5	1,4	1,2	0,8	0,2	0,6																	
13.GOO11	0,8	1,4	1,4	0,6	1,0	3,1	1,4	1,2	0,0	1,0	1,0	0,8																
14.GOO07	0,2	0,8	0,8	0,0	0,4	3,3	1,2	1,0	0,6	0,4	0,4	0,2	0,6															
15.GOI09	0,4	1,0	1,0	0,2	0,6	3,1	1,4	1,2	0,8	0,6	0,6	0,4	0,8	0,2														
16.GOI16	0,8	1,0	1,0	0,6	1,0	3,1	1,4	1,2	0,4	1,0	1,0	0,8	0,4	0,6	0,8													
17.GOI13	1,0	1,6	1,6	0,8	1,2	3,3	1,6	1,4	0,2	1,2	1,2	1,0	0,2	0,8	1,0	0,6												
18.PIS69	0,6	0,4	0,4	0,4	0,8	3,7	1,6	1,4	1,0	0,8	0,8	0,6	1,0	0,4	0,6	0,6	1,2											
19.PIS79	0,4	0,6	0,6	0,2	0,6	3,5	1,4	1,2	0,8	0,6	0,6	0,4	0,8	0,2	0,4	0,4	1,0	0,2										
20.BAI01	0,4	1,0	1,0	0,2	0,6	3,5	1,4	1,2	0,8	0,6	0,6	0,4	0,8	0,2	0,4	0,8	1,0	0,6	0,4									
21.MGL14	0,4	1,0	1,0	0,2	0,6	3,5	1,4	1,2	0,8	0,6	0,6	0,4	0,8	0,2	0,4	0,8	1,0	0,6	0,4	0,4								
22.MGL11F	0,4	1,0	1,0	0,2	0,6	3,5	1,4	1,2	0,8	0,6	0,6	0,4	0,8	0,2	0,4	0,8	1,0	0,6	0,4	0,4	0,4							
23.MGL11M	0,8	1,4	1,4	0,6	1,0	3,5	1,0	0,8	0,8	1,0	1,0	0,8	0,8	0,6	0,8	0,8	1,0	1,0	0,8	0,8	0,8	0,8						
24.MGL19	0,4	1,0	1,0	0,2	0,6	3,5	1,4	1,2	0,8	0,6	0,6	0,4	0,8	0,2	0,4	0,8	1,0	0,6	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,8				
25.MGL23	0,6	1,2	1,2	0,4	0,8	3,7	1,6	1,4	1,0	0,8	0,8	0,6	1,0	0,4	0,6	1,0	1,2	0,8	0,6	0,6	0,6	0,6	1,0	0,6				
26.MGL29	0,8	1,4	1,4	0,6	1,0	3,9	1,8	1,6	1,2	1,0	1,0	0,8	1,2	0,6	0,8	1,2	1,0	1,0	0,8	0,8	0,8	0,8	1,2	0,8	0,2			
27.MGL04	0,2	0,8	0,8	0,0	0,4	3,3	1,2	1,0	0,6	0,4	0,4	0,2	0,6	0,0	0,2	0,6	0,8	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,6	0,2	0,4	0,6		
28.ARC02	0,6	1,2	1,2	0,4	0,8	3,7	1,6	1,4	1,0	0,0	0,8	0,2	1,0	0,4	0,6	1,0	1,2	0,8	0,6	0,6	0,6	1,0	0,6	0,8	1,0	0,4		

É possível observar que a divergência genética entre as amostras analisadas neste estudo foram <2%, exceto para a comparação par-a-par entre o haplótipo identificado como MSR01 (representando as amostras MSR01 e MSR13) na qual foi cerca de 4%.