

Ministério da Saúde

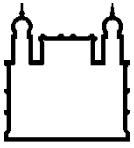
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação Biodiversidade e Saúde
Mestrado

Caracterização das espécies do gênero Rhodnius Stål, 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) pelo método do Código de Barras de DNA

Carolina Branco Dale Coutinho

Rio de Janeiro
Junho de 2013



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

Carolina Branco Dale Coutinho

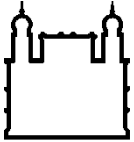
Caracterização das espécies do gênero *Rhodnius* Stål, 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) pelo método do Código de Barras de DNA.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Saúde

Orientador: Prof. Dr. Cleber Galvão

RIO DE JANEIRO
Junho de 2013

FICHA CATALOGRÁFICA A SER ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DE MANGUINHOS
PARA A VERSÃO FINAL DA TESE.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

Carolina Branco Dale Coutinho

Caracterização das espécies do gênero Rhodnius Stål, 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) pelo método do Código de Barras de DNA.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Cleber Galvão Ferreira

Aprovada em: 21/06/2013

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Jacenir Reis dos Santos Mallet - Presidente (Instituto Oswaldo Cruz)

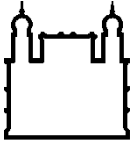
Prof. Dr. Alexandre Silva de Paula (Universidade Federal de Ouro Preto)

Prof. Dr. Fernando Braga Stehling Dias (Universidade Federal do Rio de Janeiro)

Prof. Dr. Dayse da Silva Rocha (Instituto Oswaldo Cruz)

Prof. Dr. Carolina Magalhães dos Santos (Institutos Superiores de Ensino do Censa)

Rio de Janeiro, 21 de junho de 2013



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Anexar a cópia da Ata que será entregue pela SEAC já assinada.

Agradecimentos

Ao meu orientador e chefe Cleber Galvão, pela oportunidade, por esses mais de 10 anos de convivência e apoio, pela confiança e liberdade de conduzir meu trabalho. Pela amizade e, principalmente, por me despertar a paixão pela taxonomia. Sem seu apoio e incentivo eu não teria chegado até aqui.

Ao meu namorado Luis Claudio, por todo apoio e paciência durante esses dois anos. Por estar ao meu lado até nas horas mais chatas. Você é o meu número, sem você a vida teria menos graça.

Ao chefe do laboratório, Dr. José Jurberg, pelo auxílio e incentivo, por tornar o LNIRTT mais que um ambiente de trabalho, um lugar onde amigos colaboram entre si e produzem conhecimento.

Ao Dr. Fernando Monteiro por abrir as portas do Laboratório de Sistemática Bioquímica para que eu pudesse conduzir meu trabalho. E também à sua equipe, por todo apoio, atenção e cuidado na realização dos experimentos.

Ao meu amigo Dr. Márcio Pavan por me ensinar, pacientemente, desde como se extrai DNA até análises das sequências.

À Dra. Karina Morelli por toda paciência, companhia e dedicação em me ajudar durante os experimentos e na busca das resoluções para os problemas encontrados ao longo do caminho, pelo apoio e preocupação com meus resultados.

À minha amiga Silvia Justi por me ceder horas do seu dia e trabalho para me ajudar nas correções, revisões, análises e desabafos.

À Dra. Dayse Rocha muito obrigado por ter aceitado ser suplente da minha banca. Por acompanhar e compartilhar todos os momentos desde a minha graduação, por ter se tornado a minha melhor companhia de campo.

Ao Dr. Alexandre Silva de Paula por ter aceitado participar como revisor e da banca examinadora de minha dissertação. Obrigada por toda a atenção!

À Dra. Jacenir dos Santos Mallet e ao Dr. Fernando Stehling por terem aceitado participar da banca examinadora da minha dissertação.

À Dra. Carolina Magalhães por ter aceitado ser suplente da minha banca. Foi o melhor presente ter você por perto nesse dia.

À Fundação Oswaldo Cruz e à coordenação de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde do Instituto Oswaldo Cruz pela oportunidade de realizar esta dissertação. Agradeço a CAPES pela bolsa de estudos concedida e ao CNPq pelo apoio financeiro.

À amiga Raquel Raigorodski pelos momentos felizes, pelas risadas, pelo apoio, por dividir comigo os momentos bons e ruins, e pela ajuda imensurável no laboratório.

Equipe LNIRTT vocês são parte fundamente dessa dissertação, muito obrigada pela paciência e carinho que vocês tiveram ao separar os espécimes de *Rhodnius*, por me ajudarem com detalhes e principalmente pelo apoio.

Às minhas amigas Carol Bastos, Karlinha Bitencourth, Ana Carolina Valente, Renata Rocha, Ana Paula Gomes, Patricia Diniz, Aline Schilithz, Tatian Figueiredo e Solange Peixoto, e ao amigo Cesar Luiz pela amizade que pudemos criar durante esse tempo, pelas risadas, descontrações, conversas intermináveis, e o carinho principalmente.

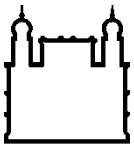
À minha melhor amiga Julia Bellucci, obrigado por entender minha ausência necessária, por estar por perto sempre quando eu precisei afinal amizade verdadeira nunca morre e acho que somos a prova disso.

À minha mãe por ter sustentado o meu sonho e acreditado que eu seria capaz.

Obrigado a todas as pessoas envolvidas que não foram mencionadas pelo apoio na realização deste trabalho.

"Não existe triunfo sem perda, não há vitória sem sofrimento,
não há liberdade sem sacrifício."

J.R.R.Tolkien



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

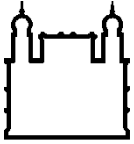
Caracterização das espécies do gênero *Rhodnius* Stål, 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) pelo método do Código de Barras de DNA.

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIODIVERSIDADE E SAÚDE

Carolina Branco Dale Coutinho

A doença de Chagas é uma infecção causada pelo agente etiológico o *Trypanosoma cruzi*, transmitida ao ser humano através das fezes infectadas dos triatomíneos. O gênero *Rhodnius*, composto por 18 espécies, é um dos mais estudados, não só pela sua importância epidemiológica, como também pela difícil diferenciação de suas espécies. A correta identificação destas é necessária, pois o controle da doença esta baseado no combate ao vetor. O sequenciamento de DNA vem sendo amplamente utilizado para identificação, determinação das relações de parentesco e inferências filogenéticas de triatomíneos. O método do Código de Barras de DNA é um sistema de identificação taxonômica universal, rápido e de livre acesso, baseado na variação de uma parte da sequência do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade I (COI). O objetivo do presente estudo foi caracterizar a identidade taxonômica de espécimes do gênero *Rhodnius*, por meio da taxonomia clássica e da amplificação fragmento do COI, avaliando a utilidade deste marcador para discriminar as espécies. Através da análise do COI foi possível caracterizar 13 espécies de *Rhodnius*, porém não foi possível inferir a filogenia deste grupo utilizando este marcador. As análises das distâncias indicam a existência do *barcoding-gap* para a maioria das espécies. Portanto, este estudo demonstra que a proposta do Código de Barras de DNA para caracterizar espécies do gênero *Rhodnius* é útil, porém sugere-se a utilização integrada de procedimentos adicionais de sistemática e taxonomia.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Characterization of the genus *Rhodnius* Stål, 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) by the method of DNA Barcode.

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN BIODIVERSIDADE E SAÚDE

Carolina Branco Dale Coutinho

Chagas disease is an infection caused by the etiological agent *Trypanosoma cruzi*, transmitted to humans through the feces of infected triatomines. The genus *Rhodnius*, comprising 18 species, is one of the most studied, not only for its epidemiological importance, but also because of the difficult differentiation of these species. The correct identification is necessary, because the control of disease is based on vector combat. The DNA sequencing has been widely used for identification, determination of phylogenetic relationships and phylogenetic inferences of triatomines. The method of DNA Barcoding is a system of universal taxonomic identification, fast with free access, based on the variation of a part of the sequence of the mitochondrial gene cytochrome oxidase subunit I (COI). The objective of this study was to characterize the taxonomic identity of specimens of the genus *Rhodnius*, by classical taxonomy and amplification of COI fragment, evaluating its usefulness to discriminate species. By analysis of COI was possible to characterize 13 *Rhodnius* species, but it was not possible to infer the phylogeny of this group. The analysis of the distances indicates the existence of *barcoding-gap* for most species. Therefore, this study demonstrates that the proposed DNA Barcoding, to characterize the genus *Rhodnius*, is useful, but it is suggested to use additional procedures integrated systematic and taxonomy.

Índice

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 1 |
| | 1.1. A doença de Chagas | 1 |
| | 1.2. Vetores: Triatomíneos | 2 |
| | 1.3. A Tribo Rhodniini e o gênero <i>Rhodnius</i> | 3 |
| | 1.3.1. <i>Rhodnius amazonicus</i> Almeida, Santos & Sposina, 1973..... | 6 |
| | 1.3.2. <i>Rhodnius brethesi</i> Matta, 1919 | 7 |
| | 1.3.3. <i>Rhodnius colombiensis</i> Mejia, Galvão & Jurberg, 1999 | 7 |
| | 1.3.4. <i>Rhodnius dalessandroi</i> Carcavallo e Barreto, 1976 | 8 |
| | 1.3.5. <i>Rhodnius domesticus</i> Neiva & Pinto, 1923 | 8 |
| | 1.3.6. <i>Rhodnius ecuadoriensis</i> Lent & Leon, 1958..... | 9 |
| | 1.3.7. <i>Rhodnius milesi</i> Carcavallo, Rocha, Galvão & Jurberg, 2001 | 9 |
| | 1.3.8. <i>Rhodnius montenegrensis</i> Da Rosa <i>et al.</i> , 2012 | 10 |
| | 1.3.9. <i>Rhodnius nasutus</i> Stål 1859 | 11 |
| | 1.3.10. <i>Rhodnius neglectus</i> Lent, 1954..... | 12 |
| | 1.3.11. <i>Rhodnius neivai</i> Lent, 1953..... | 13 |
| | 1.3.12. <i>Rhodnius pallescens</i> Barber, 1932..... | 13 |
| | 1.3.13. <i>Rhodnius paraensis</i> Sherlock, Guitton & Miles, 1977..... | 14 |
| | 1.3.14. <i>Rhodnius pictipes</i> Stål, 1872..... | 14 |
| | 1.3.15. <i>Rhodnius prolixus</i> Stål, 1859..... | 15 |
| | 1.3.16. <i>Rhodnius robustus</i> Larrousse, 1927..... | 16 |
| | 1.3.17. <i>Rhodnius stali</i> Lent, Jurberg & Galvão, 1993..... | 17 |
| | 1.3.18. <i>Rhodnius zeledoni</i> Jurberg, Rocha & Galvão, 2009..... | 17 |
| | 1.4. Análise molecular aplicada aos triatomíneos | 18 |
| | 1.5. Identificação molecular e código de barras de DNA | 18 |
| | 1.4.1. Projeto BR-BOL..... | 20 |
| 2 | JUSTIFICATIVA | 21 |
| 3 | OBJETIVOS | 23 |
| | 3.1. Objetivo Geral | 23 |
| | 3.2. Objetivos Específicos | 23 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 24 |

| | | |
|------|---|-------------------------------|
| 4.1. | Obtenção das amostras | 24 |
| 4.2. | Extração de DNA..... | 24 |
| 4.3. | PCR e Iniciadores (<i>Primers</i>)..... | 26 |
| 4.4. | Sequenciamento | Erro! Indicador não definido. |
| 4.5. | Edição e alinhamento | 27 |
| 4.6. | Identificação molecular | 28 |
| 5 | RESULTADOS | 29 |
| 5.1. | Identificação dos espécimes | 29 |
| 5.2. | Análise das Sequências: diversidade e filogenia | 30 |
| 6 | DISCUSSÃO | 36 |
| 7 | CONCLUSÕES | 41 |
| 8 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 42 |
| 9 | APÊNDICES | ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO. |
| 10 | ANEXOS | ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO. |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Cabeça de <i>R. neglectus</i> em vista dorsal (A) e vista lateral (B). Imagem adaptada de Lent & Wygodzinsky (1979) | 3 |
| Figura 2. <i>R. amazonicus</i> Almeida Santos & Sposina, 1973. | 6 |
| Figura 3. <i>R. brethesi</i> Matta, 1919..... | 7 |
| Figura 4. <i>R. colombiensis</i> Mejia, Galvão & Jurberg, 1999 | 7 |
| Figura 5. <i>R. dalessandroi</i> Carcavallo e Barreto, 1976..... | 8 |
| Figura 6. <i>R. domesticus</i> Neiva & Pinto, 1923..... | 8 |
| Figura 7. <i>R. ecuadoriensis</i> Lent & Leon, 1958 | 9 |
| Figura 8. <i>R. milesi</i> Rocha, Galvão & Jurberg, 2001 | 9 |
| Figura 9. <i>R. montenegrensis</i> . (Foto: Da Rosa <i>et al.</i> 2012)..... | 10 |
| Figura 10. <i>R. nasutus</i> Stål 1859..... | 11 |
| Figura 11. <i>R. neglectus</i> Lent, 1954 | 12 |
| Figura 12. <i>R. neivai</i> Lent, 1953 | 13 |
| Figura 13. <i>R. pallescens</i> Barber, 1932..... | 13 |
| Figura 14. <i>R. paraensis</i> Sherlock, Guitton & Miles, 1977..... | 14 |
| Figura 15. <i>R. pictipes</i> Stål, 1872..... | 14 |
| Figura 16. <i>R. prolixus</i> Stål, 1859..... | 15 |
| Figura 17. <i>R. robustus</i> Larrousse, 1927 | 16 |
| Figura 18. <i>R. stali</i> Lent, Jurberg & Galvão, 1993. | 17 |
| Figura 19. Árvore filogenética para haplótipos do gene mitocondrial COI do gênero <i>Rhodnius</i> , construída com base na matriz de distâncias Kimura 2-parâmetros (<i>Neighbor-joining</i> com 1000 réplicas de <i>bootstrap</i>). (Valores acima e abaixo dos ramos indicam suporte <i>bootstrap</i>)..... | 31 |
| Figura 20. Árvore de máxima verossimilhança utilizando a região do gene mitocondrial COI do gênero <i>Rhodnius</i> . Os números acima dos nós correspondem aos valores de <i>bootstrap</i> obtido em 1000 réplicas com base na matriz de distâncias Kimura 2-parâmetros(Valores acima e abaixo dos ramos indicam suporte <i>bootstrap</i>). | 32 |
| Figura 21. Árvore de máxima verossimilhança utilizando a região do gene mitocondrial COI do gênero <i>Rhodnius</i> obtida através do programa Seaview. Os números acima dos nós correspondem aos valores de <i>bootstrap</i> obtido em 100 réplicas com base | |

| | |
|--|----|
| na matriz de distâncias Kimura 2-parâmetros (Valores acima e abaixo dos ramos indicam suporte <i>bootstrap</i>)..... | 33 |
| Figura 22. Distância genética (K2P) entre cada um dos haplótipos de <i>Rhodnius</i> encontrados. | 34 |
| Figura 23. Alinhamento das sequências obtidas..... | 79 |
| Figura 24. Árvore filogenética para haplótipos do gene mitocondrial COI (250pb) do gênero <i>Rhodnius</i> , construída com base na matriz de distâncias Kimura 2-parâmetros (<i>Neighbor-joining</i> com 1000 réplicas de <i>bootstrap</i>). (Valores acima e abaixo dos ramos indicam suporte <i>bootstrap</i>). | 87 |
| Figura 25. Árvore de máxima verossimilhança utilizando a região do gene mitocondrial COI (250pb) do gênero <i>Rhodnius</i> . Os números acima dos nós correspondem aos valores de <i>bootstrap</i> obtido em 1000 réplicas com base na matriz de distâncias Kimura 2-parâmetros(Valores acima e abaixo dos ramos indicam suporte <i>bootstrap</i>)..... | 88 |
| Figura 26. Árvore filogenética para haplótipos do gene mitocondrial COI (650pb) do gênero <i>Rhodnius</i> , construída com base na matriz de distâncias Kimura 2-parâmetros (<i>Neighbor-joining</i> com 1000 réplicas de <i>bootstrap</i>). (Valores acima e abaixo dos ramos indicam suporte <i>bootstrap</i>). | 89 |
| Figura 27. Árvore de máxima verossimilhança utilizando a região do gene mitocondrial COI (650pb) do gênero <i>Rhodnius</i> . Os números acima dos nós correspondem aos valores de <i>bootstrap</i> obtido em 1000 réplicas com base na matriz de distâncias Kimura 2-parâmetros(Valores acima e abaixo dos ramos indicam suporte <i>bootstrap</i>)..... | 90 |

Lista de Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Relação de espécimes provenientes de coleção utilizados para extração de DNA | 58 |
| Tabela 2. Relação de espécimes provenientes de colônia do LNIRTT, preservados em álcool e coletados no campo utilizados para extração de DNA: | 61 |
| Tabela 3. Amostras testadas paralelamente provenientes de campo e colônias do LNIRTT: | 64 |
| Tabela 4. Resultados da amplificação por PCR para cada par de iniciadores testados. | 65 |
| Tabela 5. Relação de espécimes utilizados para a análise das sequências. | 77 |

Lista de Siglas e Abreviaturas

BOLD – *Barcode of Life Database*

BSA – Albumina Soro bovino

COI - citocromo oxidase I

cit *b* - citocromo *b*

DC – Doença de Chagas

DMSO – Dimetil Sulfóxido

DNA - ácido desoxirribonucleico

DNAm_t – DNA mitocondrial

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

e.g. - *exempli gracia*

et al. - *et alli*

HCl - ácido clorídrico

ITS-2 - segundo espaçador interno transcrito ribossomal

Kbp – kilo pares de bases = 1.000 pb

KCl - cloreto de potássio

K2p - 2 parâmetros de Kimura

L - litro

M - molar

mg - miligramas

MgCl₂ - cloreto de magnésio

ml – mililitros

mm – milímetros

MV – Máxima Verossimilhança

NaCl - cloreto de sódio

NJ- *Neighbor-Joining*

OPAS- Organização Pan-Americana de Saúde

pb - pares de bases

PCR - reação em cadeia da polimerase

PEG - polietilenoglicol

RAPD - DNA polimórfico amplificado ao acaso (*Randon Amplified Polymorphism DNA*)

RFLP - polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

RPM - rotações por minuto

SDS-dodecil sulfato de sódio

Tris - tris (hidroximetil) aminometano

TM - *trademark* (= marca registrada)

μ - micro (10^{-6})

® - marca registrada

°C - graus Celsius

1 INTRODUÇÃO

1.1. A doença de Chagas

A doença de Chagas (DC) ou Tripanosomíase Americana é uma infecção de caráter endêmico e de evolução geralmente crônica que tem como agente etiológico o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). A principal forma de transmissão, ao homem e outros mamíferos, é através das fezes infectadas do vetor, inseto hematófago da subfamília Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), popularmente conhecido no Brasil como barbeiro, chupão, bicudo, procotó, entre outros. Outros mecanismos de transmissão não vetorial do parasito são: transplante de órgãos, transfusão sanguínea, transmissão congênita, aleitamento materno e acidentes de laboratório. Nos últimos anos a transmissão oral, outra forma de veiculação da DC, vem sendo destacada com frequência e ocorre através da ingestão acidental de alimentos contaminados (e.g. suco de açaí e caldo de cana), e pode resultar em óbito rapidamente (Dias & Schofield, 1999; Schmunis, 1999).

Entre 1975 e 1983, dos 17 milhões de casos mundiais da doença de Chagas, estimava-se que cerca de cinco milhões ocorriam em território brasileiro (cerca de 4,2% da população da época), Estes dados serviram de alerta para a necessidade de propostas na redução da transmissão através do controle dos vetores (Silveira *et al.* 1984; Morel & Lazdins, 2003; Gurgel-Gonçalves *et al.* 2012).

Em 1991, um consórcio internacional coordenado pela Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) iniciou um programa baseado na redução da transmissão vetorial e na interrupção da transmissão transfusional da DC. Conhecido como “Iniciativa dos Países do Cone Sul”, uma parceria do Brasil com outros seis países da América do Sul (Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai), este programa tinha como objetivo combater, por meio de inseticidas, a principal espécie vetora: o *Triatoma infestans* (Klug, 1834).

O *T. infestans* era considerado epidemiologicamente mais relevante, por apresentar alta capacidade e competência vetorial, além de colonizar casas ao longo de toda a sua distribuição geográfica (Países do Cone Sul). Essa iniciativa além de apresentar um impacto fundamental na redução da transmissão vetorial da doença, também estimulou a criação de iniciativas subsequentes nos Países Andinos e na

América Central (WHO, 2002; Dias *et al.* 2002; Schofield & Dujardin, 1997; Dias & Schofield, 1999).

Apesar do sucesso dos programas de controle, esta doença ainda é considerada de caráter socioeconômico, sendo a quarta principal endemia das Américas e, atualmente, estima-se que afete entre 7 e 8 milhões de pessoas e que mais de 25 milhões de indivíduos vivam em áreas de risco (Schofield, 1994; WHO, 2013).

Devido à ausência de vacinas e de drogas mais efetivas, os programas de controle permanecem fundamentados no combate da transmissão vetorial através de ações químicas (utilização de inseticidas de efeito residual) e de ações físicas (melhoria das habitações). Entretanto, o êxito dessas ações se fundamenta na elaboração de planos de vigilância e controle baseados na correta identificação dos vetores, e na aplicação de medidas educativas junto às populações que vivem em área de risco. A importância da correta identificação dos vetores está no fato de que as espécies apresentam comportamentos distintos em relação à invasão do ambiente antrópico, sendo que algumas delas vivem exclusivamente no ambiente silvestre, e outras invadem e chegam a colonizar ambientes peridomiciliares e ou próprios domicílios (Morel & Lazdins, 2003; Schofield *et al.* 2006; Lima & Sarquis, 2007; Silveira & Dias, 2011; Gurgel-Gonçalves *et al.* 2012)

1.2. Vetores: Triatomíneos

Os triatomíneos são insetos pertencentes à Ordem Hemiptera, Família Reduviidae. Descrita por Jeannel em 1919, a subfamília Triatominae é caracterizada pela hematofagia obrigatória e pode ser diferenciada das demais subfamílias de Reduviídeos por apresentarem uma membrana entre o segundo e terceiro segmento do aparelho bucal picador-sugador. Composta por 145 espécies e 18 gêneros, Triatominae está dividida em cinco tribos: Alberproseniini, Bolboderini, Cavernicolini, Rhodiniini e Triatomini, das quais as duas últimas são as mais diversas e epidemiologicamente relevantes (Lent & Wygodzinsky, 1979; Galvão *et al.* 2003; Vallejo *et al.* 2009).

Possuem desenvolvimento hemimetabólico com cinco estádios ninfais anteriores a fase adulta. As ninfas podem ser diferenciadas dos adultos por serem ápteras, pela ausência de ocelos e de fossetas esponjosas. Somente o 5º estágio apresenta discreta

diferenciação sexual externa, enquanto os adultos apresentam evidente dimorfismo sexual (Lent & Wygodzinsky, 1979)

Os adultos possuem cabeça geralmente alongada e subcilíndrica, dividida em regiões ante e pósocular; olhos bem desenvolvidos e presença de ocelos; um par de antenas com quatro artículos com funções olfatória e auditiva. Na base de cada antena pode ser encontrada uma estrutura chamada de tubérculo antenífero, situada lateralmente. A distância entre a inserção do tubérculo antenífero e os olhos é uma característica muito importante para identificação de alguns gêneros. O aparelho bucal do tipo picador-sugador, curto e retilíneo, formado por três segmentos. O tórax com pronoto bem desenvolvido e escutelo proeminente exhibe características com grande importância taxonômica. O abdome achatado dorso-ventralmente, apresenta conexivos laterais (Lent & Wygodzinsky, 1979).

1.3. A Tribo Rhodniini e o gênero *Rhodnius*

A Tribo Rhodniini Pinto, 1926 é composta pelos gêneros *Rhodnius* Stål, 1859 e *Psammolestes* Bergroth, 1911; esses compreendem 18 e três espécies, respectivamente. As espécies da Tribo Rhodniini podem ser facilmente identificados pela inserção das antenas na porção distal da cabeça e pela presença de calosidades características atrás dos olhos (**Figura 1**).

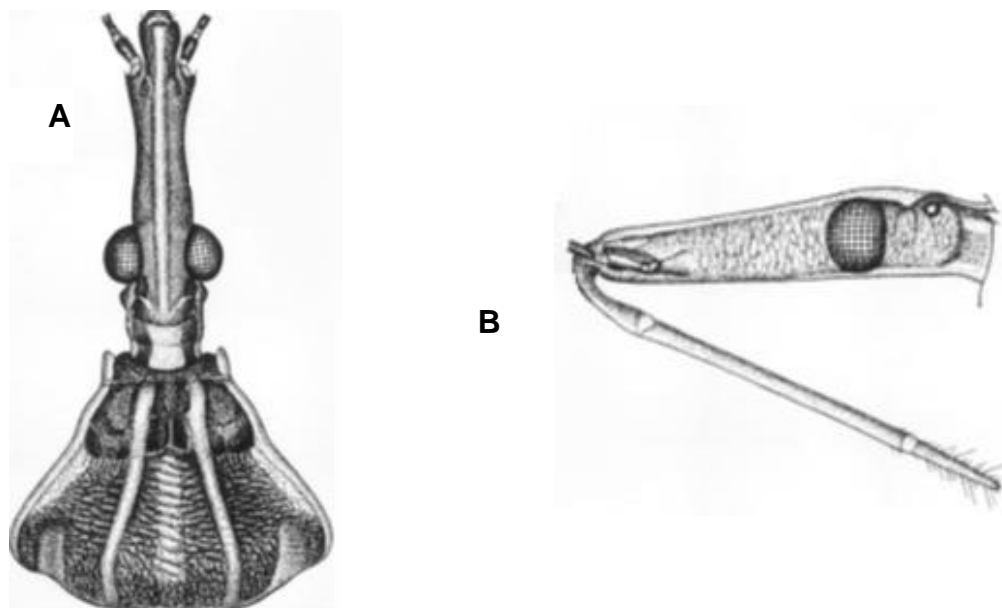


Figura 1. Cabeça de *R. neglectus* em vista dorsal (A) e vista lateral (B). Imagem adaptada de Lent & Wygodzinsky (1979)

O gênero *Rhodnius*, foi descrito por Stål em 1859 com base na espécie tipo *R. prolixus*. Este gênero é um dos mais estudados, não só pela sua importância epidemiológica como também pela difícil diferenciação de suas espécies (Lent & Jurberg, 1969; Lent & Wygodzinsky, 1979). Essa dificuldade de diferenciação foi observada inicialmente por Neiva e Pinto (1932), e posteriormente por Lent (1948) na afirmação: "Não existe gênero, entre os Triatominae que tão bem e facilmente se caracterize quanto o que Stål, em 1859, descreveu sob o nome de *Rhodnius*. Embora contenha um número reduzido de espécies, sete, segundo nosso critério, e seja bem definido como gênero, não é muito fácil a um entomologista, pouco habituado com o grupo, identificar os caracteres específicos diferenciais capazes de estabelecer uma diagnose perfeita das espécies".

Segundo Lent & Wygodzinsky (1979), as espécies deste gênero são pequenas, apresentando comprimento total entre 11-26 mm, coloração variando desde o pardo-amarelado até o negro com manchas castanhas escuras ou pardo-negras. Cabeça delgada e alongada, duas ou três vezes mais longa que a largura da cabeça, em muitos, mais longa que o pronoto. Seus tubérculos anteníferos são curtos inseridos próximo ao ápice da cabeça.

Atualmente o gênero é composto por 18 espécies: *R. amazonicus* Almeida, Santos & Sposina, 1973; *R. brethesi* Matta, 1919; *R. colombiensis* Mejia, Galvão & Jurberg, 1999; *R. dalessandroi* Carcavallo e Barreto, 1976; *R. domesticus* Neiva & Pinto, 1923; *R. ecuadoriensis* Lent & Leon, 1958; *R. milesi* Carcavallo, Rocha, Galvão & Jurberg, 2001; *R. montenegrensis*, Da Rosa *et al.*, 2012; *R. nasustus* Stål 1859; *R. neglectus* Lent, 1954; *R. neivai* Lent, 1953; *R. pallescens* Barber, 1932; *R. paraensis* Sherlock, Guitton & Miles, 1977; *R. pictipes* Stål, 1872; *R. prolixus* Stål, 1859; *R. robustus* Larrousse, 1927; *R. stali* Lent, Jurberg & Galvão, 1993 e *R. zeledoni* Jurberg, Rocha & Galvão, 2009.

A maioria das espécies são arbóreas encontradas frequentemente em ambientes silvestres, como copa de palmeiras e plantas epífitas (bromélias). Apesar de algumas espécies silvestres invadirem residências atraídas por luzes artificiais (Lent & Valderrama, 1977; Chavez & Añez, 2003; Paula *et al.* 2007), não são encontradas colônias na maioria desses ambientes, porém, espécies como *R. prolixus*, *R. domesticus* e *R. neglectus* já foram relatadas colonizando domicílios (Forattini *et al.*,1979).

Segundo Salvatella *et al.* (1998), espécies de *Rhodnius* constituem uma problemática que contribui significativamente para a epidemiologia da doença de Chagas, devido a forma de oviposição, deixando os ovos fortemente aderidos ao substrato, como

as folhas de palmeiras e pela presença de humanos invadindo o ambiente silvestre. Com a chegada da população humana nessas áreas, as folhas das palmeiras são utilizadas como matéria prima na construção de habitações, facilitando a colonização desses domicílios por *Rhodnius* e aumentando a probabilidade de infestação nesses locais (Gaunt & Miles, 2000).

A ocupação humana de áreas silvestres, que é feita por meio de queimadas e desmatamentos, leva a uma fragmentação do ambiente e também a redução da riqueza de espécies que ali poderiam ser encontradas (Vaz *et al.* 2007). Nas áreas de fragmentação que estão predominantemente constituídas por palmeiras e passam por um processo de ocupação humana, ocorre um aumento da densidade de mamíferos sinantrópicos (marsupiais do gênero *Didelphis*) devido à diminuição do número de predadores naturais e ao aumento do número de novos domicílios (Fonseca & Robinson, 1990, Abad-Franch *et al.* 2005, Gaunt & Miles 2000, Vaz *et al.* 2007). Segundo Gaunt & Miles (2000) existe uma estreita associação entre triatomíneos do gênero *Rhodnius*, marsupiais do gênero *Didelphis* e palmeiras. Nesses ambientes de áreas fragmentadas os vetores podem ser encontrados naturalmente infectados por *T. cruzi*. Esta associação estreita propicia a aproximação desses vetores ao ambiente peri e domiciliar, o que também pode ocasionalmente elevar as chances de colonização dessas áreas domiciliares, bem como o aumento de novos casos de infecção (Lima & Sarquis, 2007, Abad-Franch *et al.* 2005).

Nos últimos anos as espécies do gênero *Rhodnius* vêm ganhando destaque com relação ao seu papel na transmissão da doença de Chagas na região Amazônica, em decorrência do aumento de número de casos na região, o que pode estar relacionado à migração de pessoas infectadas, ao desmatamento desenfreado e também à transmissão oral (Coura *et al.* 2002a; 2002b; Dias *et al.* 2001; SVS/MS, 2005; Dias *et al.* 2011).

A seguir são apresentadas diagnoses e ilustrações de espécies de *Rhodnius*, baseado nas descrições de Lent & Wygodzinsky (1979).

1.3.1. *Rhodnius amazonicus* Almeida, Santos & Sposina, 1973



Figura 2. *R. amazonicus* Almeida Santos & Sposina, 1973.

Comprimento total 16,5-17mm. Coloração geral marrom amarelada, com manchas escuras dispersas. Antenas com segundo segmento amarelo na base e marrom na metade apical. Região pós-ocular amarelada com duas faixas negras da margem posterior dos olhos até a base do pescoço. Lobo posterior granuloso, com seis faixas escuras longitudinais e 1 + 1 carenas submedianas amareladas. Processo apical do escutelo amarelo no ápice. Fêmures negros, com uma discreta anelção amarelada na região mediana dos fêmures posteriores. Tíbias amareladas com um anel negro na região mediana. Conexivo amarelo com uma mancha negra triangular em cada segmento.

Distribuição geográfica: Brasil (Amazonas) e Guiana Francesa (Cacao, Saul).

1.3.2. *Rhodnius brethesi* Matta, 1919



Figura 3. *R. brethesi* Matta, 1919

Comprimento total de 19 - 20mm. Coloração geral marrom escuro a negro, com manchas claras e faixas na superfície dorsal de cabeça e pescoço, pronoto, escutelo, hemiélitro, conexivo e superfície ventral do abdômen. Pronoto negro com 1+1 faixas submedianas claras, dividido em três áreas negras. Escutelo negro com 1+1 carenas de cor castanho claro, unidas no ápice do processo escutelar. Pernas totalmente negras. Conexivo com a metade posterior de cada segmento apresentando uma mancha retangular laranja ou avermelhada. Hemiélitro marrom escuro ou negro com veias incluídas em faixas claras.

Distribuição geográfica: Brasil (Amazonas) e Venezuela (Amazonas).

1.3.3. *Rhodnius colombiensis* Mejia, Galvão & Jurberg, 1999



Figura 4. *R. colombiensis* Mejia, Galvão & Jurberg, 1999

Comprimento total de 17-20mm. Coloração geral amarelo escuro com manchas escuras em várias áreas do corpo. Tegumento coberto por cerdas douradas.

Cabeça tão longa quanto pronoto. Região antecular três vezes o comprimento da pós-ocular. Distância interocular igual à largura de um olho. Primeiro segmento da antena não atingindo o ápice da cabeça. Rostro e escutelo coberto por pequenas cerdas. Processo do escutelo longo, quase do mesmo tamanho do escutelo, rugoso na base e redondo no ápice. Pernas amarelas esfumaçadas, coxas com manchas escuras irregulares.

Tíbia com anelação negra no ápice.

Distribuição geográfica: Colombia (Tolima).

1.3.4. *Rhodnius dalessandroi* Carcavallo e Barreto, 1976



Figura 5. *R. dalessandroi* Carcavallo e Barreto, 1976

Comprimento total 17,5 -21mm. Coloração geral castanho escuro quase negro com áreas castanho avermelhado claro e amarelo pálido. Cabeça com linha longitudinal castanho avermelhada, nitidamente mais comprida que o pronoto. Distância interocular igual a distância entre os ocelos. Pronoto com bordo arredondado, ângulos anteriores bem marcados. Carenas longitudinais castanhas avermelhadas (1 + 1) sobressalentes. Pilosidade curta e abundante exceto nas três áreas do lobo anterior. Escutelo de aspecto genérico. Pernas uniformemente castanhas escuras exceto o ápice das coxas. Tíbias e tarsos de característica genérica. Hemiélitros ultrapassando ligeiramente o bordo posterior do abdômen. Abdômen de cor uniforme com linha central mais escura. Conexivo com uma mancha de forma irregular clara avermelhada, amarelado ou acinzentada no extremo posterior de cada segmento, mais extensa no bordo.

1.3.5. *Rhodnius domesticus* Neiva & Pinto, 1923



Figura 6. *R. domesticus* Neiva & Pinto, 1923

Comprimento total 15-18mm. Coloração geral marrom alaranjado com manchas mais escuras em várias áreas do corpo e apêndices. Cabeça escura com a região dorsal mais clara longitudinalmente, cerca de duas vezes e meio mais longa que larga, ao nível dos olhos, e tão longa ou ligeiramente mais longa que o pronoto. Ângulos anterolaterais não proeminentes. Escutelo negro com 1+1 carenas claras. Hemiélitro cor de palha com cório marrom avermelhado e membrana fracamente pigmentada. Tíbias castanhas com anelação apical escura. Conexivo com segmentos dorsais com mancha marrom avermelhada na metade anterior.

Distribuição geográfica: Brasil (Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Santa Catarina, São Paulo).

1.3.6. *Rhodnius ecuadoriensis* Lent & Leon, 1958



Comprimento total 12.5-14.5mm. Coloração geral marrom clara com marcas escuras, em forma de listras ou pequenas manchas irregulares, no corpo e apêndices. Cabeça granulosa duas vezes mais longa do que larga. Pronoto com carena submediana amarela e ângulos anterolaterais não proeminentes. Escutelo com 2+2 carenas anteriores distintas. Conexivo dorsal com leve mancha escura no terço anterior do segmento.

Distribuição geográfica: Equador (Manabi, Guayas, Loja) e Peru (Amazonas, Tumbes, Piura, Cajamarca, La Libertad, Lambayeque, San Martin)

Figura 7. *R. ecuadoriensis* Lent & Leon, 1958

1.3.7. *Rhodnius milesi* Carcavallo, Rocha, Galvão & Jurberg, 2001



Comprimento total 19,5-20mm. Coloração geral marrom escuro, com as seguintes áreas claras ou amareladas: a região central longitudinal da cabeça com duas bandas laterais pós-oculares, os bordos externos e as carenas paramedianas do pronoto.

Região interocular com a mesma largura de um olho em vista dorsal. Tubérculo antenal com um denticulo apical. Pronoto apresentando ângulos anterolaterais pouco salientes sem tubérculos disciais, bordos laterais amarelos, duas faixas paramedianas amarelas terminando no bordo, seguindo para o escutelo. Pernas com coxas amarelas, fêmures sem espinhos nem tubérculos

Figura 8. *R. milesi* Rocha, Galvão & Jurberg, 2001

subapicais.

Distribuição geográfica: Brasil (Pará).

1.3.8. *Rhodnius montenegrensis* Da Rosa *et al.*, 2012



Coloração geral amarela com listras longitudinais negras no pronoto, asas e conexivo. Cabeça sem manchas do clipeo ao pescoço, com uma faixa amarela central localizada entre duas (1+1) faixas continua de cor marrom. Pernas amarelas, exceto a tibia posterior com uma listra negra próxima ao tarso. Conexivo dorsal com mancha escura ocupando 1/3 de cada segmento. Bordos internos e externos, do conexivo, com uma faixa amarela descontinua.

Distribuição geográfica: Brasil (Rondônia).

Figura 9. *R. montenegrensis*.
(Foto: Da Rosa *et al.* 2012)

1.3.9. *Rhodnius nasutus* Stål 1859



Figura 10. *R. nasutus* Stål 1859

Comprimento total 12,5 - 18mm. Coloração geral marrom amarelado, ligeiramente alaranjado, com manchas marrom escuro em algumas áreas do corpo e apêndices. Cabeça duas vezes e meia mais longa que larga ao nível dos olhos, distintamente mais longa que o pronoto. Antenas de coloração marrom avermelhada. Pronoto com lobo posterior granuloso e rugoso, com área entre as carenas submedianas escura, fracamente subdivididas por uma faixa. Ângulos anterolaterais do pronoto angulosos. Escutelo escuro com 1+ 1 carenas claras bifurcadas anteriormente e fusionadas

posteriormente. Hemiélitro marrom avermelhado com veias amarelo palha. Pernas uniformemente marrons avermelhadas e finas, fêmures anteriores seis vezes mais longos que largos. Abdômen marrom amarelado, quase sem manchas. Conexivo com manchas não muito nítidas na região anterolateral de cada segmento.

Distribuição geográfica: Brasil (Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte).

1.3.10. *Rhodnius neglectus* Lent, 1954



Figura 11.R. *neglectus*
Lent, 1954

Comprimento total de 17,5 - 20,5mm. Coloração geral marrom claro com marcas marrom escuro na cabeça, pronoto, escutelo, cório e conexivo. Áreas amareladas ventralmente no abdômen, no conexivo, nas coxas e trocânteres. Cabeça distintamente mais longa que o pronoto. Primeiro e segundo artículos antenais negros, terceiro negro na base e claro na metade apical, quarto escuro na base e no quarto apical. Lobo posterior do pronoto rugoso-granuloso, carena submediana amarelada, margens laterais marrom amarelado claro. Ângulos anterolaterais proeminentes. Escutelo com 2+2 carenas curtas fundidas em 1+1 carenas ao nível do terço anterior do escutelo e em uma única carena posteriormente. Hemiélitro marrom escuro com veias claras. Coxas, trocânteres e anel basal das tíbias amarelados. Conexivo ventral estreitamente visível, dorsalmente com a metade ou os dois terços anteriores marrom, o resto amarelado.

Distribuição geográfica: Brasil (Bahia, Distrito Federal, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, mato grosso do Sul, Minas Gerais, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Piauí, São Paulo, Tocantins)

1.3.11. *Rhodnius neivai* Lent, 1953



Figura 12. *R. neivai*
Lent, 1953

Comprimento total 17-21mm. Coloração geral marrom escura ou negra. Rostro, antenas e superfície dorsal do abdômen marrom avermelhada. Mancha de forma irregular no angulo posterolateral do segundo até o quinto ou sexto segmento do conexivo. Hemiélitro consideravelmente curto não atingindo o ápice do sétimo urotergito. Pernas uniformemente negras com fêmures delgados. Abdômen com conexivos pouco visíveis em vista ventral.

Distribuição geográfica: Colômbia (César) e Venezuela (Lara, Falcón, Zulía)

1.3.12. *Rhodnius pallescens* Barber, 1932



Figura 13. *R. pallescens*
Barber, 1932

Comprimento total 21.5-23.5mm. Coloração geral castanho amarelado com manchas marrom escuras. Cabeça mais clara dorsalmente. Antenas com o segundo articulo negro no terço apical ou na metade, em alguns espécimes o terceiro articulo escuro na base. Pronoto com o lobo anterior ligeiramente granuloso, manchas irregulares escuras; lobo posterior rugoso e granuloso com aspecto geral manchado. Pernas com fêmures e tíbias delgadas irregularmente sarapintadas. Conexivo castanho amarelado com mancha retangular na metade anterior de cada segmento.

Distribuição geográfica: Belize, Colômbia (Bolívar, Sucre), Costa Rica e Panamá.

1.3.13. *Rhodnius paraensis* Sherlock, Guitton & Miles, 1977



Figura 14. *R. paraensis* Sherlock, Guitton & Miles, 1977

Comprimento total de 10,5 – 12mm. Coloração geral marrom claro com várias manchas marrom escuro no corpo e apêndices. Hemiélitro quase totalmente negro. Cabeça granulosa de cor geral castanho claro, anteclypeo, genas, tubérculos anteníferos e tubérculos ocelares castanho escuro, quase negro. Pescoço negro, castanho amarelado no centro e lateralmente. Pronoto castanho escuro com margens laterais claras e lobo posterior distintamente rugoso. Ângulos anterolaterais pouco destacados. Escutelo com 1+1 carenas claras fusionadas posteriormente em uma

única carena. Pernas curtas e robustas, castanho-amareladas, coxas com anel basal, fêmures com anel apical.

Abdômen castanho amarelado em vista ventral, com manchas negras irregulares. Conexivo dorsal e ventral castanho escuro nos três quintos anteriores, contrastando com os dois quintos posteriores amarelados.

Distribuição geográfica: Brasil (Pará)

1.3.14. *Rhodnius pictipes* Stål, 1872



Figura 15. *R. pictipes* Stål, 1872.

Comprimento total de 18 -22mm. Coloração geral castanho amarelado com manchas castanho escuro em várias regiões do corpo, apêndices com aspecto geral sarapintado. Região antecular cerca de três vezes mais longa que a pós-ocular. Pronoto com lobo posterior granuloso-rugoso; castanho escuro ou negro com granulações mais claras e aspecto geral mosqueado. 1+1 carenas submedianas e bordos laterais amarelados. Escutelo com 2+2 carenas claras que se fundem em 1+1 na porção central do escutelo e numa única carena

posteriormente. Hemiélitro de coloração amarelo-palha; cório com numerosas manchas negras irregulares. Pernas amareladas, coxas, trocânteres e fêmures manchados de castanho escuro criando um aspecto sarapintado. Tíbias amareladas, terço basal e ápice com anelacão castanho escuro. Conexivo dorsal amarelo com metade anterior de cada segmento formando uma mancha retangular escura em forma de uma ponta aguçada.

Distribuição geográfica: Belize, Brasil (Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Piauí, Roraima, Tocantins), Colômbia (Meta, Putumayo), Equador (Azuay), Guiana, Guiana Francesa, Peru (Loretto, Cusco, San Martin), Suriname, Trinidad, Venezuela (Anzoatec, Apure, Aragua, Bolivar, Carabobo, Cojedes, Falcón, Mérida, Miranda, Monagas, Portuguesa, Tachira, Trujillo, Sucre, Yaracuy, Zulia, Delta, Amacuro).

1.3.15. *Rhodnius prolixus* Stål, 1859



Figura 16. *R. prolixus* Stål, 1859.

Comprimento total 17.5-21.5mm. Coloração geral castanho amarelado claro, com marcas marrom escura em varias regiões do corpo e apêndices. Cabeça castanho amarelada, granulosa nas laterais, listra dorsal estreita, de cor clara, do clipeo até o pescoço. Pronoto com carena submediana e margens laterais castanho amareladas clara. Ângulos anterolaterais não muito proeminentes. Escutelo com 1+1 carenas castanho amareladas, mais lardas anteriormente e fusionada na base do processo do escutelo.

Pernas uniformemente castanhas; fêmures em alguns casos e delgada. Superfície ventral do abdômen mais escuro em determinadas áreas; tíbia mais uniformemente marrom escuros, em alguns indivíduos amarelados com marcas escuras, como em *robustus*. Conexivo com segmentos castanhos amarelados, cada um com mancha marrom escura prolongada para trás na área anterolateral.

Distribuição geográfica: Bolivia (Santa Cruz), Colômbia (Antioquia, Arauca, Bayaca, Caquetá, Cesanre, César, Cundinamarca, Guajira, Huila, Magdalena, Meta,

Norte Santander, Putumayo,, Santander, Tolima, Vichada), Costa Rica, El Salvador, Equador (esmeraldas, Manabi, Napo, Zamora-Chinchipe), Guatemala, Guiana, Guiana Francesa, Honduras, México (Oaxaca, Chiapas), Nicarágua, Panamá, Suriname, Trinidad e Venezuela (todos os estados).

1.3.16. *Rhodnius robustus* Larrousse, 1927



Figura 17.R. *robustus*
Larrousse, 1927 .

Comprimento 20-26mm. Coloração geral castanho amarelado com manchas castanho escuro em várias regiões do corpo e apêndices. Cabeça cerca de duas vezes e meia mais longa que larga ao nível dos olhos e distintamente mais longa que o pronoto. Pronoto com as carenas submedianas e as margens laterais castanho claro. Lobo posterior com áreas escuras entre as carenas; carenas e margens laterais distintamente separadas por faixas amareladas. Ângulos anterolaterais pouco proeminentes (menos proeminentes que em *R. prolixus*). Escutelo com 1+1 carenas amareladas fusionadas posteriormente na base do processo apical. Hemiélitro castanho com veias muito nítidas. Pernas com coxas e

trocânteres parcialmente ou inteiramente escuros; fêmures castanho avermelhado, tíbias de cor idêntica ou castanho amarelado escuro no ápice. Conexivo dorsal castanho amarelado, cada segmento com a mancha escura ocupando ao menos a metade anterior de cada segmento, com uma projeção pontuda posterior.

Distribuição geográfica: Bolívia (Pandos, Santa Cruz, Brasil (Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins), Colômbia (Santander, Norte Santander), Equador (Napo), Guiana Francesa, Peru (Amazonas, Cajamarca, Loretto, Madre de Dios, San Martin) e Venezuela (Mérida, Falcón, Táchira, Cojedes, Apure, Barinas, Bolívar, Monagas, Sucre, Trujillo, Yaracuy).

1.3.17. *Rhodnius stali* Lent, Jurberg & Galvão, 1993



Figura 18. *R. stali* Lent, Jurberg & Galvão, 1993.

Comprimento 15-19mm. Coloração geral pardo amarelada, com manchas castanho escuro em várias regiões do corpo, causando um aspecto sarapintado. Cabeça igual ou ligeiramente mais longa que o pronoto. Pronoto com o lobo anterior ocupando a terça parte do tamanho total, separado do lobo posterior por um sulco pouco evidente. Bordos laterais amarelados. Lobo posterior pardo negro com aspecto levemente sarapintado. Escutelo rugoso, pardo negro. Hemiélitro de coloração palha, quase atingindo a extremidade do abdômen com veias pouco destacadas. Conexivo dorsal amarelo apresentando na metade anterior de cada segmento, uma

mancha quadrangular pardo negra, de cuja região central sai uma forte projeção. Pernas amareladas, salpicadas de pardo negro, nas coxas, trocânteres, e principalmente fêmures. Tíbias com duas anelações negras, uma na base do terço mediano e outra no ápice.

Distribuição geográfica: Bolívia (Alto Beni, Chapare, La Paz, Santa Cruz, Pando) e Brasil (Mato Grosso)

1.3.18. *Rhodnius zeledoni* Jurberg, Rocha & Galvão, 2009

Comprimento total 13mm. Coloração geral castanho claro, com áreas castanhas escuras. Cabeça castanha clara. Pronoto castanho escuro circundado por uma faixa alaranjada, com 2 + 2 carenas laterais castanho claro alaranjado, carena mediana clara. Ângulo anterolateral inaparente. Escutelo triangular, castanho alaranjado nas carenas que o delimitam com 2 + 2 depressões. Processo do escutelo com ápice arredondado. Hemiélitros castanho alaranjado, com nervuras mais claras; base do cório e o clavo castanho escuros. Pernas castanho escuro, trocânteres, tíbias e tarsos do 3º par castanho claro com exceção de anel apical escuro.

Distribuição geográfica: Brasil (Sergipe).

1.4. Análise molecular aplicada aos triatomíneos

Com o advento da reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction – PCR*), descrito por Kleppe *et al.* (1971) e aprimorado por Kary Mullis em 1983, os métodos baseados em DNA permitiram que as análises moleculares se tornassem fundamentais para o avanço dos estudos de taxonomia e filogenia de triatomíneos. O uso de marcadores moleculares, em triatomíneos, apareceu como uma ferramenta informativa que procura esclarecer tanto questões de sistemática e evolução, e tenta auxiliar à investigação de problemas referentes ao impedimento taxonômico, como a identificação de espécies crípticas (Ward *et al.* 2009; Mas-Coma & Bargues, 2009; Abad-Franch & Monteiro, 2005; Monteiro *et al.* 2001, Bargues *et al.* 2002, Barret, 1988).

Abad-Franch e Monteiro (2005) descreveram o uso das diferentes técnicas disponíveis para a detecção do polimorfismo do DNA em triatomíneos, como:

- a. PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) – digestão de fragmentos de DNA por enzimas de restrição.
- b. RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*) – amplificação aleatória de diferentes regiões do genoma
- c. Microssatélites
- d. Sequenciamento de DNA (nuclear e mitocondrial).

O sequenciamento de DNA vem sendo amplamente utilizado para identificação de triatomíneos, pois gera informações em cada nucleotídeo de um determinado fragmento genômico, fornecendo dados para determinação das relações de parentesco e inferências filogenéticas (Monteiro *et al.* 2009, Abad-Franch & Monteiro, 2005).

1.5. Identificação molecular e código de barras de DNA

Mitocôndrias são organelas eucarióticas citoplasmáticas envolvidas nos processos responsáveis pela síntese de proteínas e respiração celular. Cada mitocôndria possui uma única molécula de DNA, o DNA mitocondrial (DNAm). Esse DNA circular haplóide é pequeno, sua estrutura é simples (comparada ao genoma nuclear), de herança materna, está presente em cópias múltiplas nas células, possui 37 genes e 17 kpb, evolui de forma mais rápida e seu tamanho corresponde somente a 0,0001% do comprimento total do DNA nuclear (Avisé, 1994).

Nos últimos anos, a ampla utilidade das sequências de DNA mitocondrial (mtDNA) pode ser observada no aumento do número de trabalhos utilizando diferentes regiões deste como marcadores moleculares. Diferentes marcadores, tais como 12S, 16S, Citocromo oxidase subunidade I (COI) e Citocromo b (CytB), vêm sendo amplamente empregados na identificação, estudos de genética de população e filogenia de triatomíneos (Hajibabaei *et al.* 2007). Segundo Hurst *et al.* 2009, a escolha desse gene está bem relacionada com o fato de o mtDNA aparecer bem conservado, em múltiplas cópias em cada célula, não possuir introns e suas regiões intergênicas são bem pequenas, no entanto é necessário cuidado pois como sua taxa de mutação é alta, em alguns casos indivíduos da mesma espécie podem apresentar divergências maiores que o esperado em suas sequências. Segundo Zwang & Hewitt (1996b) ainda não se conhece totalmente as vantagens e desvantagens da escolha do mtDNA em estudos de filogenia, mas é preciso observar que a presença de pseudogenes pode ser desvantajosa.

Hebert *et al.* (2003) propuseram uma metodologia baseada na variação de sequências do gene mitocondrial Citocromo oxidase subunidade I (COI), a fim de promover um sistema de identificação taxonômica universal mais rápido, eficiente e de livre acesso, chamado de Código de Barras de DNA ou *DNA Barcoding*. Esta abordagem é baseada em uma metodologia molecular padronizada e tem como objetivo promover um sistema único de identificação molecular de todos os seres eucarióticos. Todas as espécies inseridas nesse sistema devem apresentar um código de barras de DNA único onde a variação interespecífica é mais elevada que a intraespecífica (Miller, 2007; Hebert *et al.* 2003; Hebert & Gregory, 2005). A proposta do código de barras de DNA se baseia na utilização de COI como marcador de referência, pois seus iniciadores universais são bem estabelecidos, permitindo a amplificação do DNA dessa região numa enorme variedade de organismos. Além disso, o gene parece possuir um sinal filogenético ideal para a abordagem código de barras, uma vez que em cerca de 95% dos casos observados, a variação intraespecífica não sobrepõe a variação interespecífica (Hebert *et al.*, 2003).

1.6. Projeto BR-BOL

O projeto “Identificação Molecular de Parasitos e Vetores” faz parte do consórcio brasileiro de identificação molecular da biodiversidade (“Rede de Pesquisa de Identificação Molecular da Biodiversidade Brasileira” – BR-BOL - *Brazilian Barcode of Life* - <http://www.brbol.org/>). O objetivo deste projeto é contribuir para o avanço do conhecimento em saúde pública, através da democratização dos meios de identificação taxonômica de vetores e parasitas (de forma integrada através de um portal de dados públicos), visando à melhoria da saúde humana.

Mais de 13 instituições estão envolvidas na coleta de espécies, no sequenciamento do código de barras, no processamento de dados locais e na integração das informações ao BOLD (*Barcode of Life*; do inglês, código de barras da vida). O BOLD é uma plataforma de bioinformática para armazenamento, análise, gestão e publicação de registros de código de barras de DNA de organismos (Ratnasingham e Hebert, 2007).

O principal objetivo desta metodologia não é determinar a classificação de novos organismos, e sim criar um banco de dados através da identificação molecular das espécies existentes nas coleções de referência, com a finalidade de auxiliar na identificação das amostras desconhecidas.

2 JUSTIFICATIVA

Segundo Jinbo *et al.* 2011 “A identificação de espécies é uma parte fundamental para reconhecimento e descrição da biodiversidade”. Tradicionalmente esta identificação é feita por taxonomistas, baseado na diagnose morfológica.

Com a descoberta da doença de Chagas, a classificação e caracterização das espécies da subfamília Triatominae, que antes era feita somente por descrições simples e breves de caracteres morfológicos e cromáticos, ganhou importância a partir de 1910, com trabalhos publicados por Neiva (1923), Lent & Wygodzinsky (1979) e Carcavallo *et al.* (1998). Nestes trabalhos foram feitas revisões detalhadas e chaves dicotômicas baseadas em caracteres morfológicos de identificação mais elaborados. No entanto, apesar dos esforços, algumas espécies não apresentam caracteres suficientes para fácil diagnose. Alguns trabalhos utilizaram abordagens baseadas no estudo de estruturas fálicas, na análise do exocório de ovos, na descrição de ninfas, em microscopia eletrônica de diferentes regiões do corpo, na morfologia de glândulas salivares, em morfometria, em análises isoenzimáticas, na citogenética e, mais recentemente, em análises de DNA.

O gênero *Rhodnius* é o segundo gênero mais diverso da subfamília Triatominae. É um dos mais estudados não só pela importância epidemiológica das suas espécies, mas também em função da difícil diferenciação das mesmas (Galvão *et al.* 2003). Existe uma enorme similaridade morfológica entre algumas espécies, o que dificulta sua identificação através do uso de chaves dicotômicas convencionais, tanto para agentes de saúde, envolvidos no controle desses vetores, como até mesmo para taxonomistas treinados. Essa dificuldade na identificação se deve ao fato de que existem diversas espécies crípticas nesse gênero. Na região amazônica existe o complexo *R. robustus* de espécies crípticas (formado por *R. robustus* I, II, III e IV) morfológicamente idênticas a *R. prolixus* (Monteiro *et al.* 2003, Pavan & Monteiro 2007), que junto com *R. neglectus* e *R. nasustus* formam o 'grupo prolixus' (Barret, 1988). Outro grupo conhecido é o 'grupo pictipes' composto por *R. pictipes*, *R. stali*, *R. amazonicus* e *R. paraensis*. Neste grupo, *R. stali* foi descrito a partir de espécimes anteriormente identificadas como *R. pictipes*, demonstrando sua grande semelhança morfológica (Lent *et al.* 1993).

A correta identificação de espécies crípticas é necessária, pois espécies com características morfológicas semelhantes podem apresentar capacidades vetoriais distintas (Pavan & Monteiro 2007). Um exemplo disso é o fato de que até 2007 os

técnicos do Programa Nacional de Chagas da Bolívia identificavam espécimes de *R. stali*, que é capaz de colonizar casas, mas não parece ser um bom vetor (Marcilla *et al.*, 2002) como sendo *R. pictipes*, uma espécie estritamente silvestre da Amazônia brasileira (Justi, comunicação pessoal).

Entretanto o número de taxonomista e técnicos especialistas em identificação de triatomíneos tem diminuído muito no decorrer destes anos. A disponibilidade de descrições mais apuradas e diagnoses detalhadas não tem solucionado o problema de diferenciação das espécies crípticas, mesmo com entendimento das chaves dicotômicas por parte dos agentes envolvidos no controle desta endemia, ainda percebe-se uma grande dificuldade na diferenciação de grupos mais complexos. Com isso, métodos alternativos para auxiliar estes profissionais e demais interessados vêm sendo desenvolvidos para que a identificação apurada desses vetores seja possível.

Diversas técnicas moleculares vêm sendo utilizadas na tentativa de solucionar questões taxonômicas consequentes das semelhanças morfológicas entre espécies diferentes. Hebert *et al.* (2003) propuseram o desenvolvimento do código de barras de DNA, um sistema universal para identificação de todos os seres eucarióticos com base em uma abordagem padronizada de sequenciamento do marcador mitocondrial COI, objetivando agilizar a identificação de organismos. Esta abordagem auxilia na identificação de espécies (sobretudo as crípticas), permite o mapeamento da biodiversidade, funcionando como mais uma ferramenta para taxonomistas na identificação de novas espécies, e permitindo que qualquer pessoa habilitada, em qualquer lugar, a qualquer momento, possa identificar rápida e eficientemente a espécie um determinado espécime. A expectativa é de que, no futuro, essa eficiência se estenda a espécimes em condições de preservação ruins, como exemplares de coleção. É importante salientar a importância das coleções biológicas, pois estas são o centro depositário de material biológico e tem como função primordial o registro da biodiversidade. (Marinoni *et al.* 2005).

Este sistema é também um veículo para a colaboração e troca de informações entre grupos de pesquisa do mundo todo, pois esta técnica está integrada a uma plataforma de bioinformática desenvolvida para a rápida compilação dos dados de código de barras o *Barcode of Life data System (BOLD)* ou Sistema de Código de Barras da Vida que agrega os dados de coleta, identificação e sequências de DNA dos espécimes identificados através dessa metodologia.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Confirmar a identidade taxonômica de espécimes do gênero *Rhodnius*, por meio da taxonomia clássica e do código de barras de DNA.

3.2. Objetivos Específicos

- Otimizar protocolos de extração de DNA de espécimes depositados em coleção, conservados em naftalina e paraformaldeído.
- Testar a eficácia do gene mitocondrial COI como código de barras para o gênero *Rhodnius*.
- Confirmar ou invalidar as sinonímias *R. brumpti* (*R. nasutus*), *R. dunni* (*R. pallescens*) e *R. pratai* (*R. neglectus*).
- Identificar possíveis espécies novas ou complexos de espécies.
- Iniciar o banco de dados de referência, para espécies de *Rhodnius*, no BOLD.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção das amostras

As amostras de 15 espécies de *Rhodnius* utilizadas neste estudo foram provenientes do Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos, do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz (LNIRTT), Rio de Janeiro. As amostras foram separadas em três diferentes grupos: i) triatomíneos depositados nas Coleções Entomológicas Herman Lent e Rodolfo Carcavallo (CTIOC- Coleção de Triatomíneos do IOC) (Tabela 1), ii) insetos frescos: provenientes de campo e de colônias do LNIRTT e iii) preservados em álcool: provenientes de colônias do LNIRTT ou de campo (Tabela 2).

Espécimes de *R. amazonicus* não estavam disponíveis nem na coleção entomológica, nem nas colônias do LNIRTT. Como não foi possível obter amostras de campo, foi utilizado para essa espécie, DNA previamente extraído e preservado no banco de DNA do Laboratório de Epidemiologia e Sistemática Molecular do Instituto Oswaldo Cruz.

Todos os espécimes utilizados foram identificados, ou tiveram sua identificação confirmada, por meio da chave dicotômica proposta por Lent & Wygodzinsky (1979), no caso das espécies publicadas após 1979, a identificação foi conferida utilizando o trabalho onde são apresentadas as descrições dos holótipos.

4.2. Extração de DNA

A extração do DNA foi feita através de dois métodos distintos: (a) kits DNA IQ system 100 Reactions (Promega) e Genomic DNA Extraction Kit (RBC), seguindo as recomendações dos fabricantes para o isolamento do material genético de tecido animal; (b) através de extração não invasiva.

Para a extração de material proveniente de coleção, devido ao seu valor histórico e científico, foi utilizado um processo de extração não invasiva seguindo o protocolo descrito por Gilbert *et al.* (2007). Os insetos foram acondicionados em tubos plásticos de 1,5 ml e totalmente submersos em uma solução com um tampão de digestão contendo 3 mM Cloreto de Cálcio (CaCl_2), 2% Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), 40 mM Dithiothreitol

(DTT), 250 µg/mL Proteinase K, 100 mM Tris(hidroximetil)aminometano (Tris tampão) pH 8,0 e 100 mM Cloreto de Sódio (NaCl). Os exemplares foram deixados nessa solução por 16 h a 55° C. Após esse período, os espécimes foram removidos do buffer e colocado em etanol 100% por 4 h para interromper o processo de digestão e posteriormente ser devolvido a coleção.

Para melhorar a qualidade do DNA das amostras extraídas por imersão, foi utilizado um protocolo de polimerização reconstrutiva adaptado de Golenberg *et al.*(1996). Nesta reação é utilizado o seguinte tampão: 3,7 mM de Cloreto de Magnésio (MgCl₂), 0,3 uM de dNTP, 1,5 u de Taq, 10-60 ng DNA (concentração final de 4 ng/uL), sem adição de iniciadores. Este tampão adicionado do DNA extraído do material de coleção foi submetido ao seguinte ciclo de temperatura 94°C (por 1 min), seguido de 35 ciclos a 92°C (por 30 segundos), 52°C (por 45 segundos), e 72°C (por 90 segundos), e uma extensão final de 20 min a 72°C em um termociclador Veriti Thermal Cyclers da Applied Biosystems (Anexo 1).

A mesma reação também foi testada com três diferentes facilitadores de PCR: Albumina Soro Bovino (BSA), Trehalose 10% e Dimetil Sulfóxido (DMSO). Essa reconstrução foi utilizada para recuperar a integridade do DNA degradado aumentando o número de pares de bases desses fragmentos proveniente de insetos com data de depósito muito antiga (Anexo 2).

Posteriormente os produtos da extração foram purificados com fenol:clorofórmio (1:1), misturado gentilmente por 30 segundo e centrifugado por 1 minuto (este passo foi repetido 4 vezes) e clorofórmio (1:1). Em seguida para precipitação adicionou-se à amostra 20µg de Glicogênio, Isopropanol 100% (0,6:1) e Acetato de Sódio 3M (0,1:1). Os tubos foram centrifugados por 25 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi lavado com etanol 85% gelado por duas vezes. Foram novamente centrifugados por 2 minutos e postos para secar a 65°C. As amostras foram ressuspensas em 20 µl de água MilliQ estéril. É importante observar que todas as centrifugações foram feitas a 14000 rpm.

4.3. PCR e Iniciadores (*Primers*)

A identificação molecular foi feita a partir da amplificação por PCR de fragmentos do gene mitocondrial COI. Para amplificação desse marcador foram testadas diferentes combinações de iniciadores:

- a) LCO-1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') e HCO-2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3') – 658pb (posição no gene 1404-2088) (Folmer *et al.* 1994).
- b) LCO-1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') e a fita reversa LepR (5'-TAAACTTCTGGATGTCCAAAAATCA-3') – 658pb (Hebert *et al.* 2004), (posição no gene 1404-2088) utilizando o protocolo adaptado de Folmer *et al.* (1994).
- c) LCO-1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') e a fita reversa LepR2 (5'-CCTGTTCCAGCTCCATTTTC-3') – 250pb (posição no gene 1404-1737) (Hajibabaei *et al.* 2006).
- d) LCO 1490 – L (5'-GGTCWACWAATCATAAAGATATTGG-3') (Nelson *et al.* 2007) e LepR2 (5'-CCTGTTCCAGCTCCATTTTC-3') – 250pb (posição no gene 1404-1737) (Hajibabaei *et al.* 2006).
- e) ShortF (5'-CAATTTCCAAATCCNCCAAT) e ShortR (5' - GGTCAACAAATCATAAAGATATTGGAA) – 220pb (Gilbert *et al.* 2007).

As reações foram feitas em um termociclador Veriti Thermal Cycler da Applied Biosystems, programado para a seguinte ciclagem: desnaturação a 94 C (por 3 min), seguido de 35 ciclos a 94 C (por 1 min), 45 C (por 1 min), e 72 C (por 1 min), e uma extensão final de 10 min a 72 C. Os produtos das reações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1%). A purificação dos produtos amplificados foi feita com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System da Promega conforme as recomendações do fabricante (Anexo 3).

Com objetivo de comprovar a eficácia dos iniciadores utilizados e o poder discriminatório do COI dentro da subfamília Triatominae, utilizamos amostras de outros g neros da subfamília, sendo as espécies: *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) (adulto colônia); *T. rubrovaria* (Blanchard, 1843) (adulto campo); *T. carvalhoi* Jurberg,

Rocha & Lent, 1998 (adulto campo); *T. circummaculata* (Stål, 1859) (adulto campo); *T. lecticularia* (Stål, 1859) (adulto colônia); *T. protracta* (Uhler, 189) (adulto colônia); *Psammolestes tertius* (Lent & Jurberg, 1965) (adulto preservado em álcool) 13 ninfas de *Triatoma* não identificadas, provenientes de coleta de campo realizadas em Santa Maria – Rio Grande do Sul; 92 adultos de *Triatoma* identificados como uma possível nova espécie, coletados em Santa Maria – Rio Grande do Sul (Tabela 3).

4.4. Reação de Sequenciamento e Precipitação do DNA

As reações de sequenciamento foram realizadas, com os produtos de PCR purificados, em ambas as fitas (senso e anti-senso) utilizando o kit *ABI Prism® Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystem) e os mesmos iniciadores das reações de PCR. As reações foram feitas em um termociclador Veriti Thermal Cycler da Applied Biosystems com 30 ciclos de 96°C (por 10 seg), 50°C (por 5 seg) e 60° (por 4min).

Os produtos da reação de sequenciamento foram purificados para a remoção de di-deoxinucleotídeos excedentes através da precipitação com acetato de sódio-EDTA 0,8M, álcool 95% e 70%, e analisados no sequenciador ABI 3730 na plataforma PDTIS/Fiocruz.

4.5. Edição e alinhamento

Todas as sequências obtidas tiveram sua qualidade avaliada pelo eletroferograma e a edição das fitas senso e anti-senso foi realizada utilizando os programas *SeqMan Lasergene versão 7.0* (DNASStar Inc.) e *Mega versão 4.0* (Tamura *et al.*, 2011). Durante a edição, para geração da fita consenso de cada indivíduo, os sítios polimórficos foram conferidos para que possíveis erros gerados pelo sequenciador fossem consertados. Também foram retirados os fragmentos de iniciadores a fim de se obter apenas a região de interesse. As sequências foram alinhadas utilizando o algoritmo ClustalW, disponível no programa *Mega versão 4.0* (Tamura *et al.* 2011). Foram utilizados, para os alinhamentos, parâmetros predefinidos de gaps nos programas.

4.6. Identificação molecular

O conjunto de sequências de cada espécie foi submetido à análise filogenética visando verificar a utilidade do marcador molecular COI como código de barras, conforme o proposto por Hebert *et al.* (2003). A identificação das sequências, mais semelhantes, foi feita através da comparação dos dados obtidos com os disponíveis no *Genbank* (Blast search) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e também no banco de dados do *Barcode of Life* (BOLD - <http://www.boldsystems.org/>).

Duas diferentes metodologias foram utilizadas para a reconstrução filogenética:

a) Neighbor-Joining (NJ) (Saitou & Nei, 1987) – “este método faz parte do grupo de métodos de evolução mínima, no qual se estima a árvore com a menor soma total de ramos.” (Miyaki *et al.* 2012). Entretanto, dependendo do número de sequências e da divergência entre elas, esta metodologia pode tender a recuperar topologias incorretas (Nei & Kumar, 2000). Para esta abordagem foi utilizado o programa Mega 5.0 (Tamura *et al.* 2011).

b) Máxima Verossimilhança (MV) (Felsenstein, 1981) – estima a probabilidade condicional (verossimilhança), com base em um determinado modelo evolutivo, de um conjunto de dados corresponderem a um processo que verdadeiramente ocorreu (Miyaki *et al.* 2012). Dois diferentes programas foram utilizados para a reconstrução com base nessa metodologia: Mega 5.0 (Tamura *et al.* 2011) e PhyML (Guindon *et al.* 2010).

Para todas as reconstruções o modelo de substituição nucleotídica utilizado foi o Kimura 2-parâmetros (Kimura 1980), uma vez que a distância Jukes-Cantor par-a-par calculada foi, em geral, menor do que 1 (Nei & Kumar 2000). Sendo assim, não há necessidade de correção para substituições múltiplas e utilização de modelos mais complexos. Além disso, a confiabilidade dos clados foi estimada a partir de 1000 réplicas de bootstrap (Felsenstein 1985), para cada uma das topologias reconstruídas.

5 RESULTADOS

5.1. Identificação morfológica e molecular dos espécimes

Os 187 espécimes utilizados foram identificados, ou tiveram sua identificação confirmada, por meio da chave dicotômica proposta por Lent & Wygodzinsky (1979).

Seguindo a proposta de Hebert *et al.* (2003) para a identificação molecular pelo método do código de barras de DNA, todos os indivíduos tiveram seus DNAs extraídos e o fragmento do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade I (COI) submetido a reação de PCR para amplificação. Entretanto, muitas amostras provenientes de coleção não apresentaram resultados positivos na amplificação e por isso não puderam ser incluídas nas análises moleculares (Tabela 4).

Foi possível chegar à etapa do sequenciamento para 130 (69,5%) dos 187 espécimes incluídos no trabalho. A partir daí foram obtidas 112 sequências com mais de 250 pares de bases (pb), sendo 65 de *Rhodnius* e 47 amostras paralelas.

As sequências de *Rhodnius* foram comparadas com aquelas depositadas no *GenBank*, através da ferramenta de busca *Blast Search*. Em uma etapa posterior, estas sequências serviram como base para reconstrução da filogenia do gênero, objetivando a identificação das espécies.

Como ferramenta de comparação, foram utilizados dados não publicados do banco de dados do Laboratório de Sistemática Bioquímica (IOC), que contém sequências de Cyt b; outro marcador mitocondrial que parece resolver muito bem as relações entre espécies de *Rhodnius*. Além disso, os resultados foram comparados com aqueles publicados por Hypsa *et al.* (2002) e Paula *et al.* (2005).

5.2. Análise das Sequências: diversidade e filogenia

Das 65 sequências de *Rhodnius* obtidas, a qualidade dos eletroferogramas de 26 delas estava muito baixa apresentando muito ruído, picos duplos ou em alguns casos estes apareciam incompletos, não permitindo sua utilização. Como nesta primeira etapa, apenas os iniciadores indicados como universais (HCO e LCO; Folmer *et al.* 1994) haviam sido utilizados, novas tentativas de amplificação foram feitas utilizando outros pares de iniciadores que amplificam fragmentos menores do marcador (Tabela 5).

Em relação aos insetos provenientes de coleção, grande parte da amostra apresentou resultado negativo para amplificação por PCR, para qualquer combinação de primer. Mesmo após a etapa de polimerização reconstrutiva os eletroferogramas resultantes do sequenciamento apresentaram uma qualidade muito baixa e, conseqüentemente, não puderam ser incluídos nas análises.

Um total de 39 indivíduos, representantes de 12 espécies, foi sequenciado. Das sequências obtidas, o alinhamento permitiu observar 228 sítios variáveis, de um total de 657 pb; distribuídos em 30 haplótipos distintos. É importante observar que nem todas as sequências possuíam 650 pb (Figura 23).

Essas sequências, juntamente com outras, provenientes do GenBank e do banco de dados do Laboratório de Sistemática Bioquímica, foram alinhadas e utilizadas para a reconstrução filogenética do gênero.

Duas abordagens distintas foram utilizadas para a reconstrução filogenética: Neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987) e máxima verossimilhança (Felsenstein, 1981). A confiabilidade dos clados foi inferida a partir de reamostragens de *bootstrap* (Efron, 1979). Foram reconstruídas três filogenias: uma com base em NJ e duas com base em MV, a partir de dois programas diferentes (Figuras 19, 20 e 21).

Foi possível observar, a partir desses resultados, que haplótipos de mesma espécie agrupam em clados com suporte estatístico geralmente alto (> 80%), enquanto que as relações mais profundas na árvore não são bem resolvidas (suporte estatístico baixo). Esse resultado foi coerente entre as três árvores. As diferenças observadas entre as topologias recuperadas se deve a instabilidade dos clados, refletida no seu baixo suporte estatístico.

A comparação da divergência genética entre os haplótipos revelou que a distância K2P entre indivíduos da mesma espécie variou de 0 – 2,6% e a média entre indivíduos de

espécies diferentes variou entre 2,8 – 17,4%. A média total da distancia K2P entre todos os indivíduos foi é de 9,3% (Tabela 8). A exceção encontrada foi a comparação entre os dois espécimes de *R. montenegrensis*, que apresentaram uma divergência de 4,6%.

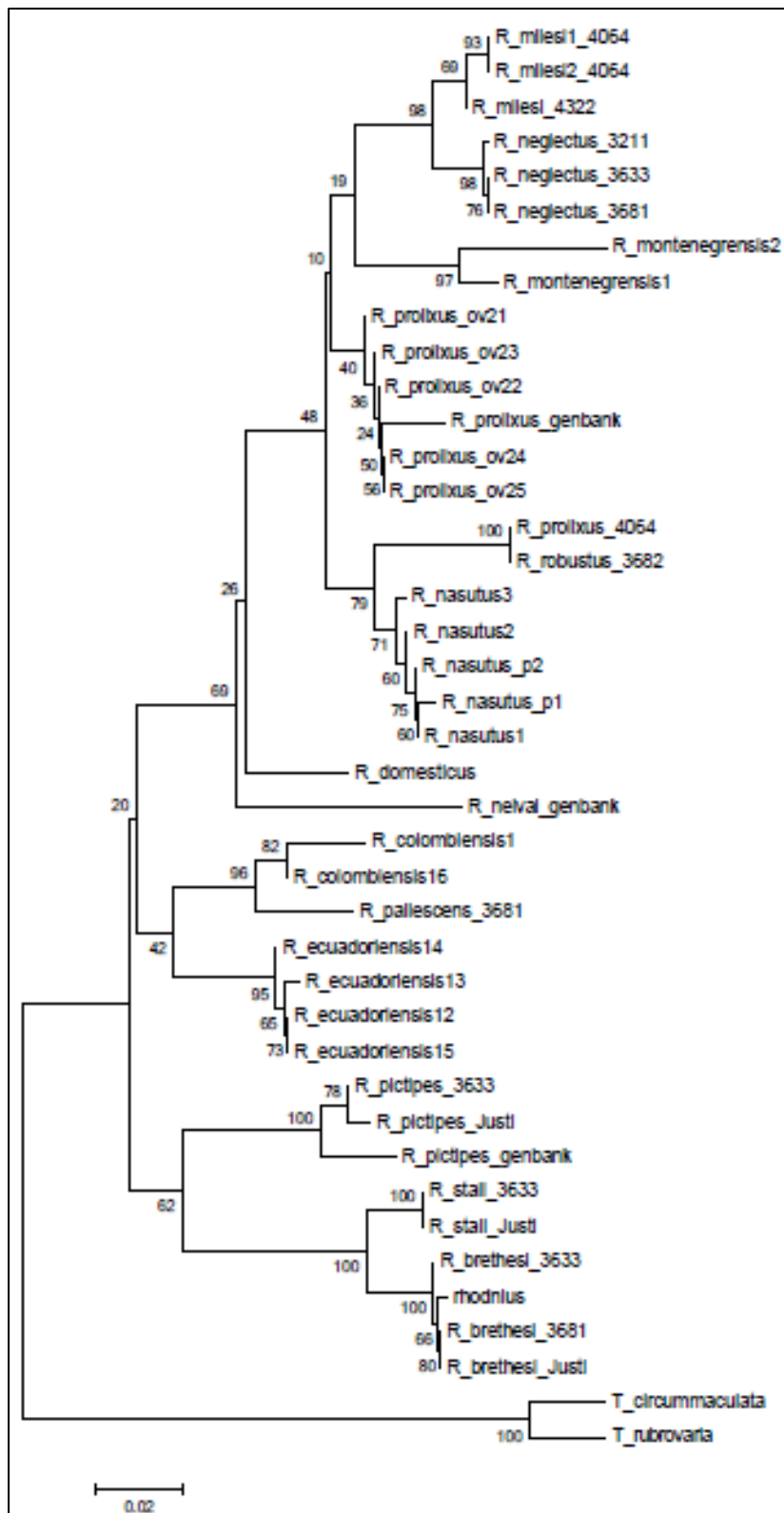


Figura 19. Árvore filogenética para haplótipos do gene mitocondrial COI do gênero *Rhodnius*, construída com base na matriz de distâncias Kimura 2-parâmetros (*Neighbor-joining* com 1000 réplicas de *bootstrap*). (Valores acima e abaixo dos ramos indicam suporte *bootstrap*).

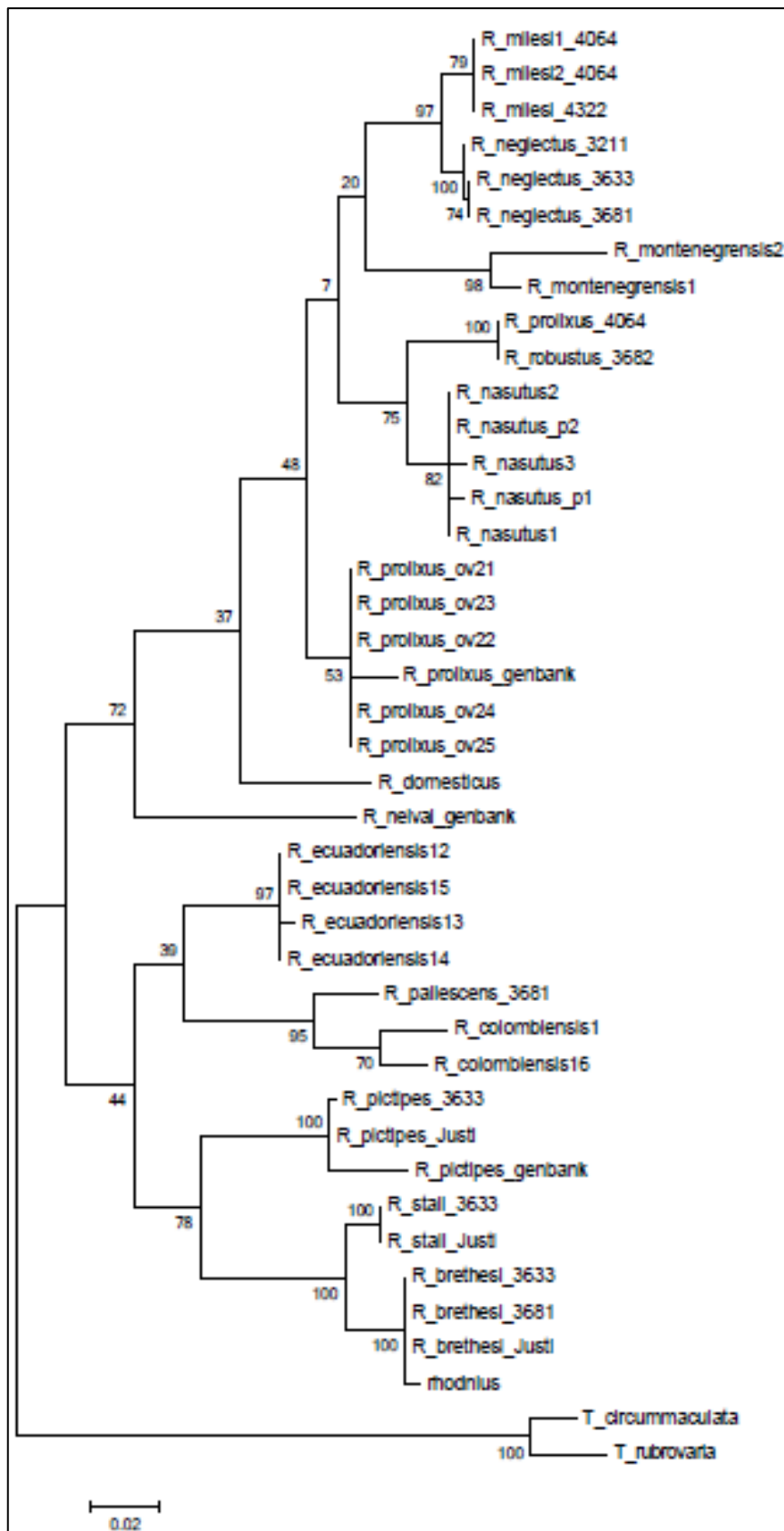


Figura 20. Árvore de máxima verossimilhança utilizando a região do gene mitocondrial COI do gênero *Rhodnius*. Os números acima dos nós correspondem aos valores de *bootstrap* obtido em 1000 réplicas com base na matriz de distâncias Kimura 2-parâmetros (Valores acima e abaixo dos ramos indicam suporte *bootstrap*).

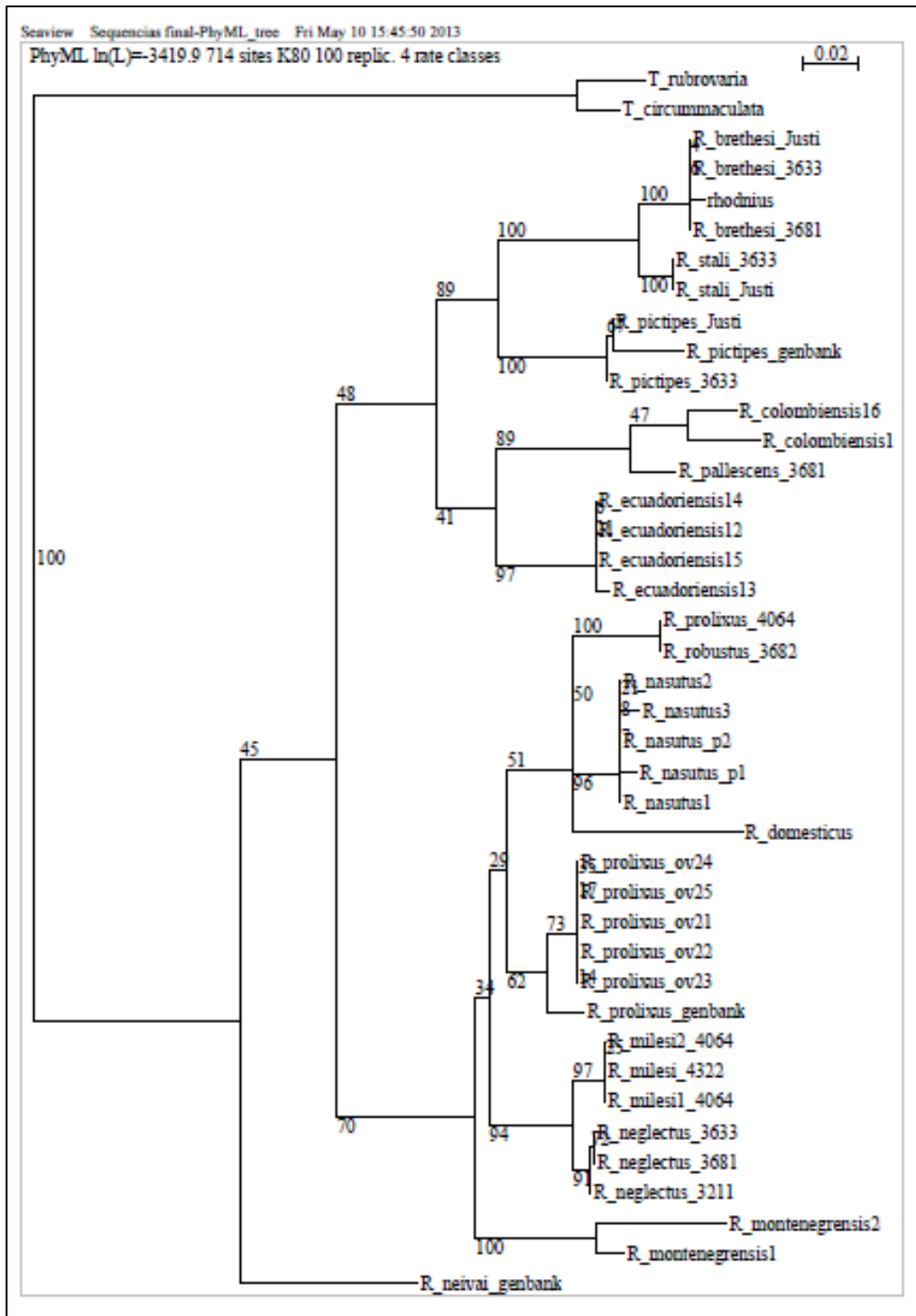


Figura 21. Árvore de máxima verossimilhança utilizando a região do gene mitocondrial COI do gênero *Rhodnius* obtida através do programa Seaview. Os números acima dos nós correspondem aos valores de *bootstrap* obtido em 100 réplicas com base na matriz de distâncias Kimura 2-parâmetros (Valores acima e abaixo dos ramos indicam suporte *bootstrap*).

| Espécie | 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 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 |
|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----|----|----|
| R.brevesi_3633 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| R.brevesi_3681 | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| R.brevesi_Ju81 | 0 | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| R.colombiensis1 | 0.132 | 0.145 | 0.145 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| R.colombiensis16 | 0.098 | 0.098 | 0.098 | 0.014 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| R.domesticus | 0.136 | 0.136 | 0.136 | 0.101 | 0.089 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| R.ecuadoriensis12 | 0.095 | 0.098 | 0.085 | 0.07 | 0.099 | 0.077 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| R.ecuadoriensis13 | 0.089 | 0.089 | 0.089 | 0.07 | 0.063 | 0.077 | 0.004 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| R.ecuadoriensis14 | 0.098 | 0.098 | 0.098 | 0.07 | 0.069 | 0.077 | 0 | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| R.ecuadoriensis15 | 0.085 | 0.085 | 0.085 | 0.07 | 0.059 | 0.077 | 0 | 0.004 | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| R.ecuadoriensis16 | 0.15 | 0.163 | 0.163 | 0.148 | 0.097 | 0.074 | 0.103 | 0.108 | 0.088 | 0.103 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| R.mexi2_4064 | 0.15 | 0.163 | 0.163 | 0.148 | 0.097 | 0.074 | 0.103 | 0.108 | 0.088 | 0.103 | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| R.mexi2_4222 | 0.122 | 0.122 | 0.122 | 0.098 | 0.09 | 0.068 | 0.107 | 0.112 | 0.09 | 0.107 | 0 | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| R.mexi2_4322 | 0.122 | 0.122 | 0.122 | 0.098 | 0.09 | 0.068 | 0.107 | 0.112 | 0.09 | 0.107 | 0 | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| R.mexi2_4664 | 0.15 | 0.163 | 0.163 | 0.148 | 0.097 | 0.074 | 0.103 | 0.108 | 0.088 | 0.103 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| R.mexi2_4864 | 0.15 | 0.163 | 0.163 | 0.148 | 0.097 | 0.074 | 0.103 | 0.108 | 0.088 | 0.103 | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| R.mexi2_4922 | 0.122 | 0.122 | 0.122 | 0.098 | 0.09 | 0.068 | 0.107 | 0.112 | 0.09 | 0.107 | 0 | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| R.monthegeensis2 | 0.169 | 0.169 | 0.169 | 0.129 | 0.118 | 0.131 | 0.138 | 0.143 | 0.131 | 0.139 | 0.089 | 0.089 | 0.075 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| R.monthegeensis1 | 0.143 | 0.143 | 0.143 | 0.095 | 0.103 | 0.089 | 0.114 | 0.119 | 0.099 | 0.114 | 0.065 | 0.065 | 0.065 | 0.043 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| R.nedra1_gembank | 0.17 | 0.172 | 0.172 | 0.162 | 0.153 | 0.081 | 0.098 | 0.098 | 0.098 | 0.098 | 0.143 | 0.143 | 0.076 | 0.115 | 0.08 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| R.nasutus_p1 | 0.14 | 0.14 | 0.14 | 0.117 | 0.109 | 0.056 | 0.121 | 0.121 | 0.11 | 0.121 | 0.067 | 0.067 | 0.061 | 0.11 | 0.086 | 0.104 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| R.nasutus_p2 | 0.135 | 0.135 | 0.135 | 0.112 | 0.108 | 0.056 | 0.11 | 0.11 | 0.104 | 0.11 | 0.059 | 0.059 | 0.052 | 0.104 | 0.074 | 0.104 | 0.004 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| R.nasutus1 | 0.14 | 0.14 | 0.14 | 0.112 | 0.104 | 0.056 | 0.116 | 0.116 | 0.104 | 0.116 | 0.062 | 0.062 | 0.056 | 0.105 | 0.081 | 0.104 | 0.004 | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| R.nasutus2 | 0.13 | 0.13 | 0.13 | 0.112 | 0.103 | 0.056 | 0.105 | 0.105 | 0.052 | 0.052 | 0.044 | 0.094 | 0.063 | 0.104 | 0.005 | 0 | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| R.nasutus3 | 0.131 | 0.131 | 0.131 | 0.112 | 0.102 | 0.059 | 0.109 | 0.109 | 0.055 | 0.055 | 0.044 | 0.087 | 0.066 | 0.104 | 0.01 | 0.005 | 0.005 | 0.005 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| R.neplectus_3211 | 0.148 | 0.157 | 0.157 | 0.132 | 0.083 | 0.074 | 0.113 | 0.117 | 0.099 | 0.113 | 0.017 | 0.023 | 0.089 | 0.065 | 0.143 | 0.067 | 0.059 | 0.062 | 0.052 | 0.065 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| R.neplectus_3633 | 0.15 | 0.159 | 0.159 | 0.134 | 0.083 | 0.074 | 0.113 | 0.117 | 0.099 | 0.113 | 0.019 | 0.019 | 0.023 | 0.089 | 0.065 | 0.141 | 0.067 | 0.059 | 0.062 | 0.052 | 0.065 | 0.002 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| R.neplectus_3681 | 0.15 | 0.159 | 0.159 | 0.134 | 0.083 | 0.074 | 0.113 | 0.117 | 0.099 | 0.113 | 0.019 | 0.019 | 0.023 | 0.089 | 0.065 | 0.141 | 0.067 | 0.059 | 0.062 | 0.052 | 0.065 | 0.002 | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| R.paliscaens_3681 | 0.114 | 0.125 | 0.125 | 0.051 | 0.024 | 0.094 | 0.054 | 0.058 | 0.062 | 0.054 | 0.151 | 0.1 | 0.137 | 0.112 | 0.15 | 0.118 | 0.108 | 0.113 | 0.102 | 0.102 | 0.135 | 0.137 | 0.137 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| R.palipes_3633 | 0.09 | 0.09 | 0.09 | 0.12 | 0.081 | 0.136 | 0.077 | 0.077 | 0.077 | 0.126 | 0.128 | 0.101 | 0.146 | 0.113 | 0.143 | 0.112 | 0.112 | 0.113 | 0.114 | 0.123 | 0.126 | 0.128 | 0.1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| R.palipes_gembank | 0.117 | 0.12 | 0.119 | 0.165 | 0.11 | 0.154 | 0.086 | 0.085 | 0.085 | 0.164 | 0.164 | 0.11 | 0.141 | 0.109 | 0.147 | 0.121 | 0.121 | 0.121 | 0.116 | 0.153 | 0.155 | 0.156 | 0.138 | 0.026 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| R.palipes_Ju81 | 0.088 | 0.095 | 0.094 | 0.13 | 0.089 | 0.136 | 0.075 | 0.08 | 0.077 | 0.075 | 0.148 | 0.148 | 0.128 | 0.163 | 0.137 | 0.137 | 0.119 | 0.113 | 0.113 | 0.114 | 0.14 | 0.142 | 0.142 | 0.109 | 0.002 | 0.024 | | | | | | | | | | | | | | | |
| R.palipes_4064 | 0.159 | 0.168 | 0.168 | 0.148 | 0.106 | 0.074 | 0.133 | 0.133 | 0.127 | 0.104 | 0.122 | 0.082 | 0.071 | 0.113 | 0.089 | 0.138 | 0.044 | 0.04 | 0.039 | 0.037 | 0.039 | 0.077 | 0.078 | 0.078 | 0.153 | 0.125 | 0.151 | 0.141 | | | | | | | | | | | | | |
| R.palipes_gembank | 0.16 | 0.161 | 0.161 | 0.169 | 0.109 | 0.068 | 0.099 | 0.099 | 0.099 | 0.085 | 0.065 | 0.043 | 0.08 | 0.047 | 0.126 | 0.047 | 0.047 | 0.047 | 0.049 | 0.06 | 0.068 | 0.056 | 0.144 | 0.128 | 0.148 | 0.148 | 0.138 | 0.067 | | | | | | | | | | | | | |
| R.palipes_0x24 | 0.129 | 0.129 | 0.129 | 0.101 | 0.102 | 0.055 | 0.103 | 0.108 | 0.094 | 0.103 | 0.053 | 0.053 | 0.051 | 0.084 | 0.081 | 0.089 | 0.044 | 0.056 | 0.039 | 0.028 | 0.029 | 0.053 | 0.053 | 0.055 | 0.105 | 0.107 | 0.109 | 0.125 | 0.07 | 0.015 | | | | | | | | | | | |
| R.palipes_0x25 | 0.129 | 0.129 | 0.129 | 0.101 | 0.102 | 0.055 | 0.103 | 0.108 | 0.094 | 0.103 | 0.053 | 0.053 | 0.051 | 0.084 | 0.081 | 0.089 | 0.044 | 0.056 | 0.039 | 0.028 | 0.029 | 0.053 | 0.053 | 0.055 | 0.105 | 0.107 | 0.109 | 0.125 | 0.07 | 0.015 | | | | | | | | | | | |
| R.palipes_0x22 | 0.124 | 0.124 | 0.124 | 0.101 | 0.092 | 0.055 | 0.094 | 0.094 | 0.094 | 0.042 | 0.038 | 0.077 | 0.047 | 0.069 | 0.032 | 0.028 | 0.028 | 0.028 | 0.029 | 0.042 | 0.042 | 0.042 | 0.081 | 0.107 | 0.109 | 0.107 | 0.047 | 0.015 | 0 | 0 | | | | | | | | | | | |
| R.palipes_0x21 | 0.118 | 0.118 | 0.118 | 0.09 | 0.095 | 0.076 | 0.093 | 0.093 | 0.093 | 0.034 | 0.034 | 0.034 | 0.064 | 0.042 | 0.066 | 0.034 | 0.027 | 0.027 | 0.027 | 0.027 | 0.027 | 0.034 | 0.034 | 0.034 | 0.077 | 0.101 | 0.092 | 0.101 | 0.041 | 0.016 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | |
| R.palipes_0x23 | 0.126 | 0.126 | 0.126 | 0.101 | 0.091 | 0.059 | 0.098 | 0.098 | 0.098 | 0.044 | 0.044 | 0.038 | 0.07 | 0.05 | 0.067 | 0.029 | 0.024 | 0.024 | 0.024 | 0.029 | 0.044 | 0.044 | 0.044 | 0.081 | 0.108 | 0.103 | 0.108 | 0.048 | 0.016 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | |
| R.palipes_3682 | 0.159 | 0.168 | 0.168 | 0.148 | 0.106 | 0.074 | 0.133 | 0.133 | 0.127 | 0.104 | 0.122 | 0.082 | 0.071 | 0.113 | 0.089 | 0.138 | 0.044 | 0.04 | 0.039 | 0.037 | 0.039 | 0.077 | 0.078 | 0.078 | 0.153 | 0.125 | 0.151 | 0.141 | 0 | 0.067 | 0.07 | 0.07 | 0.047 | 0.041 | 0.049 | | | | | | |
| R.stell_3633 | 0.029 | 0.028 | 0.028 | 0.137 | 0.102 | 0.122 | 0.089 | 0.089 | 0.089 | 0.089 | 0.169 | 0.169 | 0.127 | 0.174 | 0.137 | 0.157 | 0.129 | 0.119 | 0.129 | 0.119 | 0.12 | 0.163 | 0.165 | 0.166 | 0.119 | 0.088 | 0.113 | 0.094 | 0.159 | 0.151 | 0.129 | 0.129 | 0.113 | 0.101 | 0.114 | 0.159 | | | | | |
| R.stell_Ju81 | 0.029 | 0.028 | 0.028 | 0.137 | 0.102 | 0.122 | 0.089 | 0.089 | 0.089 | 0.089 | 0.169 | 0.169 | 0.127 | 0.174 | 0.137 | 0.157 | 0.129 | 0.119 | 0.129 | 0.119 | 0.12 | 0.163 | 0.165 | 0.166 | 0.119 | 0.088 | 0.113 | 0.094 | 0.159 | 0.151 | 0.129 | 0.129 | 0.113 | 0.101 | 0.114 | 0.159 | 0 | | | | |
| Rhodnius | 0.002 | 0.003 | 0.003 | 0.147 | 0.098 | 0.136 | 0.086 | 0.085 | 0.098 | 0.085 | 0.167 | 0.167 | 0.128 | 0.168 | 0.143 | 0.17 | 0.14 | 0.135 | 0.14 | 0.13 | 0.131 | 0.161 | 0.163 | 0.163 | 0.126 | 0.09 | 0.117 | 0.092 | 0.173 | 0.164 | 0.135 | 0.136 | 0.124 | 0.118 | 0.128 | 0.173 | 0.031 | 0.031 | | | |
| T.citricornutus | 0.223 | 0.224 | 0.224 | 0.24 | 0.189 | 0.195 | 0.175 | 0.19 | 0.181 | 0.175 | 0.246 | 0.246 | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Pode-se observar que tanto fragmentos de COI maiores (650pb -Figura 26 e Figura 27) gerados pela amplificação através dos iniciadores de Folmer *et al.* (1994) e Hebert *et al.* (2003), como aqueles fragmentos menores (250pb - Figura 24 e Figura 25), gerados a partir da combinação dos iniciadores de Nelson *et al.* (2007) e Hajibabaei *et al.* (2006) se mostraram eficientes em discriminar as espécies de triatomíneos. Esta afirmação é baseada no fato de que os valores (*bootstrap*) que suportam os ramos terminais das árvores são sempre superiores a 80%, mostrando a confiabilidade dos resultados.

6 DISCUSSÃO

A caracterização do gênero *Rhodnius*, feita através da taxonomia clássica, é bastante fácil; entretanto, a diferenciação de suas espécies é uma tarefa bastante difícil. Com base nessa dificuldade e a fim de contribuir para minimizar essas dificuldades, pesquisadores passaram a empregar novas técnicas que pudessem auxiliar na identificação dessas espécies.

A primeira proposta foi feita por Lent & Jurberg (1965) iniciando uma série de extensos estudos comparativos das genitálias como um refinamento da taxonomia morfológica, auxiliando não só na caracterização dos gêneros, como também, de algumas espécies. Posteriormente a utilização da morfometria surgiu como mais uma tentativa de refinamento do estudo taxonômico convencional (Gorla *et al.*, 1993; Galíndez-Girón *et al.*, 1994; Harry, 1994; Casini *et al.*, 1995; Dujardin *et al.*, 1997a,b; Dujardin *et al.* 1999). Um novo ramo desse método, a morfometria geométrica, também começou a ser utilizada nos estudos dos triatomíneos, avançando além do alcance da morfometria tradicional. Com relação ao uso de caracteres não morfológicos para solucionar questões taxonômicas, pode se considerar Actis *et al.* (1964) como os precursores ao utilizarem a eletroforese de proteínas da hemolinfa para comparar espécies do complexo *T. sordida*. O avanço tecnológico nas últimas décadas, permitiu o surgimento de novas ferramentas que auxiliassem na resolução do “impedimento taxonômico”, por meio do uso de marcadores moleculares. Garcia & Powell (1998) e Stothard *et al.* (1998) foram os pioneiros ao inferir relacionamentos filogenéticos entre alguns membros da subfamília Triatominae utilizando caracteres moleculares.

Mais recentemente, Hebert *et al.* (2003) propuseram um sistema de identificação de espécies, através do sequenciamento de uma pequena região do gene mitocondrial COI, conhecido como Código de Barras de DNA (*DNA barcoding*). Esta metodologia seria empregada como uma ferramenta de identificação rápida e barata que permitiria identificar a espécie de uma amostra desconhecida, podendo ser usada tanto por especialistas quanto não especialistas em taxonomia. A ideia de ser capaz de distinguir espécies e identificar espécimes, incluindo espécimes incompletos, ou danificados utilizando uma sequência de gene muito curto imediatamente fascinou muitos taxonomistas, geneticistas e biólogos evolucionistas. Por outro lado a proposta de Hebert

et al. (2003) promoveu um amplo debate na literatura com partidários e opositores do uso do DNA Barcoding na sistemática (Ebach, 2011, Mitchell, 2011, Stevens *et al* 2001, Page and Hughes 2011, Costa & Antunes 2012)

Objetivo do presente trabalho foi testar o marcador COI na identificação das espécies do gênero *Rhodnius* e tentar esclarecer as dúvidas em relação à taxonomia das espécies crípticas desse grupo: *R. prolixus*, *R. robustus*, *R. neglectus* e *R. nastus* (Lyman *et al.* 1999; Monteiro *et al.* 2000; Monteiro *et al.* 2003, Pavan & Monteiro 2007). Esta é primeira vez que se propõe caracterizar todas as espécies do gênero *Rhodnius* utilizando um marcador molecular, assim como, este é o primeiro trabalho de código de barras de DNA em reduviídeos, utilizando principalmente espécimes depositados em coleções.

Mas por que o uso de COI, se o uso de outros marcadores moleculares como Cytb e 16S já haviam sido testados? A utilização de marcadores moleculares não é uma ideia inédita. Folmer *et al.* (1994) já haviam descrito uso de COI na diferenciação de espécies, pois este parecia ser o gene mais conservado no genoma mitocondrial de animais. O uso de COI no gênero *Rhodnius* não é inédito; Gaunt e Miles (2002) publicaram sequências de três espécies, que permitiram a comparação das obtidas durante a execução dessas.

Neste estudo, pela primeira vez, foram utilizados triatomíneos depositados em coleções para tentar elucidar os questionamentos taxonômicos do grupo. Porém, o DNA extraído dos espécimes de coleção pareceu estar muito degradado, provavelmente devido à forma de conservação e idade dos espécimes depositados. A polimerização reconstrutiva, permitiu que o tamanho do fragmento de DNA extraído fosse melhorado, porém as sequências obtidas apresentaram muito ruído, picos duplos ou picos muito baixos, o que não permitiu a análise da grande maioria das sequências.

Algumas sequências puderam ser analisadas, porém quando incluídas no alinhamento, a filogenia recuperada não permitiu que essas curtas sequências pudessem ser diferenciadas. Apesar da adaptação do protocolo de Gilbert *et al.* (2007) os resultados ainda não foram satisfatórios. Vale ressaltar que algumas das coleções brasileiras não compartilham as mesmas condições de coleções mantidas em Instituições estrangeiras, devido a fatores climáticos ou de infraestrutura. No presente trabalho não foi possível otimizar extração de DNA de insetos mantidos por muitos anos em coleções, ainda é

preciso aprimorar a técnica e melhorar as condições em que se encontram as coleções entomológicas.

Por outro lado os resultados das análises de sequências obtidas a partir de insetos frescos ou preservados em álcool mostraram que o primer universal proposto não apresentou resultado 100% satisfatório. Para espécies como *R. colombiensis*, *R. ecuadoriensis*, *R. domesticus* e *R. neivai*, só foi possível obter sequências (250pb) após o teste de diferentes combinações de iniciadores. Isso mostra que, ao contrário do que foi dito por Folmer *et al.* 1994, os iniciadores ditos universais têm uma limitação no que concerne ao seu uso para amplificação do marcador em *Rhodnius* e *Triatoma*.

Analisando o gene COI dentro do gênero *Rhodnius*, observou-se que este marcador mostrou ser efetivo na diferenciação das espécies, e isso é corroborado pelos altos valores de *bootstrap* na maior parte dos ramos terminais.

Hebert *et al* 2003 propuseram que “COI parece possuir um maior alcance do sinal filogenético do que qualquer outro gene mitocondrial”, entretanto, não foi possível recuperar um bom sinal filogenético para o gênero *Rhodnius* isso é corroborado pelo baixo nível de *bootstrap* nos ramos mais basais da árvore, impossibilitando inferir a filogenia deste grupo.

Comparando as relações entre essas espécies pode-se observar que os resultados foram parecidos com os dados descritos na literatura. Paula *et al.* (2007) analisaram as relações entre espécies da Tribo Rhodniini através do marcador mitocondrial rDNA 16S, evidenciando relações entre 14 espécies do gênero *Rhodnius*, assim como, Monteiro *et al.* (2000), inferiram a filogenia de 11 espécies de *Rhodnius* utilizando o marcador molecular citocromo b (cytb). Nos dois trabalhos observou-se a existência de dois clados, o primeiro contendo as espécies do grupo *prolixus* (*R. prolixus*, *R. robustus*, *R. neglectus* e *R. nasutus*) junto com *R. domesticus* e *R. neivai* e o segundo compreendendo dois grupos formado por *R. brethesi*, *R. pictipes* e *R. stali* e *R. colombiensis*, *R. ecuadoriensis* e *R. pallescens*. Comparando esses dados com os resultados obtidos com COI pode-se ver uma pequena diferença quando analisamos as relações. COI também revela dois clados principais, porém, o grupo *prolixus* mostra uma clara diferença na conformação das relações. Nesse grupo, *R. robustus* e *R. nasutus* aparecem no mesmo clado e *R. prolixus* aparece em um clado separado e próximo as demais espécies do grupo,

diferente dos resultados de Paula *et al.* (2007) e Monteiro *et al.* (2000), que mostram *R. robustus* no mesmo clado que *R. neglectus* e *R. prolixus* próximo a *R. nasutus*. No outro grupo as relações se mantiveram idênticas.

Com relação às distâncias genéticas, Hebert *et al.* (2004) sugeriram que a acurácia da identificação dependia da existência de uma lacuna (*barcoding gap*) entre o valor máximo de divergência intraespecífica e o valor mínimo da divergência interespecífica, no caso de sobreposição de valores o marcador não seria apropriado (Meyer & Paulay, 2005). A proposição de Hebert *et al.* (2004) também incluía que os valores mínimos deveriam ser 10 vezes o valor da divergência intraespecífica média para o grupo estudado, ou seja, as divergências <1% indicam que o espécime representa a mesma espécie e as >2% representam uma espécie diferente.

A divergência genética observada na maioria das espécies de *Rhodnius* condiz com o padrão esperado, porém ao analisarmos as divergências entre as espécies *R. milesi* e *R. neglectus* observou-se que estas apresentavam valores menores que o proposto Hebert *et al.* 2004.

O mesmo não ocorreu para os dois espécimes de *R. montenegrensis*. Esta espécie, descrita recentemente, é caracterizada por uma morfologia muito semelhante a das espécies *R. prolixus*, *R. neglectus* e *R. robustus*. A distância genética esperada entre esses indivíduos era <1%, mas o resultado encontrado foi uma divergência de 4,3%. Esse resultado é de certa forma esperado já que os espécimes são provenientes de populações naturais, enquanto aqueles utilizados para comparação de outras espécies são provenientes de colônia. A formação de colônias de laboratório leva a uma diminuição da diversidade genética já que há um efeito de gargalo populacional. Esta distância é semelhante à encontrada em uma das comparações entre *R. prolixus* e *R. neglectus*; e maior do que as comparações entre *R. prolixus* e *R. nasutus*. Este resultado sugere que um estudo mais aprofundado em relação a *R. montenegrensis* deve ser feito.

Segundo Frezal & Leblois (2008) não podemos considerar os valores mínimos de divergência interespecíficas como universais, uma vez que diferentes organismos possuem características populacionais e biológicas distintas, gerando uma resposta evolutiva única. Essa ainda é uma das limitações da proposta do código de barras de DNA. Não foi observado o aparecimento de ausência de sobreposição entre espécies

próximas, o que permite afirmar que a proposta de Hebert *et al.* (2003), para identificação de espécies do gênero *Rhodnius* é válida, porém adaptações ainda são necessárias.

7 CONCLUSÕES

- COI pode ser usado para identificação de espécies, mas não pôde ser usado para inferir a filogenia de *Rhodnius*. A utilização de somente um marcador mitocondrial na identificação taxonômica pode mascarar a presença de híbridos naturais.
- A proposta do Código de Barras de DNA para o gênero *Rhodnius* funcionou apenas quando as sequências foram obtidas através de material fresco e apresentaram um número de pares de bases acima de 250.
- Um banco de dados pôde ser iniciado, porém ainda são necessários ajustes para que possam ser utilizados os espécimes depositados em coleção.
- O par de iniciadores proposto no projeto Barcode e ditos universais, têm uma limitação no que concerne ao seu uso para amplificação de todas as espécies do gênero *Rhodnius*.
- Como não houve sucesso na amplificação do DNA extraído dos insetos de coleção não foi possível confirmar ou invalidar as seguintes sinonímias *R. brumpti* (= *R. nasutus*), *R. dunni* (= *R. pallescens*) e *R. pratai* (= *R. neglectus*).
- Não foi possível otimizar a extração de DNA de espécimes depositados em coleção, devido, provavelmente, a ação degradadora das substâncias utilizadas (naftalina e paraformoldeido em pó) na conservação desses insetos e as condições climáticas das coleções.
- Métodos alternativos de conservação de insetos secos em coleções devem ser investigados visando preservar melhor o material genético para extração de DNA e sequenciamento.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abad-Franch F, Monteiro FA. Molecular research and the control of Chagas disease. *Ann Acad Brasil. Ciên.* 2005; 77: 437-454

Abad-Franch F, Paucar CA, Carpio CC, Cuba Cuba CA, Aguilar VHM, Miles MA. Biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) in Ecuador: implications for the design of control strategies. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2001; 9: 611-620.

Abad-Franch F, Palomeque FS, Aguilar HM 5th, Miles MA. Field ecology of sylvatic *Rhodnius* populations (Heteroptera: Triatominae): risk factors for palm tree infestation in western Ecuador. *Trop Med Int Health.* 2005; 10: 1258-266.

Actis AS, Traversa OC, Carcavallo RU. Estudios taxonômicos sobre el género *Triatoma* Laporte mediante la electrophoresis de la linfa. *An. Esc. Nac. Ciencias Biol.* 1964;13:97-106.

Awise JC. Molecular markers, natural history and evolution. 1994Chapman and Hall, New York, NY, USA: 511 p.

Bargues MD, Marcilla A, Dujardin JP, Mas-Coma S. Triatominae vectors of Chagas disease: a molecular perspective based on nuclear ribosomal DNA markers. "In" Alvar J, Baker JR (eds). *Molecular Tools for Epidemiological Studies and Diagnosis of Leishmaniasis and Selected Other Parasitic Disease.* *Tras. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2002; 96: 159-164

Barrett TV. Current research on Amazonian triatominae. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1988; 83; 1: 441-7.

Carcavallo RU, Galindez Girón I, Jurberg J, Lent H editores. *Atlas of Chagas' Disease Vectors in the Americas / Atlas dos Vetores da Doença de Chagas nas Américas.* Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ; 1998. 3 vol.

Casini CE, Dujardin JP, Martinez M Pereira AB, Salvatella R. Morphometric differentiation evidenced between two geographic populations of *Triatoma infestans* in Uruguay. Res. Reviews Parasitol. 1995; 55:25-30.

Chagas C. Nova tripanosomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1909. Tomo I: 159-228

Chavez LF, Añez N. Geometria de las células del exocóron de huevos de *Rhodnius prolixus* Stal, 1859 (Heteroptera: Reduviidae). Entomotropica. 2003; 18(1): 1-5.

Costa FO, Antunes PM. The Contribution of the Barcode of Life Initiative to the Discovery and Monitoring of Biodiversity. "In" A. Mendonca *et al.* (eds.), Natural Resources, Sustainability and Humanity. Springer Science+Business Media Dordrecht. 2012: 37-68.

Coura JR, Junqueira ACV, Fernandes SAS, Miles MA. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. Trends in Parasitol. 2002A; 18(4):171-6

Coura JR, Junqueira ACV, Bóia MN, Fernandes O, Bonfante C, Campos JE, Santos L, Deveras R. Chagas disease in the Brazilian Amazon. IV. A new cross-sectional study. Rev Inst Med Trop S Paulo. 2002B; 44(3): 159-65

Dias JCP & Schofield CJ. The evolution of Chagas disease (American Trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1999; 94:103 - 121.

Dias JCP, Vinhaes MC, Silveira AC, Schofield CJ, Cardoso B, Coura JR. Pesquisas prioritárias sobre doença de Chagas na Amazônia: agenda de curto-médio prazo. Rev Soc Brasil Med Trop. 2001; 34(5): 497-8.

Dias JCP, Siveira AC, Schofield CJ. The Impact of Chagas Disease Control in Latin America – A Review. Mem. Inst. Osw. Cruz. 2002; 97: 603-61.

Dias JCP, Amato Neto V, Luna AJA. Mecanismos alternativos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil e sugestões para sua prevenção (Alternative transmission mechanisms of *Trypanosoma cruzi* in Brazil and proposals for their prevention). Rev Soc Bras Med Trop. 2011; 44: 375-379.

Dotson EM, Beard CB. Sequence and organization of the mitochondrial genome of the Chagas disease vector, *Triatoma dimidiata*. Insect Mol Biol. 2001;10: 205–15.

Dujardin JP, Bermudez H, Schofield CJ. The use of morphometrics in entomological surveillance of silvatic foci of *Triatoma infestans* in Bolivia. Acta Tropica. 1997a; 66:145-153.

Dujardin JP, Mermudez H, Casini C, Schofield CJ, Tybayrenc M. Metric differences between silvatic and domestic *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) in Bolivia. J. Med. Entomol. 1997b; 34: 544-551.

Dujardin JP, Chavez T, Moreno JM, Machane M, Noireau F, Schofield CJ. Comparison of isoenzyme electrophoresis and morphometric analysis for phylogenetic reconstruction of the Rhodniini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). J. Med. Entomol. 1999; 36: 653-659.

Ebach, MC. Taxonomy and the DNA Barcoding Enterprise. Zootaxa. 2011; 2742: 67-8.

Efron B. Bootstrap Methods: Another look at the Jackknife. Ann. Statist. 1979; 1: 1-26

Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using bootstrap. 1981; 58: 205-209.

Felsenstein J. Confidence limits on phylogenetics: an approach using bootstrap. Evolution.1985; 39: 783-91.

Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. DNA iniciadores for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol and Biotec.* 1994; 3(5): 294-299.

Fonseca GAB, Robinson JG. Forest size and structure: Competitive and predatory effects on small mammal communities. *Conserv Biol.* 1990; 53: 265-94

Forattini OP, Ferreira AO, Rocha e Silva EO, Rabello EX. Aspectos ecológicos da tripanosomíase americana. XIV – Persistência e potencial de domiciliação de populações triatomínicas silvestres em região de intensa atividade agropecuária. *Rev Saúde Publ.* 1979; 13: 123-46.

Frézal L, Leblois R. Four years of DNA barcoding: Current advances and prospects. *Infect Genet Evol.* 2008; 8: 727–36.

Galíndez-Girón I, Valderrama A, Añez N, Marquez V, Torrez E, Madrid S, Bazarte R, Marquez J, Gonzalez R. Algunos estudios morfométricos en los Triatominae. I. *Rhodnius prolixus* y *Rhodnius robustus* (Hemiptera, Reduviidae). *Entomol Vect* 1994; 1: 99-111.

Galvão C, Carcavallo RU, Rocha DS, Jurberg J.A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa.* 2003; 202: 1-36.

García BA, Powell JR. Phylogeny of species of *Triatoma* (Hemiptera, Reduviidae) based on mitochondrial DNA sequences. *J. Med. Entomol.* 1998; 35: 232-238.

García BA, Manfredi C, Fichera L and Segura EL. Short report: variation in mitochondrial 12S and 16S ribosomal DNA sequences in natural populations of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Am J Trop Med Hyg.* 2003; 68: 692–694.

Gaunt M, Miles, M. The ecotopes and evolution of Triatominae bugs (Triatominae) and their associated trypanosomes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000; 95(4): 557-65.

Gaunt MW, Miles MA. An insect molecular clock dates the origin of the insects and accords with palaeontological and biogeographic landmarks. *Mol Biol Evol*. 2002;19:748-61.

Gilbert MTP, Moore W, Melchior L, Worobey M. DNA extraction from dry museum beetles without conferring external morphological damage. *PLoS ONE*. 2007; 2 (3): e272.

Golenberg EM, Bickel A, Weihs P. Effect of highly fragmented DNA on PCR. *Nucleic Acids Res*. 1996; 24:5026-33

Gómez-Palacio A, Jaramillo-O N, Caro-Riaño H, Diaz S, Monteiro FA, Pérez R, Panzera F, Triana O. Morphometric and molecular evidence of intraspecific biogeographical differentiation of *Rhodnius pallescens* (HEMIPTERA: REDUVIIDAE: RHODNIINI) from Colombia and Panama. *Infect Genet Evol*. 2012;12:1975-83

Gorla DE, Jurberg J, Catalá SS, Schofield CJ. Systematics of *Triatoma sordida*, *Triatoma guasayana* and *Triatoma patagônica* (Hemiptera, Reduviidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1993; 88: 379-385.

Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol*. 2010; 59: 307–321.

Gurgel-Gonçalves R, Galvão C, Costa J, Peterson T. Geographic Distribution of Chagas Disease Vectors in Brazil Based on Ecological Niche Modeling. *J of Trop Med*. 2012: 1-15.

Hajibabaei M, Smith M, Janzen DH, Rodriguez JJ, Whitfield JB, Hebert PDN. A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Mol. Ecol. Notes*. 2006; 6: 959–64

Hajibabaei M, Singer GAC, Hebert PDN, Hickey DA. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in Genetics*. 2007; 23:167-172.

Harry M. Morphometric variability in the Chagas' disease vector *Rhodnius prolixus*. *Jpn. J. Genet.* 1994; 69: 233-250.

Herbet PDN, Gregory TR. The promise of DNA Barcoding for Taxonomy. *Syst Biol.* 2005; 54: 852-9.

Herbet PDN, Cywinska , Ball SL, deWaard JR. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceed. Royal Soc. London.Ser. B; Biol Sci.* 2003; 270: 313-21.

Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemlak TS, Francis CM. Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biology.* 2004; 2: e312.

Hypša V, Tietz DF, Zrzavý J, Rego ROM, Galvão C and Jurberg J.. Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the Asiatic clade. *Mol Phylogenet Evol.* 2002; 23: 447–57

Jeannel R. Hencocephalidae et Reduviidae. "In" Voyage de Ch. Alluaud et R. Jeannel en Afrique orientale (1911-1912). *Rdsultats scientifiques-Hemiptera*, 1919; 3:131-314.

Jinbo U, Kato T, Ito M. Current progress in DNA barcoding and future implications for entomology. *Entom Science.* 2011: 1-18.

Justi S, Noireau F, Cortez MR, Monteiro FA. Infestation of peridomestic *Attalea phalerata* palms by *Rhodnius stali*, a vector of *Trypanosoma cruzi* in the Alto Beni, Bolivia. *Trop Medicine Intern. Health.* 2010; 15: 727-32.

Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R, Molineux I, Khorana HG. Studies on polynucleotides: XCVI. Repair replication of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. J Mol Bio. 1971; 56: 341-61.

Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J Mol Evol.1980; 16: 111-20.

Lent H. O gênero *Rhodnius* Stål, 1859 (Hemiptera, Reduviidae).Rev Bras Biol. 1948; 29: 487-560.

Lent H, Jurberg J. O gênero *Psammolestes* Bergroth, 1911, com um estudo sobre a genitália das espécies (Hemiptera, Reduviidae,(Triatominae). Rev. Bras. Biol. 1965; 25: 349-376.

Lent H, Jurberg J. O gênero *Rhodnius* Stål, 1859, com um estudo sobre a genitália das espécies (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Rev Brasil Biol. 1969; 29: 487-560.

Lent H, Valderrama A. Observações em laboratório, sobre o ciclo evolutivo de *Rhodnius prolixus* Stal, 1859. *R. Pictipes*, 1872 e *R. Neivai* Lent, 1953. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1977; 37(2): 325-44.

Lent H, Wygodzinsky P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease.Bull American Museum of Natural History.1979; 163: Article3.

Lent H, Jurberg J, Galvão C. *Rhodnius stali* n. sp., afim de *Rhodnius pictipes* Stål, 1872 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1993; 88: 605-14.

Lima MM, Sarquis O. Is *Rhodnius nasutus* (Hemiptera:Reduviidae) changing its habitats a consequence of human activity? Parasitol Res. 2007; 102: 797-800.

Lyamn DF, Monteiro FA, Escalante AA, Cordon-rosales C, Wesson DM, Dujardin JP, Beard CB. Mitochondrial DNA sequence variation among Triatominae vectors of Chagas' disease. *Am. Journ. Trop. Med and Hygiene*. 1999; 377-86.

Marcilla A, Bargues MD, Ramsey JM, Magallon-Gastelum E, Salazar-Schettino PM, Abad-Franch F, Dujardin JP, Schofield CJ, Mas-Coma S. The ITS_2 of nuclear rDNA as a molecular marker for population species and phylogenetic relationships in Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) vectors of Chagas' Disease.. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2001; 18:136-42.

Marcilla A, Bargues MD, Abad-Franch F, Panzera F, Carcavallo RU, Noireau F, Galvão C, Miles M, Dujardin JP, Mas-Coma S. Nuclear rDNA IST-2 sequences reveal polyphyly of *Panstrongylus* species (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), vectors of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Gen Evol.* 2002;1: 225-235.

Marinoni L, Couri MS, Almeida LM, Grazia J, Melo G. Coleções entomológicas brasileiras: estado –da arte e perspectivas para dez anos. Documento de trabalho. Projeto Diretrizes e Estratégias para a Modernização de Coleções Biológicas Brasileiras e a Consolidação de Sistemas Integrados de Informações sobre Biodiversidade, 2005, (disponível em [http://www.cria.org.br/cgee/junho/docs/ ColecoesEntomologicas.doc](http://www.cria.org.br/cgee/junho/docs/ColecoesEntomologicas.doc)).

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

Meyer CP, Paulay G. DNA barcoding: Error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biol.* 2005; 3: 422.

Miles MA, Feliciangeli MD, de Arias AR. Science, medicine, and the future. American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *BMJ*. 2003; 326: 1444-1448

Miller SE. DNA barcoding and the renaissance of taxonomy. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2007; 104: 4775-4776.

Mitchell A. DNA barcoding is useful for taxonomy: a reply to Ebach. Zootaxa. 2772: 67-8.

Monteiro FA, Wesson DM, Dotson EM, Schofield CJ, Beard CB. Phylogeny and molecular taxonomy of the Rhodniini derived from mitochondrial and nuclear DNA sequences. Am J Trop Med Hyg. 2000; 62: 460-5.

Monteiro FA, Escalante AA, Beard CB. Molecular tools and triatominae systematics: a public health perspective. Trends. Parasitol. 2001; 17: 344-347.

Monteiro Fa, Barrett TV, Fitzpatrick S, Cordon-Rosales C, Feliciangeli D, Beard CB. Molecular phylogeography of the Amazonia Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. Mol. Ecol. 2003; 12: 997-1006.

Monteiro FA, Jurberg J, Lazoski C. Very low levels of genetic variation in natural peridomestic populations of the Chagas disease vector *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) in southeastern Brazil. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2009; 81: 223-227.

Morel CM, Lazdins J. Chagas disease. Nat. Rev. Microbiology. 2003; 1:14-5.

Miyaki CY, Russo CAM, Pereira SL. Reconstrução filogenética. Introdução e o método da máxima parcimônia. In: Matioló SR, Fernandes FMC. Biologia Molecular e Evolução, Ribeirão Preto. Ed. Holos, Sociedade Brasileira de Genética. 2012. 113-122.

Nei M. Relative efficiencies of different tree-making methods for molecular data. "In" Phylogenetic analysis of DNA sequences. Oxford University Press, New York. 1991: 90-128

Nei M, Kumar S. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Editora Oxford University, New York. 2000; 333 pp.

Neiva A, Pinto C. Estado actual dos conhecimentos sôbre o gênero *Rhodnius* Stål, com a descrição de uma nova especie. *Ibid.* 1923; 37: 20-24.

Nelson LA, Wallman JF, Dowton M. Using Coi Barcodes to identify forensically and medically important blowflies. *Med Vet Entomol.* 2007; 21: 44-52.

Noireau F, Santo SM, Gumiel M, Dujardin JP, Soares MS, Carcavallo RU, Galvão C, Jurberg J. Phylogenetics relationships within the oliverai complex (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Infections Genet. Evol.* 2002; 1-17.

Page TJ, Hughes JM. Neither molecular nor morphological data have all the answers; with an example from *Macrobrachium* (Decapoda: Palaemonidae) from Australia. *Zootaxa.* 2011; 2874:65-8.

Paula AS, Diotaiuti L, Schofield CJ. Testing the sister-group relationship of the *Rhodniini* and *Triatomini* (Insecta: Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mol. Phyl. Evol.* 2005; 35: 712-718.

Paula AS, Diotaiuti L, Galvão C. Systematics and biogeography of *Rhodniini* (Heteroptera: Reduviidae: Triatominae) based on 16S mitochondrial rDNA sequences. *J. Biogeography.* 2007; 34: 699-712.

Pavan MG, Monteiro FA. A multiplex PCR assay that separates *Rhodnius prolixus* from members of the *Rhodnius robustus* cryptic species complex (Hemiptera: Reduviidae). *Trop Med Int Health.* 2007; 12: 751-758.

Pavan M, Mesquita RD, Lawrence GG, Lazoski C, Dotson EM, Abubucker S, Mitreva M, Randall-Maher J, Monteiro FA. A nuclear single-nucleotide polymorphism (SNP) potentially useful for the separation of *Rhodnius prolixus* from members of the

Rhodnius robustus cryptic species complex (Hemiptera: Reduviidae). *Infect Genet Evolution*. 2013; 14:426-33.

Pizarro JC, Gilligan LM, Stevens L. Microsatellites Reveal a High Population Structure in *Triatoma infestans* from Chuquisaca, Bolivia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008; 2: e202.

Ratnasingham S, Hebert PDN. BOLD: the barcode of life data system (www.barcodinglife.org) *Mol. Ecol. Notes*. 2007; 7: 355-364.

Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetics trees. *Mol. Biol. Evol*. 1987; 406-425.

Salvatella R, Franca Rodriguez ME, Curto de Casas SI, Barata JMS, Carcavallo RU. Habitats and related fauna/ Habitats e fauna relacionada. B: human habitats, dwellings and peridomiciliary sites / Habitats humanos, habitações e locais peridomiciliares. "In": Carcavallo RU, Galindez Girón I, Jurberg J, Lent H editores. *Atlas of Chagas' Disease Vectors in the Americas / Atlas dos Vetores da Doença de Chagas nas Américas*. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ; 1998. 601-20.

Sainz ACL, Mauro V, Moriyama EM, Garcia BA. Phylogeny of triatomine vectors of *Trypanosoma cruzi* suggested by mitochondrial DNA sequences. *Genetica*. 2004; 121: 229–240.

Silveira AC, Feitosa VR, Borges R. Distribuição de triatomíneos capturados no ambiente domiciliary, no período de 1975/83. *Brasil. Ver. Bras. Malariol. Doenças Trop*. 1984; 39: 15-312.

Silveira, AC, Dias JCP. O controle da transmissão vetorial. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011; 44: 52-63.

Schofield CJ. *Triatominae: Biología y Control*. West Sussex: Eurocommunica Publications.

Schofield CJ, Dujardin JP. Chagas Disease Vector Control in Central America. *Parasitol Today*. 1997; 13 (4): 141-144.

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

Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R. The future of Chagas disease control. *Trends in Parasitology*. 2006; 22: 583–8

Schmunis GA. Prevention of transfusional *Trypanosoma cruzi* infection in Latin America. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999; 94 1:93-101

Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS/MS). Nota técnica: Doença de Chagas aguda por transmissão oral. 2005.

Stal C. Monographie der Gattung *Conorhinus* und Verwandten. *Berliner Ent. Zeitschr.* 1859: 99-117

Stevens MI, Porco D, D’Halse CA, Deharveng L. Comment on “Taxonomy and the DNA Barcoding Enterprise” by Ebach (2011). *Zootaxa*. 2011; 2838:85-8.

Stothard JR, Yamamoto Y, Chercu Y, Garcia AL, Valente SAS, Schofield JC, Miles MA. A preliminary survey of mitochondrial sequence variation within triatominae bugs (Hemiptera: Reduviidae) using single strand conformational polymorphism (SSCP) analysis and direct sequencing. *Bull. Entomol. Res.* 1998; 88: 553-560.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* 2011; 28(10): 2731–2739.

Torres-Pérez F, Acuna-Retamar M, Cook JA, Bacigalupo A, García A, Cattán PE. Statistical phylogeography of Chagas disease vector *Triatoma infestans*: testing biogeographic hypotheses of dispersal. *Infect Genet Evol.* 2011; 1: 167-74.

Vallejo GA, Guhl F, Schaub GA. Triatominae-Trypanosoma cruzi/T. Rangeli: vector-parasite interactions. *Acta Trop.* 2009; 110: 137-47.

Vaz PT, Rezende NGA M, Wanderley Filho JR, Travassos WAS. Bacia do Parnaíba. *Boletim de Geociências da Petrobrás.* 2007; 15(2):253-263.

Ward RD, Hanner R, Hebert, PDN. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *Journal of Fish Biology.* 2009; 74:329-56.

Weirauch, C. and Munro, J.. Molecular phylogeny of the assassin bugs (Hemiptera: Reduviidae), based on mitochondrial and nuclear ribosomal genes. *Mol Phylo Evolution.* 2009; 53: 287-99.

WHO. Control of Chagas disease. Second Report of the WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series. 2002; 905: 1-109.

WHO. Control of Chagas disease. 2013. Fact Sheet no. 340.

9 ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de Polimerização Reconstitutiva (PCR sem Iniciadores)

Protocolo básico

| Reagentes (concentração) | Concentração Final | Quantidade |
|--|------------------------------|------------|
| Tampão 10X (100 mM Tris-HCL, pH 8.3, 500 mM KCL) | 1x; 10mM Tris-HCL, (%)mM KCL | 2,5 µL |
| MgCl ₂ (50mM) | 3,7 mM | 1,85 µL |
| dNTP (2,5mM) | 0,3 µM | 3 µL |
| Taq Polimerase (5U/µL) | 1,5 U | 0,3 µL |
| DNA (60ng) | 4 ng/µL | 5 µL |
| Volume Total | - | 50 µL* |

* Completar o volume com água Milli-Q.

Anexo 2. Protocolo adicionando BSA, DMSO ou Trehalose

Protocolo adicionando BSA (Albumina Soro Bovino)

| Reagentes (concentração) | Concentração Final | Quantidade |
|--|------------------------------|------------|
| Tampão 10X (100 mM Tris-HCL, pH 8.3, 500 mM KCL) | 1x; 10mM Tris-HCL, (%)mM KCL | 2,5 µL |
| MgCl ₂ (50mM) | 3,7 mM | 1,85 µL |
| dNTP (2,5mM) | 0,3 µM | 3 µL |
| Taq Polimerase (5U/µL) | 1,5 U | 0,3 µL |
| DNA (60ng) | 4 ng/µL | 5 µL |
| BSA (10 mg/mL) | 5 mg/mL | 1,25 µL |
| Volume Total | - | 50 µL* |

* Completar o volume com água Milli-Q.

Protocolo adicionando DMSO (Dimetilsulfóxido)

| Reagentes (concentração) | Concentração Final | Quantidade |
|--|------------------------------|------------|
| Tampão 10X (100 mM Tris-HCL, pH 8.3, 500 mM KCL) | 1x; 10mM Tris-HCL, (%)mM KCL | 2,5 µL |
| MgCl ₂ (50mM) | 3,7 mM | 1,85 µL |
| dNTP (2,5mM) | 0,3 µM | 3 µL |
| Taq Polimerase (5U/µL) | 1,5 U | 0,3 µL |
| DNA (60ng) | 4 ng/µL | 5 µL |

| | | |
|--------------|----|---------|
| DMSO (100%) | 1% | 0,25 µL |
| Volume Total | - | 50 µL* |

*** Completar o volume com água Milli-Q.**

Protocolo adicionando Trehalose

| Reagentes (concentração) | Concentração Final | Quantidade |
|--|----------------------------|------------|
| Tampão 10X (100 mM Tris-HCL, pH 8.3, 500 mM KCL) | 1x; 10mM Tris-HCL, %mM KCL | 2,5 µL |
| MgCl ₂ (50mM) | 3,7 mM | 1,85 µL |
| dNTP (2,5mM) | 0,3 µM | 3 µL |
| Taq Polimerase (5U/µL) | 1,5 U | 0,3 µL |
| DNA (60ng) | 4 ng/µL | 5 µL |
| Trehalose (100%) | 10% | 6,15 µL |
| Volume Total | - | 50 µL* |

*** Completar o volume com água Milli-Q.**

Anexo 3: Protocolos para Reação de Amplificação pela PCR

Protocolo para primer HCO-LCO

| Reagentes (concentração) | Concentração Final | Quantidade |
|--|----------------------------|------------|
| Tampão 10X (100 mM Tris-HCL, pH 8.3, 500 mM KCL) | 1x; 10mM Tris-HCL, %mM KCL | 5 µL |
| MgCl ₂ (50mM) | 0,25mM | 5 µL |
| dNTPs (2,5mM) | 5 mM | 5 µL |
| Iniciador senso (10µM) | 0,4 µM | 2 µL |
| Iniciador anti-senso (10µM) | 0,4 µM | 2 µL |
| Taq Polimerase (5U/µL) | 2 U | 0,4 µL |
| DNA | - | 2 µL |
| Volume Total | - | 50 µL* |

*** Completar o volume com água Milli-Q.**

Protocolo para iniciadores ShortR/ShortF; LCO/LepR; LCO/LepR2

| Reagentes (concentração) | Concentração Final | Quantidade |
|--|----------------------------|-------------------|
| Tampão 10X (100 mM Tris-HCL, pH 8.3, 500 mM KCL) | 1x; 10mM Tris-HCL, %mM KCL | 5 µL |
| MgCl ₂ (50mM) | 50 mM | 2,5 µL |
| dNTP (2,5mM) | 2,5,mM | 1 µL |
| Iniciador senso | 0,3 µM | 1,5 µL |
| Iniciador anti-senso | 0,3 µM | 1,5 µL |
| Taq Polimerase (5U/µL) | 1 U | 0,4 µL |
| DNA | - | 3,0 µL |
| Volume Total | - | 50 µL* |

* Completar o volume com água Milli-Q.

Tabela 1. Relação de espécimes provenientes de coleção utilizados para extração de DNA

| Espécie | Coleção depositada | Número de depósito | Ano | Localidade |
|---|--------------------|--------------------|---------|-------------------------------|
| <i>R. amazonicus</i> | Herman Lent | 179 | 1989 | Manaus – INPA |
| <i>R. amazonicus</i> | Herman Lent | 2638 | 1989 | Manaus – INPA |
| <i>R. brethesi</i> | Herman Lent | 1976 | 1954 | Santa Cruz, Venezuela |
| <i>R. brethesi</i> | Herman Lent | 2638 | 1981 | Manaus – INPA |
| <i>R. brethesi</i> | Rodolfo Carcavallo | 2725 | 1994 | - |
| <i>R. brumpti</i> (sin. <i>R. nasutus</i>) | Herman Lent | 634 | 1940 | Ceará, Brasil |
| <i>R. colombiensis</i> | Herman Lent | 2911 | 1999 | Tolima, Colômbia |
| <i>R. colombiensis</i> | Herman Lent | 2910 | 1998 | Tolima, Colômbia |
| <i>R. dalessandroi</i> | Rodolfo Carcavallo | 2668 | 1969 | Barro Colorado |
| <i>R. domesticus</i> | Herman Lent | 650 | 1941 | Jequiá, São Paulo |
| <i>R. domesticus</i> | Rodolfo Carcavallo | 226 | 1974 | Angra dos Reis |
| <i>R. domesticus</i> | Herman Lent | 1798 | 1960 | Florianópolis, Santa Catarina |
| <i>R. ecuadoriensis</i> | Rodolfo Carcavallo | 233 | | - |
| <i>R. ecuadoriensis</i> | Herman Lent | 1808 | 1965 | Peru |
| <i>R. montenegrensis</i> | Herman Lent | 3401 | 2013 | Monte Negro – Rondônia |
| <i>R. montenegrensis</i> | Herman Lent | 3406 | 2013 | Monte Negro – Rondônia |
| <i>R. montenegrensis</i> | Herman Lent | 3409 | 2013 | Monte Negro – Rondônia |
| <i>R. montenegrensis</i> | Herman Lent | 3415 | 2013 | Monte Negro – Rondônia |
| <i>R. nasutus</i> | Herman Lent | 1811 | 1968 | Sobral, Ceará |
| <i>R. neglectus</i> | Rodolfo Carcavallo | 1721 | 1968 | - |
| <i>R. neivai</i> | Herman Lent | 2721 | 1968 | Madalena, Colômbia |
| <i>R. pallescens</i> | Herman Lent | 2668 | Sem ano | Ilha Barro Colorado, Panamá |

| | | | | |
|-----------------------------|--------------------|------|------|---------------------|
| <i>R. pallescens</i> | Rodolfo Carcavallo | 1802 | 1955 | - |
| <i>R. paraensis</i> | Rodolfo Carcavallo | 2666 | 1976 | Belem Para |
| <i>R. pictipes</i> | Herman Lent | 2814 | 1935 | Serra Norte, Pará |
| <i>R. pictipes</i> | Herman Lent | 1842 | 1992 | Rio Claro, Trinidad |
| <i>R. pictipes</i> | Herman Lent | 1843 | 1992 | Sucuá, Equador |
| <i>R. pictipes</i> | Rodolfo Carcavallo | 1853 | | Nicaragua |
| <i>R. prolixus</i> | Rodolfo Carcavallo | 2680 | | Nicaragua |
| <i>R. prolixus</i> | Herman Lent | s/n | 1959 | - |
| <i>R. prolixus</i> | Herman Lent | 1868 | 1953 | Limay, Nicarágua |
| <i>R. prolixus</i> | Rodolfo Carcavallo | 1937 | 1970 | Madre de Dios |
| <i>R. prolixus</i> | Herman Lent | 622 | 1939 | Minas Gerais |
| <i>R. prolixus</i> | Herman Lent | 1940 | - | Teresópolis |
| <i>R. prolixus</i> | Herman Lent | 1935 | 1970 | - |
| <i>R. prolixus</i> | Herman Lent | 1853 | 1954 | Nicarágua |
| <i>R. robustus</i> | Herman Lent | 1940 | 1955 | Bolívia |
| <i>R. robustus</i> | Herman Lent | 652 | 1942 | Peru |
| <i>R. robustus</i> | Herman Lent | 654 | 1999 | Suriname |
| <i>R. robustus</i> | Herman Lent | s/n | 1999 | Suriname |
| <i>R. robustus</i> | Herman Lent | s/n | 1999 | Putumayo - Colômbia |
| <i>R. robustus</i> | Herman Lent | s/n | 1999 | Putumayo - Colômbia |
| <i>R. robustus</i> | Herman Lent | s/n | 1999 | Putumayo - Colômbia |
| <i>R. robustus</i> | Herman Lent | s/n | 1999 | Putumayo - Colômbia |
| <i>R. robustus</i> | Herman Lent | s/n | 1999 | Putumayo - Colômbia |
| <i>R. robustus</i> | Herman Lent | s/n | 1999 | Putumayo - Colômbia |
| <i>R. robustus</i> | Herman Lent | s/n | 1999 | Putumayo - Colômbia |
| <i>R. robustus</i> | Herman Lent | s/n | 1999 | Putumayo - Colômbia |
| <i>R. robustus</i> | Herman Lent | s/n | 1999 | Putumayo - Colômbia |
| <i>R. robustus</i> | Herman Lent | 653 | 1945 | Colômbia |

| | | | | |
|---------------------------|--------------------|-------------|-------------|--------------------|
| <i>R. robustus</i> | Herman Lent | 2687 | 1972 | Trujillo |
| <i>R. robustus</i> | Herman Lent | 2686 | 1974 | Trujillo |
| <i>R. robustus</i> | Herman Lent | 1934 | 1959 | Equador |
| <i>R. robustus</i> | Herman Lent | 1937 | 1959 | Peru |
| <i>R. robustus</i> | Herman Lent | 654 | 1945 | Rio Branco |
| <i>R. stali</i> | Herman Lent | 644 | 1990 | Mato Grosso |

Tabela 2. Relação de espécimes provenientes de colônia do LNIRTT, preservados em álcool e coletados no campo utilizados para extração de DNA:

| Espécie | Coleção depositada | Nº de depósito | Colônia | Ano de início | Localidade |
|-------------------------|---------------------------|-----------------------|----------------|----------------------|---------------------------------------|
| <i>R. brethesi</i> | Herman Lent | 3416 | 78 | 2006 | Laboratório de Medicina Tropical, IOC |
| <i>R. brethesi</i> | Herman Lent | 3417 | 78 | 2006 | Laboratório de Medicina Tropical, IOC |
| <i>R. colombiensis</i> | Herman Lent | 3418 | 79 | 1991 | Tolima, Colômbia |
| <i>R. colombiensis</i> | Herman Lent | 3419 | 79 | 1991 | Tolima, Colômbia |
| <i>R. colombiensis</i> | Herman Lent | 3420 | 79 | 1991 | Tolima, Colômbia |
| <i>R. colombiensis</i> | Herman Lent | 3421 | 79 | 1991 | Tolima, Colômbia |
| <i>R. colombiensis</i> | Herman Lent | 3422 | 79 | 1991 | Tolima, Colômbia |
| <i>R. colombiensis</i> | Herman Lent | 3423 | 79 | 1991 | Tolima, Colômbia |
| <i>R. domesticus</i> | Herman Lent | 3424 | 139 | - | Colônia Aldo Valente, Pará |
| <i>R. domesticus</i> | Herman Lent | 3425 | 139 | - | Colônia Aldo Valente, Pará |
| <i>R. domesticus</i> | Herman Lent | 3426 | 139 | - | Colônia Aldo Valente, Pará |
| <i>R. domesticus</i> | Herman Lent | 3427 | 139 | - | Colônia Aldo Valente, Pará |
| <i>R. domesticus</i> | Herman Lent | 3428 | 139 | - | Colônia Aldo Valente, Pará |
| <i>R. domesticus</i> | Herman Lent | 3429 | 139 | - | Colônia Aldo Valente, Pará |
| <i>R. ecuadoriensis</i> | Herman Lent | 3430 | 84 | 1997 | Província de Manabi, Equador |

| | | | | | |
|--------------------------------|-------------|------|--------|---------|--------------------------------------|
| <i>R. ecuadoriensis</i> | Herman Lent | 3431 | 84 | 1997 | Província de Manabi, Equador |
| <i>R. ecuadoriensis</i> | Herman Lent | 3432 | 84 | 1997 | Província de Manabi, Equador |
| <i>R. ecuadoriensis</i> | Herman Lent | 3433 | 84 | 1997 | Província de Manabi, Equador |
| <i>R. ecuadoriensis</i> | Herman Lent | 3434 | 84 | 1997 | Província de Manabi, Equador |
| <i>R. ecuadoriensis</i> | Herman Lent | 3435 | 84 | 1997 | Província de Manabi, Equador |
| <i>R. milesi</i> | Herman Lent | 3436 | 85 | 2000 | Bragança, Pará, Brasil |
| <i>R. milesi</i> | Herman Lent | 3437 | 85 | 2000 | Bragança, Pará, Brasil |
| <i>R. milesi</i> | Herman Lent | 3537 | 85 | 2000 | Bragança, Pará, Brasil |
| <i>R. nasutus</i> | Herman Lent | 3438 | 89 | 2001 | Jaguaruana, Fortaleza, Ceará, Brasil |
| <i>R. nasutus</i> | Herman Lent | 3538 | 89 | 2001 | Jaguaruana, Fortaleza, Ceará, Brasil |
| <i>R. nasutus</i> | Herman Lent | 3539 | 89 | 2001 | Jaguaruana, Fortaleza, Ceará, Brasil |
| <i>R. nasutus</i> | Herman Lent | 3540 | 89 | 2001 | Jaguaruana, Fortaleza, Ceará, Brasil |
| <i>R. nasutus</i> | Herman Lent | 3541 | 89 | 2001 | Jaguaruana, Fortaleza, Ceará, Brasil |
| <i>R. neglectus</i> | Herman Lent | 3439 | 93 | Sem ano | Município de Formoso, Goiás |
| <i>R. neglectus</i> | Herman Lent | 3542 | 93 | Sem ano | Município de Formoso, Goiás |
| <i>R. neglectus</i> | Herman Lent | 3543 | 95 | Sem ano | Fundação Gonçalo Muniz, Bahia |
| <i>R. neivai</i> | Herman Lent | 3440 | álcool | 1985 | Lara, Venezuela |
| <i>R. neivai</i> | Herman Lent | 3441 | álcool | 1985 | Lara, Venezuela |
| <i>R. neivai</i> | Herman Lent | 3442 | álcool | 1985 | Lara, Venezuela |
| <i>R. pallescens</i> | Herman Lent | 3443 | 97 | 1990 | Pvoado de Vegachi, Colômbia |
| <i>R. paraensis</i> | Herman Lent | 3444 | álcool | - | |

| | | | | | |
|---|-------------|------|-------|------|------------------------|
| <i>R. pictipes</i> | Herman Lent | 3445 | 100 | 1989 | Belém, Pará, Brasil |
| <i>R. prolixus</i> | Herman Lent | 3446 | 106 | - | Edo Guarico, Venezuela |
| <i>R. prolixus olhos vermelhos</i> | Herman Lent | 3447 | 104 | 1995 | Cojedes, Venezuela |
| <i>R. prolixus olhos vermelhos</i> | Herman Lent | 3448 | 104 | 1995 | Cojedes, Venezuela |
| <i>R. prolixus olhos vermelhos</i> | Herman Lent | 3449 | 104 | 1995 | Cojedes, Venezuela |
| <i>R. prolixus olhos vermelhos</i> | Herman Lent | 3450 | 104 | 1995 | Cojedes, Venezuela |
| <i>R. prolixus olhos vermelhos</i> | Herman Lent | 3451 | 104 | 1995 | Cojedes, Venezuela |
| <i>R. prolixus olhos vermelhos</i> | Herman Lent | 3452 | 104 | 1995 | Cojedes, Venezuela |
| <i>R. prolixus olhos vermelhos</i> | Herman Lent | 3453 | 104 | 1995 | Cojedes, Venezuela |
| <i>R. prolixus olhos vermelhos</i> | Herman Lent | 3454 | 104 | 1995 | Cojedes, Venezuela |
| <i>R. prolixus olhos vermelhos</i> | Herman Lent | 3455 | 104 | 1995 | Cojedes, Venezuela |
| <i>R. prolixus olhos vermelhos</i> | Herman Lent | 3456 | 104 | 1995 | Cojedes, Venezuela |
| <i>R. robustus</i> | Herman Lent | 3457 | 110 | 1994 | Loreto, Peru |
| <i>R. robustus</i> | Herman Lent | 3458 | 110 | 1994 | Loreto, Peru |
| <i>R. stali</i> | Herman Lent | 3459 | 112 | 1999 | Alto Beni, Bolívia |
| <i>R. stali</i> | Herman Lent | 3460 | 112 | 1999 | Alto Beni, Bolívia |
| <i>Rhodnius sp.</i> | Herman Lent | 3544 | campo | 2012 | Pará |

Tabela 3. Amostras testadas paralelamente provenientes de campo e colônias do LNIRTT:

| Espécie | Coleção depositada | Nº de depósito | Nºde exemplares | Colônia / campo | Ano | Localidade |
|--------------------------------|--------------------|----------------|-----------------|-----------------|------|--|
| <i>Panstrongylus megistus</i> | Herman Lent | 3461-3463 | 03 | 117 | 1983 | Pedralva, Minas gerais, Brasil |
| <i>Pasmmolestes tertius</i> | Herman Lent | 3464-3468 | 05 | Álcool | 1988 | Formosa, Goiás, Brasil |
| <i>Triatoma carcavalloii</i> | Herman Lent | 3469-3473 | 05 | 08 | 2006 | São Gerônimo, Rio Grande do Sul, Brasil |
| <i>Triatoma circummaculata</i> | Herman Lent | 3474-3478 | 05 | Campo | 2011 | Rincão dos Ventura, Rio grande do Sul, Brasil |
| <i>Triatoma lecticularia</i> | Herman Lent | 3479-3480 | 02 | 32 | 2004 | Waurika, Oklahoma, E.U.A |
| <i>Triatoma protracta</i> | Herman Lent | 3481-3482 | 02 | 47 | 1980 | Monte Diablo, Califórnia, E.U.A |
| <i>Triatoma rubrovaria</i> | Herman Lent | 3483-3487 | 05 | 56 | 2006 | Município de Quevedos, Rio Grande do Sul, Brasil |
| <i>Triatoma sp.</i> | Herman Lent | 3488-3536 | 50 | Campo | 2011 | Rio Grande do Sul, Brasil |

Tabela 4. Resultados da amplificação por PCR para cada par de iniciadores testados. Células achuradas representam resultado.

| Espécie | ID Coleção | Metodo de Extração | Iniciadores utilizados | Resultado Amplificação | |
|-------------------------------------|------------|--------------------|------------------------|------------------------|-----|
| | | | | SIM | NÃO |
| <i>R. amazonicus</i> | 179 | F:E | LCO + HCO | | |
| <i>R. amazonicus</i> | 2638 | F:E | LCO + HCO | | |
| <i>R. amazonicus</i> | 179 | F:E | SHORTR + SHORTF | | |
| <i>R. amazonicus</i> | 2638 | F:E | SHORTR + SHORTF | | |
| <i>R. amazonicus</i> | 2638 | F:E + PR | LCO + LEPR | | |
| <i>R. amazonicus</i> | 179 | F:E + PR | LCO + LEPR | | |
| <i>R. amazonicus</i> | 2638 | F:E + PR | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. amazonicus</i> | - | F:E + PR | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. brethesi</i> | 1976 | F:E | LCO + HCO | | |
| <i>R. brethesi</i> | 1976 | F:E | SHORTR + SHORTF | | |
| <i>R. brethesi</i> | 1976 | F:E + PR | LCO + LEPR | | |
| <i>R. brethesi</i> | 2638 | F:E + PR | LCO + HCO | | |
| <i>R. brethesi</i> | 2638 | F:E | SHORTR + SHORTF | | |
| <i>R. brethesi</i> | 2638 | F:E + PR | LCO + LEPR | | |
| <i>R. brethesi</i> | 2725 | F:E | LCO + HCO | | |
| <i>R. brethesi</i> | 2725 | F:E | SHORTR + SHORTF | | |
| <i>R. brethesi</i> | 2725 | F:E + PR | LCO + LEPR | | |
| <i>R. brumpti (sin. R. nasutus)</i> | 634 | F:E | LCO + HCO | | |
| <i>R. brumpti (sin. R. nasutus)</i> | 634 | F:E | SHORTR + SHORTF | | |
| <i>R. brumpti (sin. R. nasutus)</i> | 634 | F:E + PR | LCO + LEPR | | |
| <i>R. colombiensis</i> | 2911 | F:E | LCO + HCO | | |

| | | | | | |
|--------------------------|------|------------|-----------------|--|--|
| <i>R. colombiensis</i> | 2911 | F:E | SHORTR + SHORTF | | |
| <i>R. colombiensis</i> | 2911 | F:E + PR | LCO + LEPR | | |
| <i>R. colombiensis</i> | 2910 | F:E + PR | LCO + LEPR | | |
| <i>R. colombiensis</i> | 2910 | F:E + PR | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. dalessandroi</i> | 2668 | F:E | LCO + HCO | | |
| <i>R. dalessandroi</i> | 2668 | F:E | SHORTR + SHORTF | | |
| <i>R. dalessandroi</i> | 2668 | F:E + PR | LCO + LEPR | | |
| <i>R. dalessandroi</i> | 2668 | KIT DNA IQ | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. domesticus</i> | 650 | F:E | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. domesticus</i> | 650 | F:E | SHORTR + SHORTF | | |
| <i>R. domesticus</i> | 650 | F:E + PR | LCO + LEPR | | |
| <i>R. domesticus</i> | 226 | F:E | LCO + HCO | | |
| <i>R. domesticus</i> | 226 | F:E | SHORTR + SHORTF | | |
| <i>R. domesticus</i> | 226 | F:E + PR | LCO + LEPR | | |
| <i>R. domesticus</i> | 1798 | F:E | LCO + HCO | | |
| <i>R. domesticus</i> | 1798 | F:E | SHORTR + SHORTF | | |
| <i>R. domesticus</i> | 1798 | F:E + PR | LCO + LEPR | | |
| <i>R. ecuadoriensis</i> | 233 | F:E | LCO + HCO | | |
| <i>R. ecuadoriensis</i> | 233 | F:E | SHORTR + SHORTF | | |
| <i>R. ecuadoriensis</i> | 233 | F:E + PR | LCO + LEPR | | |
| <i>R. ecuadoriensis</i> | 1808 | F:E | LCO + HCO | | |
| <i>R. ecuadoriensis</i> | 1808 | F:E | SHORTR + SHORTF | | |
| <i>R. ecuadoriensis</i> | 1808 | F:E + PR | LCO + LEPR | | |
| <i>R. montenegrensis</i> | 3401 | F:E | LCO + LEPR | | |
| <i>R. montenegrensis</i> | 3401 | F:E + PR | LCO + LEPR2 | | |

| | | | | | |
|--------------------------|------|----------|-----------------|--|--|
| <i>R. montenegrensis</i> | 3406 | F:E | LCO + LEPR | | |
| <i>R. montenegrensis</i> | 3406 | F:E + PR | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. montenegrensis</i> | 3409 | F:E | LCO + LEPR | | |
| <i>R. montenegrensis</i> | 3409 | F:E + PR | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. montenegrensis</i> | 3415 | F:E | LCO + LEPR | | |
| <i>R. montenegrensis</i> | 3415 | F:E + PR | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. nasutus</i> | 1811 | F:E | LCO + HCO | | |
| <i>R. nasutus</i> | 1811 | F:E + PR | LCO + LEPR | | |
| <i>R. nasutus</i> | 1811 | F:E + PR | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. neglectus</i> | 1721 | F:E | LCO + HCO | | |
| <i>R. neglectus</i> | 1721 | F:E | SHORTR + SHORTF | | |
| <i>R. neglectus</i> | 1721 | F:E + PR | LCO + LEPR | | |
| <i>R. neivai</i> | 2721 | F:E | LCO + HCO | | |
| <i>R. neivai</i> | 2721 | F:E + PR | LCO + LEPR | | |
| <i>R. neivai</i> | 2721 | F:E + PR | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. pallescens</i> | 2668 | F:E | LCO + HCO | | |
| <i>R. pallescens</i> | 2668 | F:E | SHORTR + SHORTF | | |
| <i>R. pallescens</i> | 2668 | F:E + PR | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. pallescens</i> | 1802 | F:E | LCO + HCO | | |
| <i>R. pallescens</i> | 1802 | F:E + PR | LCO + LEPR | | |
| <i>R. pallescens</i> | 1802 | F:E + PR | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. paraensis</i> | 2666 | F:E | LCO + HCO | | |
| <i>R. paraensis</i> | 2666 | F:E | SHORTR + SHORTF | | |
| <i>R. paraensis</i> | 2666 | F:E + PR | LCO + LEPR | | |
| <i>R. picitipes</i> | 2814 | F:E | LCO + HCO | | |

| | | | | | |
|--------------------|------|----------|-----------------|--|--|
| <i>R. pictipes</i> | 2814 | F:E | SHORTR + SHORTF | | |
| <i>R. pictipes</i> | 2814 | F:E + PR | LCO + LEPR | | |
| <i>R. pictipes</i> | 1842 | F:E | LCO + HCO | | |
| <i>R. pictipes</i> | 1842 | F:E | SHORTR + SHORTF | | |
| <i>R. pictipes</i> | 1842 | F:E + PR | LCO + LEPR | | |
| <i>R. pictipes</i> | 1843 | F:E + PR | LCO + LEPR | | |
| <i>R. pictipes</i> | 1843 | F:E + PR | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. pictipes</i> | 2814 | F:E | LCO + LEPR | | |
| <i>R. pictipes</i> | 2814 | F:E + PR | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. prolixus</i> | 2680 | F:E | LCO + HCO | | |
| <i>R. prolixus</i> | 2680 | F:E | SHORTR + SHORTF | | |
| <i>R. prolixus</i> | 2680 | F:E + PR | LCO + LEPR | | |
| <i>R. prolixus</i> | s/n | F:E | LCO + HCO | | |
| <i>R. prolixus</i> | s/n | F:E | SHORTR + SHORTF | | |
| <i>R. prolixus</i> | s/n | F:E + PR | LCO + LEPR | | |
| <i>R. prolixus</i> | s/n | F:E | LCO + LEPR | | |
| <i>R. prolixus</i> | s/n | F:E + PR | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. prolixus</i> | 1940 | F:E | LCO + LEPR | | |
| <i>R. prolixus</i> | 1940 | F:E + PR | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. prolixus</i> | 622 | F:E | LCO + LEPR | | |
| <i>R. prolixus</i> | 622 | F:E + PR | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. prolixus</i> | 1935 | F:E | LCO + LEPR | | |
| <i>R. prolixus</i> | 1935 | F:E + PR | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. prolixus</i> | 1937 | F:E | LCO + LEPR | | |
| <i>R. prolixus</i> | 1937 | F:E + PR | LCO + LEPR2 | | |

| | | | | | |
|--------------------|------|----------|-----------------|--|--|
| <i>R. prolixus</i> | 1853 | F:E | LCO + LEPR | | |
| <i>R. prolixus</i> | 1853 | F:E + PR | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. robsutus</i> | 1940 | F:E | LCO + HCO | | |
| <i>R. robsutus</i> | 1940 | F:E | SHORTR + SHORTF | | |
| <i>R. robsutus</i> | 1940 | F:E + PR | LCO + LEPR | | |
| <i>R. robsutus</i> | 1940 | F:E | LCO + HCO | | |
| <i>R. robsutus</i> | 1940 | F:E | SHORTR + SHORTF | | |
| <i>R. robsutus</i> | 1940 | F:E + PR | LCO + LEPR | | |
| <i>R. robustus</i> | 643 | F:E | LCO + HCO | | |
| <i>R. robustus</i> | 643 | F:E | SHORTR + SHORTF | | |
| <i>R. robustus</i> | 643 | F:E + PR | LCO + LEPR | | |
| <i>R. robustus</i> | s/n | F:E | LCO + HCO | | |
| <i>R. robustus</i> | s/n | F:E | SHORTR + SHORTF | | |
| <i>R. robustus</i> | s/n | F:E + PR | LCO + LEPR | | |
| <i>R. robustus</i> | s/n | F:E | LCO + HCO | | |
| <i>R. robustus</i> | s/n | F:E | SHORTR + SHORTF | | |
| <i>R. robustus</i> | s/n | F:E + PR | LCO + LEPR | | |
| <i>R. robustus</i> | s/n | F:E | LCO + HCO | | |
| <i>R. robustus</i> | s/n | F:E | SHORTR + SHORTF | | |
| <i>R. robustus</i> | s/n | F:E + PR | LCO + LEPR | | |
| <i>R. robustus</i> | s/n | F:E | LCO + HCO | | |
| <i>R. robustus</i> | s/n | F:E | SHORTR + SHORTF | | |
| <i>R. robustus</i> | s/n | F:E + PR | LCO + LEPR | | |
| <i>R. robustus</i> | s/n | F:E | LCO + HCO | | |
| <i>R. robustus</i> | s/n | F:E | SHORTR + SHORTF | | |

| | | | | | |
|--------------------|------|----------|-----------------|--|--|
| <i>R. robustus</i> | s/n | F:E + PR | LCO + LEPR | | |
| <i>R. robustus</i> | s/n | F:E | LCO + HCO | | |
| <i>R. robustus</i> | s/n | F:E | SHORTR + SHORTF | | |
| <i>R. robustus</i> | s/n | F:E + PR | LCO + LEPR | | |
| <i>R. robustus</i> | s/n | F:E | LCO + HCO | | |
| <i>R. robustus</i> | s/n | F:E | SHORTR + SHORTF | | |
| <i>R. robustus</i> | s/n | F:E + PR | LCO + LEPR | | |
| <i>R. robustus</i> | s/n | F:E | LCO + HCO | | |
| <i>R. robustus</i> | s/n | F:E | SHORTR + SHORTF | | |
| <i>R. robustus</i> | s/n | F:E + PR | LCO + LEPR | | |
| <i>R. robustus</i> | s/n | F:E | LCO + HCO | | |
| <i>R. robustus</i> | s/n | F:E | SHORTR + SHORTF | | |
| <i>R. robustus</i> | s/n | F:E + PR | LCO + LEPR | | |
| <i>R. robustus</i> | s/n | F:E | LCO + HCO | | |
| <i>R. robustus</i> | s/n | F:E | SHORTR + SHORTF | | |
| <i>R. robustus</i> | s/n | F:E + PR | LCO + LEPR | | |
| <i>R. robustus</i> | s/n | F:E | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. robustus</i> | 652 | F:E + PR | LCO + LEPR | | |
| <i>R. robustus</i> | 652 | F:E + PR | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. robustus</i> | 652 | F:E | LCO + HCO | | |
| <i>R. robustus</i> | 653 | F:E | SHORTR + SHORTF | | |
| <i>R. robustus</i> | 653 | F:E + PR | LCO + LEPR | | |
| <i>R. robustus</i> | 653 | F:E | LCO + LEPR | | |
| <i>R. robustus</i> | 653 | F:E + PR | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. robustus</i> | 2687 | F:E | LCO + LEPR | | |

| | | | | | |
|------------------------|------|----------|-----------------|--|--|
| <i>R. robustus</i> | 2687 | F:E + PR | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. robustus</i> | 2686 | F:E | LCO + LEPR | | |
| <i>R. robustus</i> | 2686 | F:E + PR | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. robustus</i> | 1934 | F:E | LCO + LEPR | | |
| <i>R. robustus</i> | 1934 | F:E + PR | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. robustus</i> | 1937 | F:E | LCO + LEPR | | |
| <i>R. robustus</i> | 1937 | F:E + PR | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. robustus</i> | 654 | F:E | LCO + LEPR | | |
| <i>R. robustus</i> | 654 | F:E + PR | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. stali</i> | 644 | F:E | LCO + LEPR | | |
| <i>R. stali</i> | 644 | F:E + PR | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. brethesi</i> | 3417 | KIT RBC | LCO + HCO | | |
| <i>R. brethesi</i> | 3417 | KIT RBC | SHORTR + SHORTF | | |
| <i>R. brethesi</i> | 3417 | KIT RBC | LCO + LEPR | | |
| <i>R. colombiensis</i> | 3418 | KIT RBC | LCO + HCO | | |
| <i>R. colombiensis</i> | 3418 | KIT RBC | SHORTR + SHORTF | | |
| <i>R. colombiensis</i> | 3418 | KIT RBC | LCO + LEPR | | |
| <i>R. colombiensis</i> | 3418 | KIT RBC | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. colombiensis</i> | 3419 | KIT RBC | LCO + HCO | | |
| <i>R. colombiensis</i> | 3419 | KIT RBC | SHORTR + SHORTF | | |
| <i>R. colombiensis</i> | 3419 | KIT RBC | LCO + LEPR | | |
| <i>R. colombiensis</i> | 3419 | KIT RBC | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. colombiensis</i> | 3420 | KIT RBC | LCO + HCO | | |
| <i>R. colombiensis</i> | 3420 | KIT RBC | SHORTR + SHORTF | | |
| <i>R. colombiensis</i> | 3420 | KIT RBC | LCO + LEPR | | |

| | | | | | |
|------------------------|------|------------|-----------------|--|--|
| <i>R. colombiensis</i> | 3420 | KIT RBC | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. colombiensis</i> | 3421 | KIT RBC | LCO + HCO | | |
| <i>R. colombiensis</i> | 3421 | KIT RBC | SHORTR + SHORTF | | |
| <i>R. colombiensis</i> | 3421 | KIT RBC | LCO + LEPR | | |
| <i>R. colombiensis</i> | 3421 | KIT RBC | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. colombiensis</i> | 3422 | KIT RBC | LCO + HCO | | |
| <i>R. colombiensis</i> | 3422 | KIT RBC | SHORTR + SHORTF | | |
| <i>R. colombiensis</i> | 3422 | KIT RBC | LCO + LEPR | | |
| <i>R. colombiensis</i> | 3422 | KIT RBC | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. colombiensis</i> | 3423 | KIT RBC | LCO + HCO | | |
| <i>R. colombiensis</i> | 3423 | KIT RBC | SHORTR + SHORTF | | |
| <i>R. colombiensis</i> | 3423 | KIT RBC | LCO + LEPR | | |
| <i>R. colombiensis</i> | 3423 | KIT RBC | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. domesticus</i> | 3424 | KIT RBC | LCO + HCO | | |
| <i>R. domesticus</i> | 3424 | KIT RBC | SHORTR + SHORTF | | |
| <i>R. domesticus</i> | 3424 | KIT RBC | LCO + LEPR | | |
| <i>R. domesticus</i> | 3424 | KIT RBC | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. domesticus</i> | 3425 | KIT RBC | LCO + HCO | | |
| <i>R. domesticus</i> | 3425 | KIT RBC | SHORTR + SHORTF | | |
| <i>R. domesticus</i> | 3425 | KIT RBC | LCO + LEPR | | |
| <i>R. domesticus</i> | 3425 | KIT RBC | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. domesticus</i> | 3426 | KIT DNA IQ | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. domesticus</i> | 3427 | KIT DNA IQ | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. domesticus</i> | 3428 | KIT DNA IQ | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. domesticus</i> | 3429 | KIT DNA IQ | LCO + LEPR2 | | |

| | | | | | |
|-------------------------|------|------------|-----------------|--|--|
| <i>R. ecuadoriensis</i> | 3430 | KIT RBC | LCO + HCO | | |
| <i>R. ecuadoriensis</i> | 3430 | KIT RBC | SHORTR + SHORTF | | |
| <i>R. ecuadoriensis</i> | 3430 | KIT RBC | LCO + LEPR | | |
| <i>R. ecuadoriensis</i> | 3430 | KIT RBC | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. ecuadoriensis</i> | 3431 | KIT RBC | LCO + HCO | | |
| <i>R. ecuadoriensis</i> | 3431 | KIT RBC | SHORTR + SHORTF | | |
| <i>R. ecuadoriensis</i> | 3431 | KIT RBC | LCO + LEPR | | |
| <i>R. ecuadoriensis</i> | 3431 | KIT RBC | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. ecuadoriensis</i> | 3432 | KIT DNA IQ | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. ecuadoriensis</i> | 3433 | KIT DNA IQ | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. ecuadoriensis</i> | 3434 | KIT DNA IQ | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. ecuadoriensis</i> | 3435 | KIT DNA IQ | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. milesi</i> | 3436 | KIT RBC | LCO + HCO | | |
| <i>R. milesi</i> | 3436 | KIT RBC | LCO + LEPR | | |
| <i>R. milesi</i> | 3437 | KIT RBC | LCO + HCO | | |
| <i>R. milesi</i> | 3437 | KIT RBC | LCO + LEPR | | |
| <i>R. milesi</i> | 3537 | KIT RBC | LCO + LEPR | | |
| <i>R. nasutus</i> | 3438 | KIT RBC | LCO + HCO | | |
| <i>R. nasutus</i> | 3438 | KIT RBC | LCO + LEPR | | |
| <i>R. nasutus</i> | 3438 | KIT RBC | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. nasutus</i> | 3438 | KIT RBC | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. nasutus</i> | 3438 | KIT RBC | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. nasutus</i> | 3438 | KIT RBC | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. nasutus</i> | 3438 | KIT RBC | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. neglectus</i> | 3439 | KIT RBC | LCO + HCO | | |

| | | | | | |
|------------------------------------|------|------------|-----------------|--|--|
| <i>R. neglectus</i> | 3439 | KIT RBC | LCO + LEPR | | |
| <i>R. neglectus</i> | 3439 | KIT RBC | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. neglectus</i> | 3439 | KIT RBC | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. neivai</i> | 3440 | KIT RBC | LCO + HCO | | |
| <i>R. neivai</i> | 3440 | KIT RBC | SHORTR + SHORTF | | |
| <i>R. neivai</i> | 3440 | KIT RBC | LCO + LEPR | | |
| <i>R. neivai</i> | 3440 | KIT RBC | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. neivai</i> | 3441 | KIT DNA IQ | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. neivai</i> | 3442 | KIT DNA IQ | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. pallescens</i> | 3443 | KIT RBC | LCO + HCO | | |
| <i>R. pallescens</i> | 3443 | KIT RBC | LCO + LEPR | | |
| <i>R. paraensis</i> | 3444 | KIT RBC | LCO + HCO | | |
| <i>R. paraensis</i> | 3444 | KIT RBC | LCO + LEPR | | |
| <i>R. paraensis</i> | 3444 | KIT RBC | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. pictipes</i> | 3445 | KIT RBC | LCO + HCO | | |
| <i>R. pictipes</i> | 3445 | KIT RBC | LCO + LEPR | | |
| <i>R. prolixus</i> | 3446 | KIT RBC | LCO + HCO | | |
| <i>R. prolixus</i> | 3446 | KIT RBC | LCO + LEPR | | |
| <i>R. prolixus olhos vermelhos</i> | 3447 | KIT RBC | LCO + HCO | | |
| <i>R. prolixus olhos vermelhos</i> | 3447 | KIT RBC | LCO + LEPR | | |
| <i>R. prolixus olhos vermelhos</i> | 3447 | KIT RBC | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. prolixus olhos vermelhos</i> | 3448 | KIT RBC | LCO + HCO | | |
| <i>R. prolixus olhos vermelhos</i> | 3448 | KIT RBC | LCO + LEPR | | |
| <i>R. prolixus olhos vermelhos</i> | 3448 | KIT RBC | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. prolixus olhos vermelhos</i> | 3449 | KIT DNA IQ | LCO + LEPR2 | | |

| | | | | | |
|------------------------------------|------|------------|-------------|--|--|
| <i>R. prolixus olhos vermelhos</i> | 3450 | KIT DNA IQ | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. prolixus olhos vermelhos</i> | 3451 | KIT DNA IQ | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. prolixus olhos vermelhos</i> | 3452 | KIT RBC | LCO + HCO | | |
| <i>R. prolixus olhos vermelhos</i> | 3453 | KIT DNA IQ | LCO + LEPR | | |
| <i>R. prolixus olhos vermelhos</i> | 3454 | KIT DNA IQ | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. prolixus olhos vermelhos</i> | 3455 | KIT RBC | LCO + HCO | | |
| <i>R. prolixus olhos vermelhos</i> | 3455 | KIT RBC | LCO + LEPR | | |
| <i>R. prolixus olhos vermelhos</i> | 3455 | KIT RBC | LCO + HCO | | |
| <i>R. prolixus olhos vermelhos</i> | 3456 | KIT RBC | LCO + HCO | | |
| <i>R. prolixus olhos vermelhos</i> | 3456 | KIT RBC | LCO + LEPR | | |
| <i>R. prolixus olhos vermelhos</i> | 3456 | KIT RBC | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. robustus</i> | 3457 | KIT RBC | LCO + HCO | | |
| <i>R. robustus</i> | 3457 | KIT RBC | LCO + LEPR | | |
| <i>R. robustus</i> | 3457 | KIT RBC | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. robustus</i> | 3458 | KIT RBC | LCO + HCO | | |
| <i>R. robustus</i> | 3458 | KIT RBC | LCO + LEPR | | |
| <i>R. robustus</i> | 3458 | KIT RBC | LCO + LEPR2 | | |
| <i>R. stali</i> | 3459 | KIT RBC | LCO + HCO | | |
| <i>R. stali</i> | 3459 | KIT RBC | LCO + LEPR | | |
| <i>R. stali</i> | 3460 | KIT RBC | LCO + HCO | | |
| <i>R. stali</i> | 3460 | KIT RBC | LCO + LEPR | | |
| <i>Panstrongylus megistus</i> | 3461 | KIT RBC | LCO + HCO | | |
| <i>Panstrongylus megistus</i> | 3462 | KIT RBC | LCO + HCO | | |
| <i>Panstrongylus megistus</i> | 3463 | KIT RBC | LCO + HCO | | |
| <i>Pasmolestes tertius</i> | 3464 | KIT RBC | LCO + LEPR2 | | |

| | | | | | |
|--------------------------------|-----------|------------|-------------------|--|--|
| <i>Pasmmolestes tertius</i> | 3465 | KIT RBC | LCO + LEPR2 | | |
| <i>Pasmmolestes tertius</i> | 3466 | KIT RBC | LCO + LEPR2 | | |
| <i>Pasmmolestes tertius</i> | 3467 | KIT RBC | LCO + LEPR2 | | |
| <i>Pasmmolestes tertius</i> | 3468 | KIT RBC | LCO + LEPR2 | | |
| <i>Triatoma carcavalloi</i> | 3469 | KIT RBC | LCO + HCO | | |
| <i>Triatoma carcavalloi</i> | 3470 | KIT RBC | LCO + HCO | | |
| <i>Triatoma carcavalloi</i> | 3471 | KIT RBC | LCO + HCO | | |
| <i>Triatoma carcavalloi</i> | 3472 | KIT RBC | LCO + HCO | | |
| <i>Triatoma carcavalloi</i> | 3473 | KIT RBC | LCO + HCO | | |
| <i>Triatoma circummaculata</i> | 3474 | KIT RBC | LCO + HCO | | |
| <i>Triatoma circummaculata</i> | 3475 | KIT RBC | LCO + HCO | | |
| <i>Triatoma circummaculata</i> | 3476 | KIT RBC | KIT RBC LCO + HCO | | |
| <i>Triatoma circummaculata</i> | 3477 | KIT RBC | LCO + HCO | | |
| <i>Triatoma circummaculata</i> | 3478 | KIT RBC | LCO + HCO | | |
| <i>Triatoma lecticularia</i> | 3479 | KIT DNA IQ | LCO + LEPR2 | | |
| <i>Triatoma lecticularia</i> | 3480 | KIT DNA IQ | LCO + LEPR2 | | |
| <i>Triatoma protracta</i> | 3481 | KIT DNA IQ | LCO + LEPR2 | | |
| <i>Triatoma protracta</i> | 3482 | KIT DNA IQ | LCO + LEPR2 | | |
| <i>Triatoma rubrovaria</i> | 3483 | KIT RBC | LCO + HCO | | |
| <i>Triatoma rubrovaria</i> | 3484 | KIT RBC | LCO + HCO | | |
| <i>Triatoma rubrovaria</i> | 3485 | KIT RBC | LCO + HCO | | |
| <i>Triatoma rubrovaria</i> | 3486 | KIT RBC | LCO + HCO | | |
| <i>Triatoma rubrovaria</i> | 3487 | KIT RBC | LCO + HCO | | |
| <i>Triatoma sp.</i> | 3488-3536 | KIT RBC | LCO + HCO | | |

Tabela 5. Relação de espécimes utilizados para a análise das sequências.

| Amostra | Nº de depósito | Primer utilizado | Nº de pares de bases | Localização no Gene |
|--------------------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| <i>Rhodnius brethesi</i> | 3416 | LCO1490 + HCO2198 | 572 pb | 1429-2001 |
| <i>Rhodnius brethesi</i> | 3417 | LCO 1490 + LEPR | 651 pb | 1429-2080 |
| <i>Rhodnius colombiensis</i> | 3418 | LCO1490-L + LEPR2 | 213 pb | 1472-1685 |
| <i>Rhodnius colombiensis</i> | 3419 | LCO1490-L + LEPR2 | 255 pb | 1430-1685 |
| <i>Rhodnius domesticus</i> | 3427 | LCO1490-L + LEPR2 | 170 pb | 1516-1686 |
| <i>Rhodnius ecuadoriensis</i> | 3430 | LCO1490-L + LEPR2 | 253 pb | 1429-1682 |
| <i>Rhodnius ecuadoriensis</i> | 3432 | LCO1490-L + LEPR2 | 252 pb | 1430-1682 |
| <i>Rhodnius ecuadoriensis</i> | 3433 | LCO1490-L + LEPR2 | 210 pb | 1472-1682 |
| <i>Rhodnius ecuadoriensis</i> | 3434 | LCO1490-L + LEPR2 | 252 pb | 1430-1682 |
| <i>Rhodnius milesi</i> | 3436 | LCO 1490 + LEPR | 657 pb | 1429-2086 |
| <i>Rhodnius milesi</i> | 3437 | LCO 1490 + LEPR | 657 pb | 1429-2086 |
| <i>Rhodnius milesi</i> | 3537 | LCO 1490 + LEPR | 229 pb | 1429-1654 |
| <i>Rhodnius montenegrensis</i> | 3406 | LCO1490-L + LEPR2 | 241 pb | 1442-1683 |
| <i>Rhodnius montenegrensis</i> | 3409 | LCO1490-L + LEPR2 | 243 pb | 1442-1685 |
| <i>Rhodnius nasutus</i> | 3438 | LCO1490-L + LEPR2 | 238 pb | 1447-1685 |
| <i>Rhodnius nasutus</i> | 3538 | LCO1490-L + LEPR2 | 230 pb | 1455-1685 |
| <i>Rhodnius nasutus</i> | 3539 | LCO1490-L + LEPR2 | 238 pb | 1447-1685 |

| | | | | |
|--|------|-------------------|--------|-----------|
| <i>Rhodnius nasutus</i> | 3540 | LCO1490-L + LEPR2 | 220 pb | 1465-1685 |
| <i>Rhodnius nasutus</i> | 3541 | LCO1490-L + LEPR2 | 209 pb | 1465-1674 |
| <i>Rhodnius neglectus</i> | 3439 | LCO1490 + HCO2198 | 657 pb | 1429-2086 |
| <i>Rhodnius neglectus</i> | 3542 | LCO1490 + HCO2198 | 657 pb | 1429-2086 |
| <i>Rhodnius neglectus</i> | 3543 | LCO1490-L + LEPR2 | 657 pb | 1429-2086 |
| <i>Rhodnius pallescens</i> | 3443 | LCO1490 + HCO2198 | 657 pb | 1429-2086 |
| <i>Rhodnius pictipes</i> | 3445 | LCO1490 + HCO2198 | 538 pb | 1463-2001 |
| <i>Rhodnius prolixus</i> | 3446 | LCO1490 + HCO2198 | 657 pb | 1429-2086 |
| <i>Rhodnius prolixus olhos vermelhos</i> | 3449 | LCO1490-L + LEPR2 | 256 pb | 1429-1685 |
| <i>Rhodnius prolixus olhos vermelhos</i> | 3451 | LCO1490-L + LEPR2 | 256 pb | 1429-1685 |
| <i>Rhodnius prolixus olhos vermelhos</i> | 3452 | LCO1490-L + LEPR2 | 221 pb | 1464-1685 |
| <i>Rhodnius prolixus olhos vermelhos</i> | 3453 | LCO1490-L + LEPR2 | 149 pb | 1464-1613 |
| <i>Rhodnius prolixus olhos vermelhos</i> | 3454 | LCO1490-L + LEPR2 | 210 pb | 1464-1674 |
| <i>Rhodnius robustus</i> | 3457 | LCO1490 + HCO2198 | 657 pb | 1429-2086 |
| <i>Rhodnius stali</i> | 3460 | LCO1490 + HCO2198 | 657 pb | 1429-2086 |

Figura 23. Alinhamento das sequências obtidas

```

1 1111111112 2222222223 3333333334 4444444445 5555555556 6666666667 7777777778 8888888889 9999999990
1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890
#R_brethesi_3633 -AACTCTTA TTTTACTA GGAGCCTGAG CTGGAATATT AGGTACATCA TTAAGCTGAA TTATTCGTAT TGAAGCTGGA CAACCAGGCC CATTATTGG
#R_brethesi_3681 -.....
#R_brethesi_Justi -.....
#R_colombiensis1 ----- --A.....A.....T..t..
#R_colombiensis16 --.....G..T.....A.....A.....A.....T.....
#R_domesticus -----.....T.....T.....
#R_ecuadoriensis12 --.....A.....G..T.....A.....T.....T.....
#R_ecuadoriensis13 --.....C.....G.....T.....T.....
#R_ecuadoriensis14 -----.....A.....G..T.....A.....T.....T.....
#R_ecuadoriensis15 --.....A.....G..T.....A.....T.....T.....
#R_milesi1_4064 -...C..A...C...G..T..T...A.....C...A..C.....T.....
#R_milesi2_4064 -...C..A...C...G..T..T...A.....C...A..C.....T.....
#R_milesi_4322 -...C..A...C...G..T..T...A.....C...A..C.....T.....
#R_montenegrensis2 ----- --C...G..T..A...TGr...A.....C.....C...A..T.....T.....
#R_montenegrensis1 ----- --C...G..TA..A...TArr...A.....C.....C...A..T.....T.....
#R_neivai_genbank -----.....C.....C...A..T...G...T.?C..
#R_nasutus_p1 -----.....G..T...G..C.....G.....C.....C...A..C.....T.....
#R_nasutus_p2 -----.....G..C.....A.....C.....C...A..C.....T.....
#R_nasutus1 -----.....G..T...G..C.....A.....C.....C...A..C.....T.....
#R_nasutus2 -----.....A.....C.....C...A..C.....T.....
#R_nasutus3 -----.....A.....C.....C...A..C.....T.....
#R_neglectus_3211 -...C..A...C...G..T..T...A.....C...A..C.....T.....T.....
#R_neglectus_3633 -...C..A...C...G..T..T...A.....C...A..C.....T.....T.....
#R_neglectus_3681 -...C..A...C...G..T..T...A.....C...A..C.....T.....T.....
#R_pallescens_3681 -G.....A.....A.....T.....T.....
#R_pictipes_3633 -----.....T.....
#R_pictipes_genbank -----.....?..?..?..C..?T..A..?.....?..?T..?..T.....
#R_pictipes_Justi --.....C.....C.....T.....
#R_prolixus_4064 -...C..A...G...T...G..CA.....A.....C.....C...A..C.....T.....T.....
#R_prolixus_genbank -----.....C.....C...A..T...G...T.?C..
#R_prolixus_ov24 -...C..G...C..C...T.....A.....C.....C...A..T.....G.....T.....
#R_prolixus_ov25 -...C..G...C..C...T.....A.....C.....C...A..T.....G.....T.....
#R_prolixus_ov22 -----.....A.....C.....C...A..T.....G.....T.....
#R_prolixus_ov21 -----.....A.....C.....C...A..T.....G.....T.....
#R_prolixus_ov23 -----.....A.....C.....C...A..T.....G.....T.....
#R_robustus_3682 -...C..A...G...T...G..CA.....A.....C.....C...A..C.....T.....T.....
#R_stali_3633 -.....G...A...G.....T.....
#R_stali_Justi -.....G...A...G.....T.....
#rhodnius -G.....r.....
#T_circummaculata --.....A.GT.C.....A.....A.....T C.T..A..GT .A.....A.....A.....AT .C.....
#T_rubrovaria -.CTCT....A.GT.C.....A.....A.....T A.T..A..GT .A.....A.....A..G.....AT .C.....

```


| | 1111111111 | 1111111111 | 1111111111 | 1111111111 | 1111111111 | 1111111111 | 1111111111 | 1111111111 | 1111111111 | 1111111111 | 1111111112 |
|---------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|
| | 0000000001 | 1111111112 | 2222222223 | 3333333334 | 4444444445 | 5555555556 | 6666666667 | 7777777778 | 8888888889 | 9999999990 | |
| | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 |
| | AGACGATCAA | ATTTACAATG | TAATTGTAAC | AGCACACGCC | TTTGTTATAA | TTTTCTTTAT | AGTCATACCA | ATTATAATTG | GAGGATTCGG | AAATTGATTA | |
| #R_brethesi_3633 | | | | | | | | | | | |
| #R_brethesi_3681 | | | | | | | | | | | |
| #R_brethesi_Justi | | | | | | | | | | | |
| #R_colombiensis1 | ..T..... |T... |C..... | ..C..... | ..C..... | ..C..... | ..C..... | ..T..... | ..C..... |T.. | ..C..... |
| #R_colombiensis16 | ..T..... |T... |C..... | ..C..... | ..C..... | ..C..... | ..C..... | ..T..... | ..C..... |T.. | ..C..... |
| #R_domesticus | ..T..C... |T... |C..... | ..T..T.. | ..CA..... | ..C..... | ..C..... | ..A..... |T.. |C..... | |
| #R_ecuadoriensis12 | ..T..... |T... |C..... | ..C..... | ..C..C... | ..C..... | ..C..... | ..T..... | | | |
| #R_ecuadoriensis13 | ..T..... |T... |C..... | ..C..... | ..C..C... | ..C..... | ..C..... | ..T..... | | | |
| #R_ecuadoriensis14 | ..T..... |T... |C..... | ..C..... | ..C..C... | ..C..... | ..C..... | ..T..... | | | |
| #R_ecuadoriensis15 | ..T..... |T... |C..... | ..C..... | ..C..C... | ..C..... | ..C..... | ..T..... | | | |
| #R_milesi1_4064 | ..T..... |T... |C..... | ..T..... | ..C..... | ..C..... | ..C..... | ..T..... | | | ..C..... |
| #R_milesi2_4064 | ..T..... |T... |C..... | ..T..... | ..C..... | ..C..... | ..C..... | ..T..... | | | ..C..... |
| #R_milesi_4322 | ..T..... |T... |C..... | ..T..... | ..C..... | ..C..... | ..C..... | ..T..... | | | ..C..... |
| #R_montenegrensis2 | ..T..... | ..C..T... | A..T..C... |T... | ..C..... | ..C..... | ..C..... | G..T..... | | A..... | ..C..... |
| #R_montenegrensis1 | ..T..... | ..C..T... | ..C..... |T... | ..C..... | ..C..... | ..C..... | G..T..... | | | ..C...C.. |
| #R_neivai_genbank | ..T..C... |T... |C..... |T... | ..A..... | ..C..... | ..C..... | ..T..... | | | |
| #R_nasutus_p1 | G..T..... |T... |C..... |T... | ..C..... | ..C..... | ..C..... | ..A..... | | | ..G..... |
| #R_nasutus_p2 | G..T..... |T... |C..... |T... | ..C..... | ..C..... | ..C..... | ..A..... | | | ..G..... |
| #R_nasutus1 | G..T..... |T... |C..... |T... | ..C..... | ..C..... | ..C..... | ..A..... | | | ..G..... |
| #R_nasutus2 | G..T..... |T... |C..... |T... | ..C..... | ..C..... | ..C..... | ..A..... | | | ..G..... |
| #R_nasutus3 | G..T..... |T... |C..... |T... | ..C..... | ..C..... | ..C..... | ..A..... | | | ..G..... |
| #R_neglectus_3211 | ..T..... |T... |C..... |T... | ..C..... | ..C..... | ..C..... | ..T..... | | | ..C..... |
| #R_neglectus_3633 | ..T..... |T... |C..... |T... | ..C..... | ..C..... | ..C..... | ..T..... | | | ..C..... |
| #R_neglectus_3681 | ..T..... |T... |C..... |T... | ..C..... | ..C..... | ..C..... | ..T..... | | | ..C..... |
| #R_pallescens_3681 | ..T..... |T... |C..... | ..C..... | ..C..... | ..C..... | ..C..... | ..T..... | | | ..C..... |
| #R_pictipes_3633 | T..T..... |T... |C..... |T... | ..C..... | ..C..... | ..C..... | ..T..... | | | ..C..... |
| #R_pictipes_genbank | T..T..... |T... |C..... |T... | ..C..... | ..C..... | ..C..... | ..T..... | | | ..C..... |
| #R_pictipes_Justi | T..T..... |T... |C..... |T... | ..C..... | ..C..... | ..C..... | ..T..... | | | ..C..... |
| #R_prolixus_4064 | ..T..... |T... |C..... |T... | ..C..... | ..C..... | ..C..... | ..A..... | | | ..C..... |
| #R_prolixus_genbank | ..T..... |T... |C..... |T... | ..C..... | ..C..... | ..C..... | ..T..... | | | ..C..... |
| #R_prolixus_ov24 | ..T..... |T... |C..... |T... | ..C..... | ..C..... | ..C..... | ..T..... | | ..G..... | ..C..... |
| #R_prolixus_ov25 | ..T..... |T... |C..... |T... | ..C..... | ..C..... | ..C..... | ..T..... | | ..G..... | ..C..... |
| #R_prolixus_ov22 | ..T..... |T... |C..... |T... | ..C..... | ..C..... | ..C..... | ..T..... | | ..G..... | ..C..... |
| #R_prolixus_ov21 | ..T..... |T... |C..... |T... | ..C..... | ..C..... | ..C..... | ..T..... | | ..G----- | ----- |
| #R_prolixus_ov23 | ..T..... |T... |C..... |T... | ..C..... | ..C..... | ..C..... | ..T..... | | ..G..... | ..C..... |
| #R_robustus_3682 | ..T..... |T... |C..... |T... | ..C..... | ..C..... | ..C..... | ..A..... | | | ..C..... |
| #R_stali_3633 | | | | | | | | | | | |
| #R_stali_Justi | | | | | | | | | | | |
| #rhodnius | | | | | | | | | | | |
| #T_circummaculata | | | ..TG...C.. | ..C...T..T | ..A..... | | ..C..... | ..T..... | | ..G..... |C.. |
| #T_rubrovaria | | | ..TG...C.. | ..C...T..T | ..CA..... | | ..C..... | ..T..... | | ..G..... |C.. |

| | | | | | | | | | | | | |
|---------------------|------------|------------|------------|------------|------------|--------------|--------------|-------------|-------------|--------------|------------|------------|
| | 2222222222 | 2222222222 | 2222222222 | 2222222222 | 2222222222 | 2222222222 | 2222222222 | 2222222222 | 2222222222 | 2222222222 | 2222222222 | 2222222222 |
| | 0000000001 | 1111111112 | 2222222223 | 3333333334 | 4444444445 | 5555555556 | 6666666667 | 7777777778 | 8888888889 | 9999999990 | | |
| | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 |
| #R_brethesi_3633 | GTACCTCTAA | TAATTGGTGC | CCCTGATATA | GCTTTCCAC | GAATAAAATA | CATAAGATTT | TGACTTCTAC | CCCCGTCCCT | TACCCTTTTA | TTAGCATCAA | | |
| #R_brethesi_3681 | | | | | | | | | | | | |
| #R_brethesi_Justi | | | | | | | | | | | | |
| #R_colombiensis1 |CT..S |A.. |C..G | ..A..... | | |T..AT... |A..T.. |T..A... |G..T..G. | | |
| #R_colombiensis16 |CT... |A.. |C..G |r... | T....A--- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | |
| #R_domesticus | ..T..AT... |A.. | T..C..C... | | T.....A-- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | |
| #R_ecuadoriensis12 | ..T..CT.G. |A.. |C... | | T..... | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | |
| #R_ecuadoriensis13 | ..T..CT.G. |A.. |C... | | T..... | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | |
| #R_ecuadoriensis14 | ..T..CT.G. |A.. |C... | | T..... | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | |
| #R_ecuadoriensis15 | ..T..CT.G. |A.. |C... | | T..... | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | |
| #R_milesi1_4064 | ..C..AT... |C..A. | T.....C.. | ..A..T... | T.....C | ...T..A..T. |A..... |T..A... | | | | |
| #R_milesi2_4064 | ..C..AT... |C..A. | T.....C.. | ..A..T... | T.....C | ...T..A..T. |A..... |T..A... | | | | |
| #R_milesi_4322 | ..C..AT... |C..A. | T..... | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | |
| #R_montenegrensis2 | ..C..GT... |A.. |C... |TTG.. | T..... | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | |
| #R_montenegrensis1 | ..C..GT... |A.. |C... | | T..... | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | |
| #R_neivai_genbank | ..C..AT... |A.. |C.. | ..A..... | |T..AT... | ..T..A..... | A..TT.AC.. | C..AT..... | | | |
| #R_nasutus_p1 | ..T..AT... |A.. | T..C..C... |G. | T..... | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | |
| #R_nasutus_p2 | ..T..AT... |A.. | T..C..C... |G. | T..... | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | |
| #R_nasutus1 | ..T..AT... |A.. | T..C..C... |G. | T..... | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | |
| #R_nasutus2 | ..T..AT... |A.. | T..C..C... |G. | T..... | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | |
| #R_nasutus3 | ..T..AT... |A.. | T..C..C... | T..... | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | |
| #R_neglectus_3211 | A.C..AT... |A.. | T.....C.. | ..A..... | T.....C | ...T..A..T. |A..... |T..A... | | | | |
| #R_neglectus_3633 | A.C..AT... |A.. | T.....C.. | ..A..... | T.....C | ...T..A..T. |A..... |T..A... |A..... | | | |
| #R_neglectus_3681 | A.C..AT... |A.. | T.....C.. | ..A..... | T.....C | ...T..A..T. |A..... |T..A... |A..... | | | |
| #R_pallescens_3681 |CT... |A.. |C..G | ..A..... | |T..AT.G. |C..... |T..A... | C..G..C..G. | | | |
| #R_pictipes_3633 |CT... |A.. |C.. | ..C..... |C | ...T..A..C. |A..... |T..A... | C..G..C.. | | | |
| #R_pictipes_genbank |CT... |A.. |C.. | ..C..... |T..C | ...T..?.C. |A..... |T..A... | C..G..C.. | | | |
| #R_pictipes_Justi |CT... |A.. |C.. | ..C..... |C | ...T..A..C. |A..... |T..A... | C..G..C.. | | | |
| #R_prolixus_4064 | ..T..AT... |G.. | ..C..C... | ..A..... | T.....C | ...T..A..T. | ..T..T..... |T..A... | ..G..... | | | |
| #R_prolixus_genbank | ..C..AT... |A.. | T..C..C... | ..A..... | T.....C | ...T..A..T. | ..T..A..... |T..A... | ..GA..... | | | |
| #R_prolixus_ov24 | ..C..AT... |A.. | T..C..C... | | T..... | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | |
| #R_prolixus_ov25 | ..C..AT... |A.. | T..C..C... | | T..... | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | |
| #R_prolixus_ov22 | ..C..AT... |A.. | T..C..C... | | T..... | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | |
| #R_prolixus_ov21 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | |
| #R_prolixus_ov23 | ..C..AT... |A.. | T..C..C... | | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | |
| #R_robustus_3682 | ..T..AT... |G.. | ..C..C... | ..A..... | T.....C | ...T..A..T. | ..T..T..... |T..A... | ..G..... | | | |
| #R_stali_3633 | | | | | |T.. | |T..A... | | | | |
| #R_stali_Justi | | | | | |T.. | |T..A... | | | | |
| #rhodnius | | | | | | | | | | | | |
| #T_circummaculata | ..G..CT... |C..A. | ..A..... | ..A..... | ..T.....C. |C | ...T..AT... |AG.... | A.....C.C | C..TAT.AG.. | | |
| #T_rubrovaria | ..C..CT... |C..A. | ..A..... | ..A..... | ..T.....C. |C | ...T..AT... |AG.... | A.....C.C | C..TAT.AG.. | | |

| | | | | | | | | | | | | |
|---------------------|------------|------------|------------|------------|------------|----------------|-------------|-------------|------------|------------|------------|------------|
| | 3333333333 | 3333333333 | 3333333333 | 3333333333 | 3333333333 | 3333333333 | 3333333333 | 3333333333 | 3333333333 | 3333333333 | 3333333333 | 3333333333 |
| | 0000000001 | 1111111112 | 2222222223 | 3333333334 | 4444444445 | 5555555556 | 6666666667 | 7777777778 | 8888888889 | 9999999990 | | |
| | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 |
| #R_brethesi_3633 | GCCTCATTGA | AAGAGGTGCA | GGAAGTGGAT | GAACAGTATA | CCCTCCATTA | TCAAGAAATA | TCGCCCATAG | AGGGGCCTCT | GTCGATTTAG | CAATCTTTTC | | |
| #R_brethesi_3681 | | | | | | | | | | | | |
| #R_brethesi_Justi | | | | | | | | | | | | |
| #R_colombiensis1 | .A...G.... | | | | ...C..G... | |C.. | ...A..T... | ..T..... | ...T..... | | |
| #R_colombiensis16 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | |
| #R_domesticus | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | |
| #R_ecuadoriensis12 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | |
| #R_ecuadoriensis13 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | |
| #R_ecuadoriensis14 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | |
| #R_ecuadoriensis15 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | |
| #R_milesi1_4064 |AG.... |G..C |C.... |C.... | ...C...C.. |T.... |C..... | C.....A.. | ..A..... | .T..... | | |
| #R_milesi2_4064 |AG.... |G..C |C.... |C.... | ...C...C.. |T.... |C..... | C.....A.. | ..A..... | .T..... | | |
| #R_milesi_4322 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | |
| #R_montenegrensis2 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | |
| #R_montenegrensis1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | |
| #R_neivai_genbank | .A..AG.... |G..T |A.... | ...T..... | ...C..... |A.G...C.. | T..A..A... | ..A...C... | ...T..... | | | |
| #R_nasutus_p1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | |
| #R_nasutus_p2 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | |
| #R_nasutus1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | |
| #R_nasutus2 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | |
| #R_nasutus3 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | |
| #R_neglectus_3211 |AG.... |G..C |C.... |C.... | ...C...C.. |T.... |C..... | C.....A.. | ..A..... | .T..... | | |
| #R_neglectus_3633 |AG.... |G..C |C.... |C.... | ...C...C.. |T.... |C..... | C.....A.. | ..A..... | .T..... | | |
| #R_neglectus_3681 |AG.... |G..C |C.... |C.... | ...C...C.. |T.... |C..... | C.....A.. | ..A..... | .T..... | | |
| #R_pallescens_3681 | .A...G.... | | | | ...C..... |T....C.. | ...A..T..C | ..T..... | ...T..... | | | |
| #R_pictipes_3633 |G.... | G.....T | | | ...C...C.. | | | ..T..... | ...T..... | | | |
| #R_pictipes_genbank |G.... | G..C...T | | | ...C...C.. | ...TC.... |TC |T..... | ...T..... | | | |
| #R_pictipes_Justi |G.... | G.....T | | | ...C...C.. | | | ..T..... | ...T..... | | | |
| #R_prolixus_4064 | .TT.AG.... |G..T | ..G..C.... |C... | T..C...C.. |T.... |T.... | T.....A.. | ..A..... | ...C... | | |
| #R_prolixus_genbank |AG.C.. |G..C |C.... |T... | T..C...C.. |T.... |T.... | T..A...A.. | ..A..... | ...C... | | |
| #R_prolixus_ov24 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | |
| #R_prolixus_ov25 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | |
| #R_prolixus_ov22 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | |
| #R_prolixus_ov21 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | |
| #R_prolixus_ov23 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | |
| #R_robustus_3682 | .TT.AG.... |G..T | ..G..C.... |C... | T..C...C.. |T.... |T.... | T.....A.. | ..A..... | ...C... | | |
| #R_stali_3633 | .T...G.... |T | | | T..... | | | ..A..... | ..T..... | | | |
| #R_stali_Justi | .T...G.... |T | | | T..... | | | ..A..... | ..T..... | | | |
| #rhodnius | | | | | | | | | | | | |
| #T_circummaculata | .A..AG.A.. |G... | ..G..A..T. | ...T..... | ...A..TC.. |C.... |C.... | ..A..A... | ..T..... | .C.....C.. | | |
| #T_rubrovaria | .A..AG.A.. |A... |A..T. | ...T..... | ...G..TC.. |C.... |C.... | ..A..A... | ..T..... | .C.....C.. | | |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | 4444444444 | 4444444444 | 4444444444 | 4444444444 | 4444444444 | 4444444444 | 4444444444 | 4444444444 | 4444444444 | 4444444444 | 4444444444 | 4444444444 | 4444444444 | 4444444444 |
| | 0000000001 | 1111111112 | 2222222223 | 3333333334 | 4444444445 | 5555555556 | 6666666667 | 7777777778 | 8888888889 | 9999999990 | | | | |
| | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 |
| #R_brethesi_3633 | ATTACTTA | GCAGGTGAT | CTTCAATTCT | AGGAGCAGTA | AATTTTATTT | CAACAATTAT | TAACATACGA | CCAGCAGGCA | TGACCCAGCA | ACGAATTCCA | | | | |
| #R_brethesi_3681 | | | | | | | | | | | | | | |
| #R_brethesi_Justi | | | | | | | | | | | | | | |
| #R_colombiensis1 |G |C | .C.....T |T | |G | ...T.....T |A | .A..T..C.. | | | | | |
| #R_colombiensis16 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | | | |
| #R_domesticus | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | | | |
| #R_ecuadoriensis12 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | | | |
| #R_ecuadoriensis13 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | | | |
| #R_ecuadoriensis14 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | | | |
| #R_ecuadoriensis15 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | | | |
| #R_milesi1_4064 | .C.T..T... |G.C.. | .C..C..CT. |G | .C..... | | ...T..... |A | .A..T..G.. |C | | | | |
| #R_milesi2_4064 | .C.T..T... |G.C.. | .C..C..CT. |G | .C..... | | ...T..... |A | .A..T..G.. |C | | | | |
| #R_milesi_4322 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | | | |
| #R_montenegrensis2 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | | | |
| #R_montenegrensis1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | | | |
| #R_neivai_genbank | .C.C..T... |A... | .C..C..... | | | | ...T..... | ...AT...A | .A..T..T.. | ...G....M | | | | |
| #R_nasutus_p1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | | | |
| #R_nasutus_p2 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | | | |
| #R_nasutus1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | | | |
| #R_nasutus2 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | | | |
| #R_nasutus3 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | | | |
| #R_neglectus_3211 | .C.T..T... |G... | .C..C..CT. |G | .C..... | | ...T..... |A | .A..T..G.. |C | | | | |
| #R_neglectus_3633 | .C.T..T... |G... | .C..C..CT. |G | .C..... | | ...T..... |A | .A..T..G.. |C | | | | |
| #R_neglectus_3681 | .C.T..T... |G... | .C..C..CT. |G | .C..... | | ...T..... |A | .A..T..G.. |C | | | | |
| #R_pallescens_3681 | |C | .C..... |T | .C..... | | ...T.....T |G | .A.....C.. |C... | | | | |
| #R_pictipes_3633 | .C..... |G | .A..... | | .C..... | | ...T..... |A | ...T..... | | | | | |
| #R_pictipes_genbank | GC..... |G | .A..... | | .C..... | | ...T..... |A | ...T..... | | | | | |
| #R_pictipes_Justi | .C..... |G | .A..... | | .C..... | | ...T..... |A | ...T..... | | | | | |
| #R_prolixus_4064 | GC.T..... |A.C | .C..T..T. | | .C..... | | ...T..... |A | .A..... |C | | | | |
| #R_prolixus_genbank | .C.T..... |G... | .C..C..T. | | .C..... |C | ...T.....G |A | .W..T..... |C | | | | |
| #R_prolixus_ov24 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | | | |
| #R_prolixus_ov25 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | | | |
| #R_prolixus_ov22 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | | | |
| #R_prolixus_ov21 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | | | |
| #R_prolixus_ov23 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | | | |
| #R_robustus_3682 | GC.T..... |A.C | .C..T..T. | | .C..... | | ...T..... |A | .A..... |C | | | | |
| #R_stali_3633 | | | | | | | | | .A..... | | | | | |
| #R_stali_Justi | | | | | | | | | .A..... | | | | | |
| #rhodnius | | | | | | | | | | | | | | |
| #T_circummaculata | CC.T...C.. |A... | .A..... | T.....C.. |C | ...T..C.. | C..... | ..T.AG..T. | .ACGG..... | T.....C..T | | | | |
| #T_rubrovaria | CC.T...C.. |A... | .A..... | T.....C..G |C | ...T..C.. | C..... | ..C.A...T. | .ACGA..... | T.....C..C | | | | |

| | | | | | | | | | | | | |
|---------------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | 5555555555 | 5555555555 | 5555555555 | 5555555555 | 5555555555 | 5555555555 | 5555555555 | 5555555555 | 5555555555 | 5555555555 | 5555555555 | 5555555555 |
| 0000000001 | 1111111112 | 2222222223 | 3333333334 | 4444444445 | 5555555556 | 6666666667 | 7777777778 | 8888888889 | 9999999990 | | | |
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 |
| #R_brethesi_3633 | CTATTTGTTT | GATCTGTCGG | AATTACAGCC | CTCTTATTAT | TATTAAGATT | GCCTGTCTTA | GCAGGAGCAA | TTA----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_brethesi_3681 | | | | | | | | ...CTATATT | GTTAACCGAT | CGAAACTTTA | ----- | ----- |
| #R_brethesi_Justi | | | | | | | | ...CTATATT | GTTAACCGAT | CGAAACTTTA | ----- | ----- |
| #R_colombiensis1 | T..... |A.. | C.....T | ...C.CC... | .G.....C. |G... |G. | .C.CTATATT | ATTAAGTAC | CGCAATTTA | ----- | ----- |
| #R_colombiensis16 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_domesticus | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_ecuadoriensis12 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_ecuadoriensis13 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_ecuadoriensis14 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_ecuadoriensis15 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_milesi1_4064 | T..... |A.. | C..... | ..TC..... | ..C.....C. | ...C..AT.. | ..C..... | ...CTATACT | ACTAACTGAC | CGAAACTTCA | ----- | ----- |
| #R_milesi2_4064 | T..... |A.. | C..... | ..TC..... | ..C.....C. | ...C..AT.. | ..C..... | ...CTATACT | ACTAACTGAC | CGAAACTTCA | ----- | ----- |
| #R_milesi_4322 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_montenegrensis2 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_montenegrensis1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_neivai_genbank | T..... |M.. | .W..... | ..AC.CC.C. | ..C.T...C. | R....TT.. |M.... | .C.CAATACT | ATTAWCTGAC | CGAAATTTTA | ----- | ----- |
| #R_nasutus_p1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_nasutus_p2 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_nasutus1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_nasutus2 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_nasutus3 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_neglectus_3211 | T..... |A.. | C..... | ..C..... | ..C.....C. | ...C..AT.. | | ...CTATATT | ACTAACTGAC | CGAAACTTCA | ----- | ----- |
| #R_neglectus_3633 | T..... |A.. | C..... | ..C..... | ..C.....C. | ...C..AT.. | | ...CTATATT | ACTAACTGAC | CGAAACTTCA | ----- | ----- |
| #R_neglectus_3681 | T..... |A.. | C..... | ..C..... | ..C.....C. | ...C..AT.. | | ...CTATATT | ACTAACTGAC | CGAAACTTCA | ----- | ----- |
| #R_pallescens_3681 | T..... |G.. | | ..C.T.... | .G..... | A....AT.. | | .C.CTATATT | ATTAAGTAC | CGCAACTTTA | ----- | ----- |
| #R_pictipes_3633 | T..... | ...C.T.. | pictipes | ..T..... |C. | A....TT.. | ...T.... | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_pictipes_genbank | T..... | ...C.T.. | | ..A..... |C. | A....TT.. | ...T.... | ...CCATATT | ATTGACTGAT | CGAAATTTTA | ----- | ----- |
| #R_pictipes_Justi | T..... | ...C.T.. | | ..A..... |C. | A....TT.. | ...T.... | ...CCATATT | ATTGACTGAT | CGAAATTTTA | ----- | ----- |
| #R_prolixus_4064 | T..... |A.. | C..... | ..TC..C... | ..C.....C. | C....AT.. | | ...CTATACT | ATTAAGTAC | CGAAATTTCA | ----- | ----- |
| #R_prolixus_genbank | T..... |A.. | | ..TC..... | ..C.....C. | A..C..AT.. | | ...CTATATT | ATTAACGGAC | CGAAACTTCA | ----- | ----- |
| #R_prolixus_ov24 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_prolixus_ov25 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_prolixus_ov22 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_prolixus_ov21 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_prolixus_ov23 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_robustus_3682 | T..... |A.. | C..... | ..TC..C... | ..C.....C. | C....AT.. | | ...CTATACT | ATTAAGTAC | CGAAATTTCA | ----- | ----- |
| #R_stali_3633 | ..G..... | | | | | A....T... | | ...CTATATT | ATTAACCGAT | CGAAACTTTA | ----- | ----- |
| #R_stali_Justi | ..G..... | | | | | A....T... | | ...CTATATT | ATTAACCGAT | CGAAACTTTA | ----- | ----- |
| #rhodnius | | | | | | | | ...CTATATT | GTTAACCGAT | CGAAACTTTA | ----- | ----- |
| #T_circummaculata | T...C..A. | ...A..T.. | C....T... | ..A.....C |CC. | T....T..T | ..T..... | ...CTATACT | ATTAAGTAC | CGAAACTTTA | ----- | ----- |
| #T_rubrovaria | T...C..A. | ...A..T.. | T....T... | ..A.....C | ..C.....CC. | T....T..T | ..T..... | ...CTATACT | ATTTACTGAC | CGAAACTTTA | ----- | ----- |

| | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | 6666666666 | 6666666666 | 6666666666 | 6666666666 | 6666666666 | 6666666666 | 6666666666 | 6666666666 | 6666666666 | 6666666666 | 6666666666 | 6666666666 | 6666666666 |
| | 0000000001 | 1111111112 | 2222222223 | 3333333334 | 4444444445 | 5555555556 | 6666666667 | 7777777778 | 8888888889 | 9999999990 | | | |
| | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 |
| #R_brethesi_3633 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_brethesi_3681 | ACACCTCATT | CTTTGACCCT | GCTGGGGGAG | GTGACCCTAT | TCTTTATCAA | CA----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_brethesi_Justi | ACACCTCATT | CTTTGACCCT | GCTGGGGGAG | GTGACCCTAT | TCTTTATCAA | CATTTATT-- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_colombiensis1 | ATACCTCCTT | CTTTGACCCC | GCAGGAGGGC | GAGACCCAAT | TCTATACCAA | CACTTATTCT | GATTTTTTGG | TCACCGGAAA | ATTAAAA--- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_colombiensis16 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_domesticus | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_ecuadoriensis12 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_ecuadoriensis13 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_ecuadoriensis14 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_ecuadoriensis15 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_milesi1_4064 | ATACTTCCTT | CTTCGACCCA | GCCGGAGGAG | GAGACCCAAT | TCTTTACCAG | CACTTATT-- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_milesi2_4064 | ATACTTCCTT | CTTCGACCCA | GCCGGAGGAG | GAGACCCAAT | TCTTTACCAG | CACTTATT-- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_milesi_4322 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_montenegrensis2 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_montenegrensis1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_neivai_genbank | WTACCTCTTT | CTTTGACCCC | GCTGGAGGAG | GCGACCCTAT | CCTTTATCAA | CACWTATTMT | GATTCTTTKG | ACACCCAGAA | GTATATATTT | TWATTCTACC | ----- | ----- | ----- |
| #R_nasutus_p1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_nasutus_p2 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_nasutus1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_nasutus2 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_nasutus3 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_neglectus_3211 | ATACTTCCTT | CTTCGACCCA | GCCGGAGGAG | GAGACCCAAT | TCTTTACCAA | CACTTATT-- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_neglectus_3633 | ATACTTCCTT | CTTCGACCCA | GCCGGAGGAG | GAGACCCAAT | TCTTTACCAA | CACTTATT-- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_neglectus_3681 | ATACTTCCTT | CTTCGACCCA | GCCGGAGGAG | GAGACCCAAT | TCTTTACCAA | CACTTATT-- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_pallescens_3681 | ATACCTCCTT | TTTTGACCCC | GCAGGAGGGG | GAGACCCAAT | TCTATACCAA | CACTTATT-- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_pictipes_3633 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_pictipes_genbank | ATACCTCATT | CTTTGACCCA | GCTGGGGGAG | GCGACCCAAT | CCTTTATCAA | CATTTATTTT | GATTTTTTGG | ACACCCTGAA | GTATATATTC | TAATTTTACC | ----- | ----- | ----- |
| #R_pictipes_Justi | ATACCTCATT | CTTTGACCCA | GCTGGGGGAG | GTGACCCAAT | CCTTTATCAA | CATTTATTTT | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_prolixus_4064 | ATACCTCTTT | CTTCGACCCA | GCAGGAGGAG | GAGATCCGAT | TCTTTACCAA | CACTTATT-- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_prolixus_genbank | ATACCTCTTT | CTTCGACCCA | GCGGGGGGAG | GAGACCCAAT | TCTTTACCAA | CACTTATTTT | GATTCCTCGG | ACATCCAGAA | GTATATATTC | TAATTCCTCC | ----- | ----- | ----- |
| #R_prolixus_ov24 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_prolixus_ov25 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_prolixus_ov22 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_prolixus_ov21 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_prolixus_ov23 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_robustus_3682 | ATACCTCTTT | CTTCGACCCA | GCAGGAGGAG | GAGATCCGAT | TCTTTACCAA | CACTTATT-- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_stali_3633 | ACACCTCATT | CTTTGACCCA | GCTGGGGGAG | GTGACCCTAT | TCTTTATCAA | CATTTATT-- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #R_stali_Justi | ACACCTCATT | CTTTGACCCA | GCTGGGGGAG | GTGACCCTAT | TCTTTATCAA | CATTTATT-- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #rhodnius | ACACCTCATT | CTTTGACCCT | GCTGGGGGAG | GTGACCCTAT | CCTTTATCAA | CATTTATT-- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #T_circummaculata | ATACATCATT | CTTTGACCCA | GCAGGAGGGG | GAGATCCCA- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| #T_rubrovaria | ATACATCATT | CTTTGACCCA | GCAGGAGGAG | GGGACCCCAT | CCTTTACCAA | CACCT----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |

```

7777777777 7777
0000000001 1111
1234567890 1234
#R_brethesi_3633 -----
#R_brethesi_3681 -----
#R_brethesi_Justi -----
#R_colombiensis1 -----
#R_colombiensis16 -----
#R_domesticus -----
#R_ecuadoriensis12 -----
#R_ecuadoriensis13 -----
#R_ecuadoriensis14 -----
#R_ecuadoriensis15 -----
#R_milesi1_4064 -----
#R_milesi2_4064 -----
#R_milesi_4322 -----
#R_montenegrensis2 -----
#R_montenegrensis1 -----
#R_neivai_genbank AGGATTGGA TTA-
#R_nasutus_p1 -----
#R_nasutus_p2 -----
#R_nasutus1 -----
#R_nasutus2 -----
#R_nasutus3 -----
#R_neglectus_3211 -----
#R_neglectus_3633 -----
#R_neglectus_3681 -----
#R_pallescens_3681 -----
#R_pictipes_3633 -----
#R_pictipes_genbank CGGATTCGGA TTAA
#R_pictipes_Justi -----
#R_prolixus_4064 -----
#R_prolixus_genbank CGGATTCGGA CTA-
#R_prolixus_ov24 -----
#R_prolixus_ov25 -----
#R_prolixus_ov22 -----
#R_prolixus_ov21 -----
#R_prolixus_ov23 -----
#R_robustus_3682 -----
#R_stali_3633 -----
#R_stali_Justi -----
#rhodnius -----
#T_circummaculata -----
#T_rubrovaria -----

```

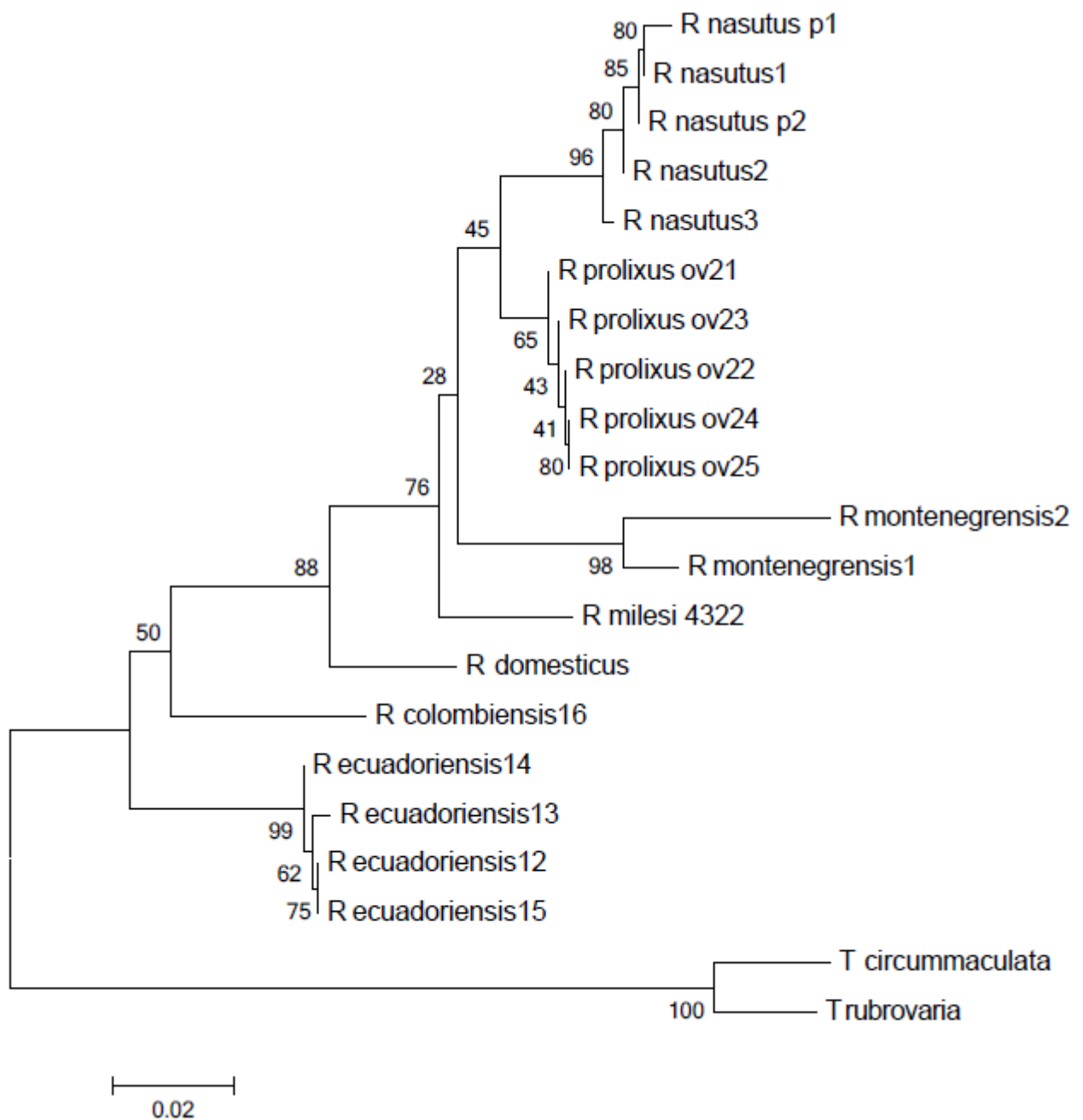


Figura 24. Árvore filogenética para haplótipos do gene mitocondrial COI (250pb) do gênero *Rhodnius*, construída com base na matriz de distâncias Kimura 2-parâmetros (*Neighbor-joining* com 1000 réplicas de *bootstrap*). (Valores acima e abaixo dos ramos indicam suporte *bootstrap*).

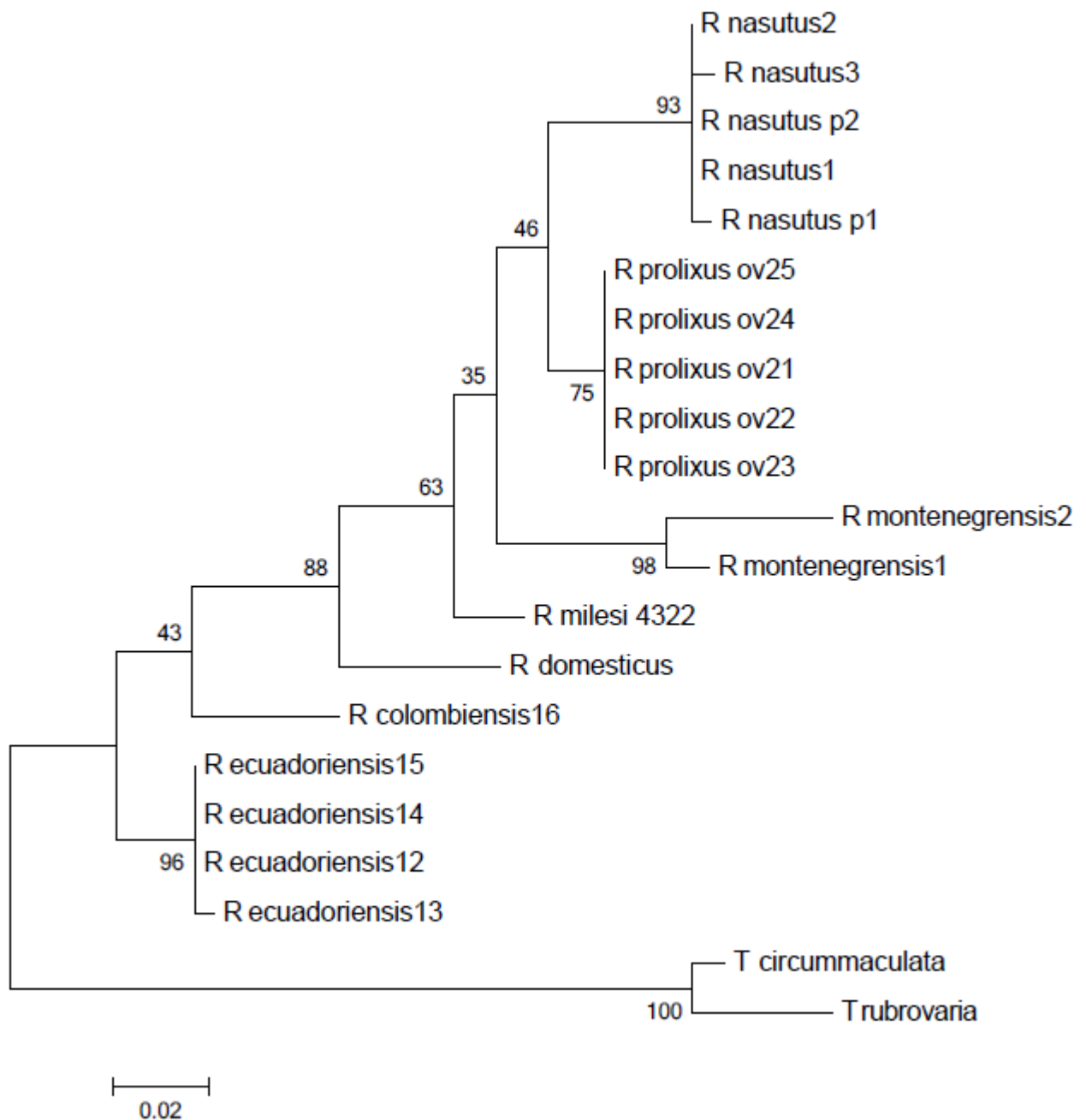


Figura 25. Árvore de máxima verossimilhança utilizando a região do gene mitocondrial COI (250pb) do gênero *Rhodnius*. Os números acima dos nós correspondem aos valores de *bootstrap* obtido em 1000 réplicas com base na matriz de distâncias Kimura 2-parâmetros (Valores acima e abaixo dos ramos indicam suporte *bootstrap*).

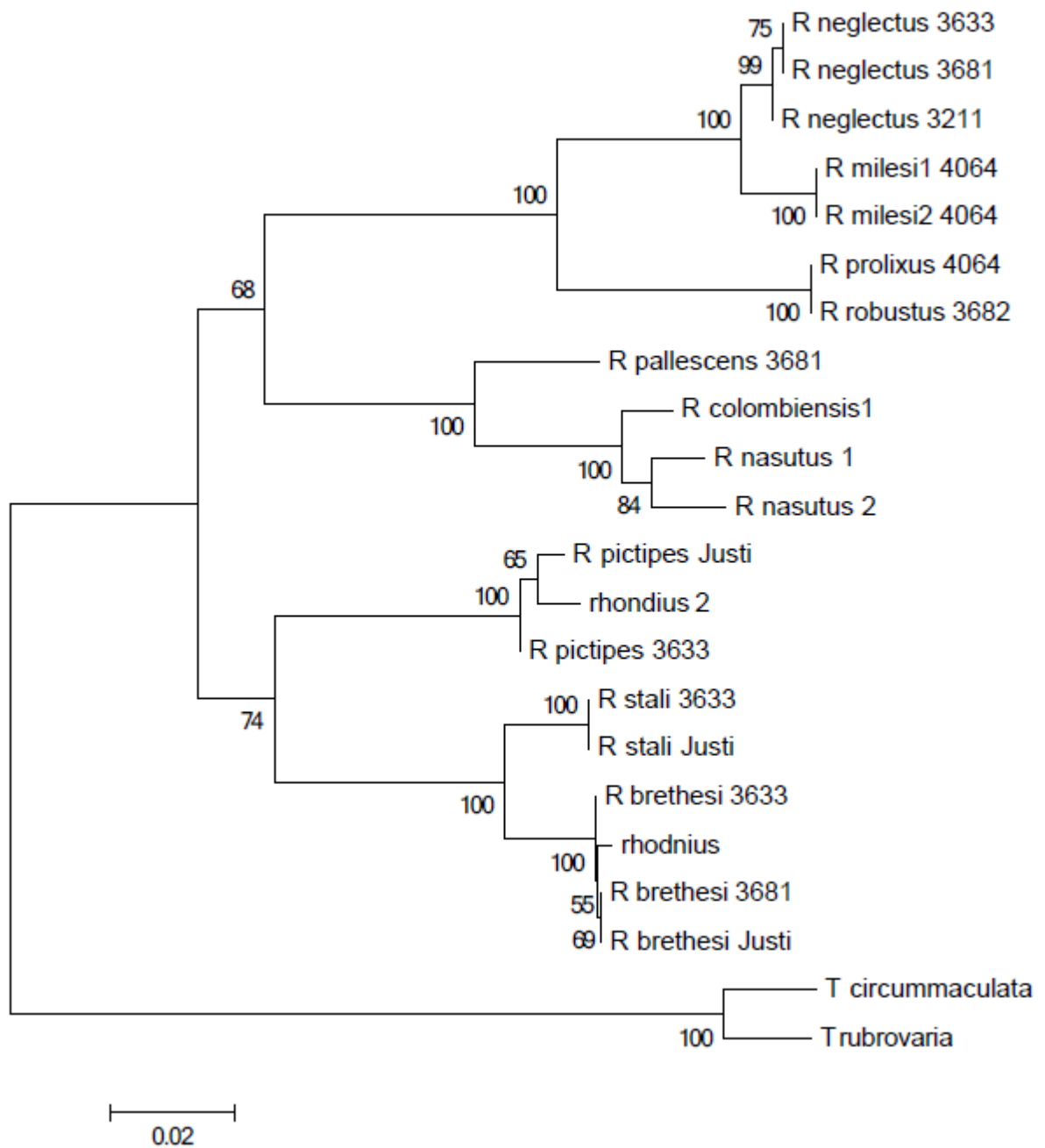


Figura 26. Árvore filogenética para haplótipos do gene mitocondrial COI (650pb) do gênero *Rhodnius*, construída com base na matriz de distâncias Kimura 2-parâmetros (*Neighbor-joining* com 1000 réplicas de *bootstrap*). (Valores acima e abaixo dos ramos indicam suporte *bootstrap*).

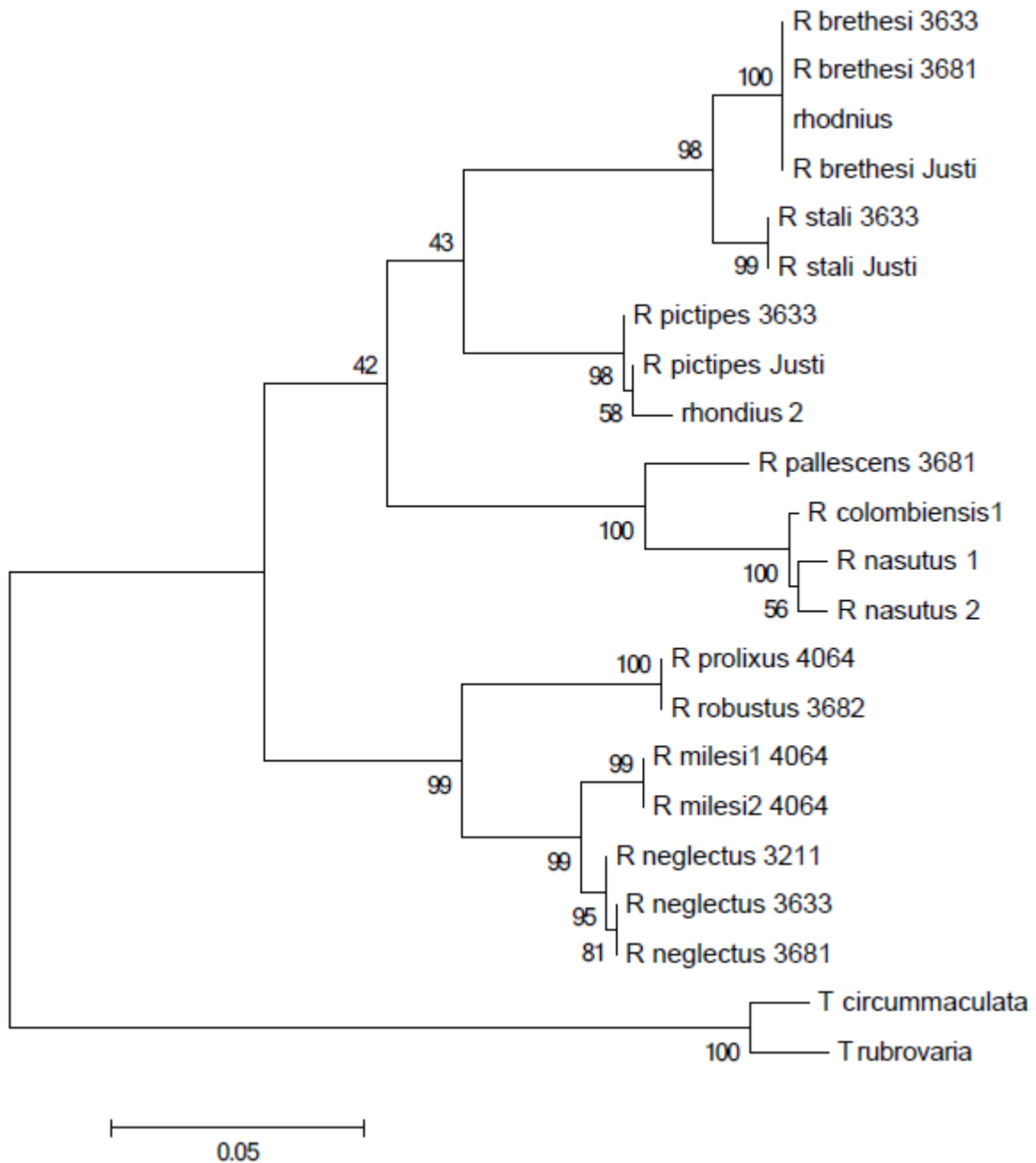


Figura 27. Árvore de máxima verossimilhança utilizando a região do gene mitocondrial COI (650pb) do gênero *Rhodnius*. Os números acima dos nós correspondem aos valores de *bootstrap* obtido em 1000 réplicas com base na matriz de distâncias Kimura 2-parâmetros (Valores acima e abaixo dos ramos indicam suporte *bootstrap*).