

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Carlota Josefovicz Belisário

Caracterização morfológica e molecular de híbridos do cruzamento entre *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) e *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964 (Hemiptera: Reduviidae).

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular

Orientadores: Dra. Líléia Diotaiuti
Dr. Alvaro José Romanha

Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas – Centro de Pesquisas René Rachou / FIOCRUZ

Belo Horizonte

2006

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Manguinhos / CICT / FOCRUZ - RJ

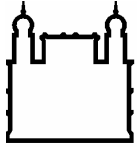
B331 Belisário, Carlota Josefovicz

Caracterização morfológica e molecular de híbridos do cruzamento entre *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) e *Triatoma pseudomaculata* / Carlota Josefovicz Belisário. – Rio de Janeiro, 2006.
viii, 82 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Celular e Molecular, 2006.

1. *Triatoma maculata*. 2. *Triatoma pseudomaculata*. 3. Híbridos. 4. Técnica de amplificação ao acaso de DNA polimórfico. I. Título.

CDD: 616.027



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: Carlota Josefovicz Belisário

Caracterização morfológica e molecular de híbridos do cruzamento entre *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) e *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964 (Hemiptera: Reduviidae).

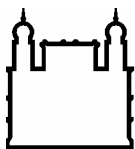
ORIENTADORES: Prof. Dra. Liléia Diotaiuti
Prof. Dr. Álvaro José Romanha

Aprovada em: 25/07/2006

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Cleber Galvão
Prof. Dr. François Noireau
Prof. Dra. Sílvia Ermelinda Barbosa

Belo Horizonte, 25 de julho de 2006



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

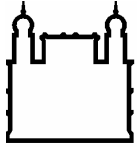
Caracterização morfológica e molecular de híbridos do cruzamento entre *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) e *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964 (Hemiptera: Reduviidae).

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Carlota Josefovicz Belisário

Devido às suas grandes semelhanças morfológicas, *Triatoma maculata* e *Triatoma pseudomaculata*, que constituem para Carcavallo et al. (2000) o 'complexo maculata', eram consideradas a mesma espécie até 1964 (Corrêa e Espínola, 1964). Essas espécies são alopátricas e, segundo Schofield (1988), *T. maculata* teria sido introduzida no Nordeste brasileiro por aves migratórias, com subsequente especiação, e formação da espécie *T. pseudomaculata*. Estudos utilizando isoenzimas demonstraram grande distância genética entre as duas espécies e grande proximidade entre *T. pseudomaculata* e *Triatoma wygodzinsky*, com subsequente proposta de reestruturação do 'complexo maculata' (Santos et al., 2003). Os estudos de cruzamentos entre em triatomíneos permitem a formulação de hipóteses acerca da origem e divergência de espécies e podem ajudar a entender a sistemática do grupo. O objetivo deste trabalho é determinar o grau de isolamento reprodutivo entre *T. maculata* e *T. pseudomaculata*, e caracterizar geneticamente as espécies e os híbridos obtidos pelos cruzamentos interespecíficos, permitindo o cotejamento de aspectos genéticos com características biológicas e comportamentais destes insetos. Os nossos resultados mostram que *T. maculata* e *T. pseudomaculata* não apresentam diferenças quanto à reprodução e são espécies que se cruzam produzindo híbridos inférteis. Os resultados dos cruzamentos intra e interespecíficos, da morfologia, da morfometria geométrica e da análise de RAPDs mostram *T. maculata* e *T. pseudomaculata* como espécies bem diferenciadas. Os híbridos obtidos são mais semelhantes morfologicamente à *T. maculata*, entretanto, geneticamente estão mais próximos à *T. pseudomaculata*. *T. wygodzinsky* e os híbridos obtidos com estas espécies foram os que se apresentaram mais distantes dos demais grupos estudados. Os resultados indicam que independentemente de uma origem evolutiva comum entre essas três espécies, atualmente elas estão bastante diferenciadas geneticamente e não devem, portanto, constituir complexo entre elas.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Morphologic and molecular characterization of hybrids from the cross breeding among *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) and *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964 (Hemiptera: Reduviidae).

ABSTRACT

Carlota Josefovicz Belisário

Due to its great morphological similarities, *Triatoma maculata* and *Triatoma pseudomaculata*, classified by Carcavallo et al. (2002) in the "maculata complex", were considered the same species until 1964 (Corrêa e Espínola, 1964). These species are allopatric and, according to Schofield (1988), *T. maculata* would be introduced in the Brazilian Northeastern by migratory birds, with subsequent speciation, forming the species *T. pseudomaculata*. Studies using isoenzymes showed great genetic distance among these two species and high affinity among *T. pseudomaculata* and *Triatoma wygodzinsky*, resulting in a new proposal of 'maculata complex' re-organization (Santos et al, 2003). Hybridization studies in Triatomines allow the formulation of hypothesis about the origin and divergence of species and may help to understand the systematic of the group. Therefore, the objective of this work was to determine the level of reproductive isolation among *T. maculata* and *T. pseudomaculata*, and to characterize genetically the species and hybrids obtained by the interspecific cross breeding, allowing the comparison of genetic aspects with other biological characteristics and behavior of these insects. *T. maculata* and *T. pseudomaculata* did not present difference in relation to the reproduction (eggs laid, time for eclosion and viability of the eggs) and are able to produce hybrids, but infertile. The results obtained with the intra and interspecific cross breeding, morphological analysis, geometric morphometry and RAPDs showed *T. maculata* and *T. pseudomaculata* as well differentiated species. The hybrids obtained are morphologically more similar to *T. maculata*, but are genetically more close to *T. pseudomaculata*. *T. wygodzinsky* and the hybrids obtained with these species were the most distant from the other studied groups. Our results indicate that, independent of the existence or not of a common evolutionary origin among these species at present they are already genetically well differentiated and would not constitute a complex.

À minha mãe
por ser um exemplo.

À Liléia Diotaiuti, pessoa maravilhosa que Deus colocou na minha vida, a maior incentivadora do meu trabalho e da minha formação, pela confiança, por todo o apoio sempre, pelos colos, conselhos, ensinamentos, pela sua sabedoria.

Ao Álvaro Romanha pelos ensinamentos relativos à Biologia Molecular e pelo constante apoio e disponibilidade.

À Silvia Barbosa, com quem iniciei a minha vida na pesquisa, pelos ensinamentos, a grande ajuda no processamento das isoenzimas e pela revisão desta dissertação.

Ao Alexandre Silva de Paula pelo grande interesse por este trabalho, pelas constantes sugestões e trocas de idéias.

À Grasielle Caldas D'Ávila Pessoa, bolsista de Apoio Técnico, fundamental para este trabalho.

Maria Inês de Oliveira Mascarenhas e Maria Angélica de Oliveira, pela amizade e constante disposição em ajudar, pelas cervejas no final do dia também.

Ao João Paulo dos Santos, um amigo que muito me ensinou sobre os barbeiros.

A Ademilson de Azevedo, Ana Cristina Renna de Vitta, Diogo Portella Ornelas de Melo, Evandro Marques de Menezes Machado, Fernando Braga Stheling Dias, Gina Barcelos Pontes, Girley Francisco Machado de Assis, Ivan Vieira Sonoda, Dr. João Carlos Pinto Dias, Kely dos Santos Menezes Oliveira, Dr. Marcelo Gustavo Lorenzo, Marcos Marreiro Villela, D. Maria Ribeiro da Silva, Raquel Aparecida Ferreira, Rita de Cássia Moreira de Souza, Silvia Basques Fernandes, Theo Rolla de Paula Mota, Thessa Cristina Machado de Faria e todas as outras pessoas que passaram pelo Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas nesses anos em que estou aqui, pelo ótimo ambiente de trabalho.

Ao Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular, Nilton Barnabé Rodrigues, Dra. Silvane Maria Fonseca Murta e Rosana de Oliveira Alves pelas constantes ajudas.

Ao Laboratório de Helminthoses Intestinais, Dra. Roberta Lima Caldeira e Pollanah Martins Lira pela grande ajuda no decorrer deste trabalho.

Ao Dr. Paulo Marcos Zech Coelho por ter aberto as portas do Laboratório de Esquistossomose para o processamento das PCR.

Ao Dr. François Noireau por ter me acolhido em seu laboratório.

À Ana Laura uma grande amiga que este trabalho me deu.

Segemar Oliveira Magalhães, Anna Carolina Lustosa Lima, o pessoal da informática, as meninas da secretaria geral e acadêmica e a todos os outros do Centro de Pesquisas René Rachou que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

À Cleide e Eliete da Secretaria de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular que foram de extrema importância, sempre disponíveis, e prontas a ajudar.

Ao CPqRR e CNPq pelo apoio financeiro.

À minha mãe, Heloiza, minha irmã, Tatiana, e meu pai, Ronaldo, por me apoiarem mesmo nos momentos mais difíceis e por acreditarem que vale a pena.

Ao meu namorado, Sérgio, pela tranquilidade e grande apoio, fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Aos amigos, sem vocês nada seria possível.

Obrigada.

ÍNDICE

1 - Introdução	01
2 - Objetivos	13
2.1 - Objetivo Geral	14
2.2 - Objetivos Específicos	14
3 - Material e Métodos	15
3.1 - Populações	16
3.2 - Cruzamentos Intraespecíficos e Interespecíficos	17
3.3 - Morfologia	19
3.4 - Morfometria Geométrica	20
3.5 - Extração de DNA	22
3.6 - Polimorfismos de DNA Amplificados Aleatoriamente (RAPD)	23
3.7 - Isoenzimas	26
4 - Resultados	27
4.1 - Cruzamentos Intraespecíficos e Interespecíficos	28
4.2 - Morfologia	30
4.3 - Morfometria Geométrica	34
4.4 - Polimorfismos de DNA Amplificados Aleatoriamente (RAPD)	38
4.5 - Izoenzimas	45
5 - Discussão	48
6 - Considerações Finais e Conclusões	56
7 - Referências Bibliográficas	59
8 - Anexos	70

1 – INTRODUÇÃO

Os triatomíneos são insetos hematófagos, da ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae, que constitui um grupo de 136 espécies dividido em seis tribos: Rhodniini Pinto, 1926, Triatomini Jeannel, 1919, Cavernicolini Usinger, 1944, Bolboderini Usinger, 1944, Alberproseniini Martinez & Carcavallo, 1997 e Linshcosteini Carcavallo, Jurberg, Lent, Noireau & Galvão, 2000 (Galvão et al., 2003; Foreiro et al., 2004).

A importância epidemiológica desse grupo está na potencial capacidade de todas as espécies transmitirem o agente etiológico causador da doença de Chagas, o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909), sendo a via vetorial a forma mais importante de transmissão. No início da década de 90, estimava-se que haviam de 16 a 18 milhões de pessoas infectadas e 100 milhões sob risco de infecção, em 18 países da América, do México à Argentina. Os triatomíneos encontram um habitat favorável em frestas de paredes, telhados e no peridomicílio de casas típicas do meio rural e da periferia de cidades, aproximando essas espécies do homem. Nesse contexto, a principal estratégia de controle da doença de Chagas é a eliminação dos vetores desses ecótopos (WHO, 2006).

Devido ao grau de adaptação ao ambiente doméstico e a antropofilia, somente algumas são vetores significativos da doença de Chagas (Lent & Wygodzinsky, 1979). A maioria dos estudos é concentrada nesses vetores de maior importância, entretanto, é necessário considerar as espécies silvestres que podem colonizar ambientes domiciliares quando o vetor principal é eliminado (Carcavallo, 1997a). Desta forma, Dias & Diotaiuti (1998) conceituam espécies primárias ou secundárias de triatomíneos, sendo as primeiras aquelas especializadas em colonizar de maneira permanente as habitações humanas de uma determinada região, geralmente em altas densidades, com marcada antropofilia e que apresentam significativas taxas de infecção natural pelo *T. cruzi*. As espécies secundárias são geralmente autóctones da região, capazes de invadir e colonizar as casas em pequenas densidades. Na presença de uma espécie primária não são capazes de colonizar o intradomicílio. As espécies secundárias são autóctones e ubíquistas; em geral ocupam ecótopos naturais e artificiais próximos das casas, associados a reservatórios silvestres e peridomiciliares, apresentando diferentes graus de antropofilia, podendo, em algumas situações particulares, constituir grandes colônias.

A origem evolutiva dos Triatominae permanece incerta. A primeira hipótese foi sugerida por Usinger (1944) que propõe origem monofilética para o grupo. Lent & Wygodzinsky (1979) corroboram com essa idéia e, em sua célebre revisão taxonômica, descrevem três autapomorfias para o grupo: o hábito hematofágico, presença da conexão membranosa entre o 2º e 3º segmentos do rostro e ausência de glândulas abdominais dorsais nas ninfas. Trabalhos atuais ainda defendem a condição monofilética dos triatomíneos (Perez et al., 1992; Hypsa et al., 2002). Em 1988, Schofield, baseando-se em aspectos ecológicos e biogeográficos, sugere pela primeira vez a origem polifilética do grupo. Outros trabalhos subseqüentes corroboram com essa idéia (Schofield, 2000; Schofield & Dolling, 1993; Gorla et al., 1997; Carcavallo et al., 1999; Schofield & Dujardin, 1999; Barges et al., 2000). Entretanto, esses trabalhos baseiam-se em diferenças moleculares e morfológicas entre Rhodniini e Triatomini que, segundo Schaefer (2003), podem não indicar origens distintas, mas somente uma diferenciação entre esses grupos. Hypsa et al. (2002), utilizando seqüências de DNA da região 16S sugere a monofilia para o grupo. Entretanto, Paula et al. (2005) utilizando as mesmas seqüências utilizadas por Hypsa et al. (2002), mas realizando a análise cladística com um grupo externo diferente, demonstram pela primeira vez a polifilia para o grupo. Esse fato demonstra que os resultados dependem da metodologia utilizada.

A identificação taxonômica do grupo é essencial para estudos da biologia, ecologia e comportamento do vetor, que são necessários para definir o risco epidemiológico e a capacidade vetorial de um determinado taxon (Abad-Franch & Monteiro, 2005).

Algumas espécies de triatomíneos, devido às semelhanças morfológicas, são agrupadas em complexos específicos (Carcavallo et al., 2000). Lent & Wygodzinsky (1979) incluem *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) e *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964 no complexo *T. infestans* juntamente com *Triatoma infestans* (Klug, 1834), *Triatoma arthurneivai* Lent & Martins, 1940, *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911, *Triatoma circummaculata* Stål, 1859, *Triatoma costalimai* Verano & Galvão, 1958, *Triatoma delponteii* Romana & Abalos 1947, *Triatoma guasayana* Wygodzinsky & Abalos, 1949, *Triatoma lenti* Sherlock & Serafim, 1967, *Triatoma matogrossensis* Leite & Barbosa, 1953, *Triatoma melanocephala* Neiva & Pinto, 1923, *Triatoma patagonica* Del Ponte, 1929, *Triatoma petrochiae* Pinto & Barreto, 1925, *Triatoma platensis* Neiva, 1913, *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843), *Triatoma sordida* (Stål, 1859),

Triatoma tibiamaculata (Pinto, 1926), *Triatoma vitticeps* (Stål, 1859), *Triatoma williami* Galvão, Souza & Lima, 1965, e *Triatoma wygodzinskyi* Lent, 1951. Carcavallo et al., 2000 em uma nova revisão dos complexos de espécies de triatomíneos, consideram 11 complexos para o gênero *Triatoma* Laporte, 1832, um deles é o 'complexo *T. maculata*', formado pelo *T. maculata* e *T. pseudomaculata*.

Os complexos de espécies de triatomíneos têm sido bastante discutidos na literatura, devendo ser reavaliada a discriminação das espécies envolvidas, a fim de estabelecer limites mais precisos para estas. A biosistemática propõe que os estudos taxonômicos levem em consideração a variabilidade natural das espécies nas suas áreas de ocorrência, evitando que a mesma espécie seja descrita várias vezes, necessitando, entretanto, que os limites intra e interespecíficos sejam definidos. Naturalmente os avanços dos estudos em genética auxiliam na classificação de espécies.

T. maculata é considerada uma espécie secundária, e o segundo triatomíneo mais capturado na Venezuela (Lent & Wygodzinsky, 1979). Apresenta grande variedade de tamanho, intensidade de pigmento no padrão de cores (Lent & Wygodzinsky, 1979). Sua distribuição geográfica inclui a Colômbia, Guiana, Aruba, Bonaire, Curaçao, Suriname, Venezuela (Carcavallo, 1997a; Lent & Wygodzinsky, 1979), com exceção da Tachira e Território Delta Amacuro (Carcavallo, 1997a). No Brasil, foi descrito no território de Roraima (Espínola, 1985; Carcavallo, 1997a; Lent & Wygodzinsky, 1979).

T. maculata pode apresentar-se em ambiente doméstico, peridoméstico e silvestre, sendo freqüentemente encontrada em galinheiros, currais, ninhos de aves (Carcavallo, 1997a; Lent & Wygodzinsky, 1979; Torrealba et al., 1985), covas de animais (Torrealba et al., 1985), chiqueiro (Lent & Wygodzinsky, 1979), palmeiras, árvores secas e com ocos e pombais (Carcavallo, 1997). Tonn et al. (1978) relatam a palmeira *Scheelea* sp. (hoje *Attalea* sp.) como habitat onde foi capturado o maior número de *T. maculata*, e onde o triatomíneo se encontrava associado a *R. prolixus*, *Rhodnius pictipes* Stål, 1872 e *R. robustus*.

A importância do *T. maculata* na transmissão da doença de Chagas, principalmente na Venezuela, é bastante discutida por diversos autores (Espínola et al., 1981). Como já mencionado, Lent & Wygodzinsky (1979) o consideram o segundo vetor da doença de Chagas em importância neste país, constituindo

30% dos triatomíneos capturados em domicílios (Torrealba et al., 1985). Díaz (1966) considera essa espécie como de importância secundária.

Em estudo para determinação de fonte de alimentação, Tonn et al. (1978) verificaram que os *T. maculata* capturados no ambiente silvestre e peridomiciliar, são predominantemente ornitofílicos, característica dessa espécie, e os domésticos alimentam-se em homens. Este último fato sugere a importância desse inseto na transmissão da doença de Chagas, apesar da taxa de infecção observada em *T. maculata*, nesse mesmo estudo, ser de 6,0% para os indivíduos capturados em ambiente silvestre, e negativa para os capturados no peridomicílio e intradomicílio.

O *T. pseudomaculata* foi descrito por Corrêa e Espínola (1964), estudando espécimes identificadas como *T. maculata*, providas de Roraima, Ceará, Paraíba e Bahia. Foram observadas diferenças relativas às manchas do pronoto (Lucena, 1973) e proposta a criação de uma nova espécie, *T. pseudomaculata*, sendo o tipo proveniente do Ceará (Espínola, 1964). O termo *pseudomaculata* foi utilizado por considerarem o *T. maculata* a espécie original, tendo o Suriname como localidade-tipo.

T. pseudomaculata é encontrado no Brasil nos Estados de Alagoas, Bahia, Brasília, Ceará, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte (Lent & Wygodzinsky, 1979; Carcavallo, 1997) Distrito Federal (Lent & Wygodzinsky, 1979), Sergipe, Mato Grosso do Sul (Carcavallo, 1997a) e Maranhão (Carcavallo, 1997a; Rebêlo et al., 1998), sendo provavelmente o Nordeste brasileiro o centro de dispersão dessa espécie (Freitas et al., 2005).

Devido ao seu hábito predominantemente peridomiciliar e ornitófilo, *T. pseudomaculata* não é considerado um vetor de importância primária (Silveira & Rezende, 1994; Borges et al., 1999), sua presença no intradomicílio está de acordo com o conceito de espécie secundária de Dias & Diotaiuti (1998), sendo minoritária em relação a outras espécies intradomiciliares do nordeste do Brasil (Lent & Wygodzinsky, 1979; Silveira & Rezende, 1994; Dias, 2002). Entretanto, a frequência e a alta densidade de *T. pseudomaculata* no ambiente artificial (peridomicílio) levaram Espínola (1985) a concluir que esta espécie apresenta importância epidemiológica na transmissão da doença de Chagas. Embora haja apenas dois relatos de encontro de colônias intradomiciliares em altas densidades deste inseto, uma no Ceará, em bairro de periferia de Sobral (Souza et al., 1999), e outra em Minas Gerais no município de Berilo (Assis, 2006), Dias

et al. (2000) consideram que esta seja uma espécie em adaptação ao ambiente artificial, que tem aumentado sua colonização no peridomicílio e seu grau de antropofilia.

Estudos realizados por Noireau et al (2001) e Santos et al. (2001) em uma região de caatinga, no município de Curaçá, Bahia, confirmaram os ocos de árvores como sendo habitats muito freqüentes da espécie, devido à alta freqüência com que o triatomíneo é encontrado nesses ecótopos e com grande percentual de ninfas. Fora estes relatos, a literatura registra apenas um encontro do *T. pseudomaculata* no ambiente silvestre, relativo à captura de uma fêmea no Norte de Minas Gerais em um oco de uma árvore (Diotaiuti et al., 1993). No Brasil, a espécie representa o terceiro triatomíneo mais capturado pelas atividades de controle da doença de Chagas, apenas ultrapassado pelo *T. sordida* e *T. brasiliensis* (Dias, 2002), podendo ser encontrado principalmente em galinheiros, currais e estábulos (Carcavallo, 1997a).

Galvão (1973) descreve diferenças de caracteres cromáticos, de medidas e de genitália externa entre *T. maculata* e *T. pseudomaculata*. A primeira espécie apresenta o colorido geral com áreas claras mais extensas e em maior quantidade em relação ao *T. pseudomaculata*, esta não apresenta manchas na face dorsal da cabeça, o que é observado em *T. maculata*. O pronoto de *T. pseudomaculata* possui 3+3 áreas claras maiores e 1+1 áreas claras menores, em *T. maculata* são observadas 4+4 áreas claras maiores e 2+2 áreas claras menores. *T. maculata* apresenta o processo do escutelo mais longo que a base e *T. pseudomaculata* do mesmo tamanho da base. Quanto às medidas do corpo, *T. maculata* apresenta-as maiores com exceção da região pós ocular e do pescoço, que são iguais às atribuídas à *T. pseudomaculata*. A genitália externa de *T. maculata* possui o processo do endossoma melânico e *T. pseudomaculata* apresenta-o claro (Galvão, 1973). Segundo Lent & Wygodzinsky (1979), *T. maculata* e *T. pseudomaculata* são espécies que não são facilmente distinguíveis por estruturas externas, mas podem ser diferenciadas seguramente pela análise do processo endossomal lateral do falo.

T. maculata e *T. pseudomaculata* são espécies alopátricas. Segundo Schofield (1988), *T. maculata* teria sido introduzida no Nordeste brasileiro por aves migratórias, com subsequente especiação, e formação da espécie *T. pseudomaculata*. Entretanto, Santos (2003) com o objetivo de estudar a relação entre *T. maculata*, *T. pseudomaculata* e *T. wygodzinskyi* (erroneamente

identificado como *T. arthurneivai* na ocasião dos estudos), e utilizando isoenzimas como marcador genético, discorda da hipótese de que *T. maculata* e *T. pseudomaculata* tenham uma mesma origem, propondo o fim do complexo 'T. maculata' e o agrupamento de *T. pseudomaculata* e *T. wygodzinskyi* em um novo complexo, o complexo 'T. wygodzinskyi'.

De fato, *T. wygodzinskyi* é uma espécie bastante semelhante a *T. arthurneivai* (Lent & Wygodzinsky, 1979) e a *T. maculata* (Lent, 1951), desta última espécie podendo ser diferenciado pela ausência dos tubérculos discais e laterais do pronoto; o ápice do escutelo é menor; diferenças cromáticas, principalmente no pronoto; e seus olhos são menos largos (Lent, 1951). Sua distribuição geográfica é o estado de Minas Gerais (Lent & Wygodzinsky, 1979; Lent, 1951) e sua biologia ainda é desconhecida (Lent, 1951).

No trabalho de descrição do *T. pseudomaculata*, Corrêa e Espínola (1964) referem-se à possibilidade de obtenção de híbridos em acasalamentos com *T. maculata*, e a inviabilidade dos ovos principalmente quando o cruzamento era no sentido *T. pseudomaculata* macho *T. maculata* fêmea. Mais tarde, com novos cruzamentos, incluindo também *T. pseudomaculata* da Paraíba e de Minas Gerais, Espínola (1974) confirma a validade do *T. pseudomaculata* como espécie, e propõe o reconhecimento de *T. pseudomaculata pseudomaculata* e *T. pseudomaculata minasensis* como entidades subespecíficas distintas.

Os estudos de hibridização em triatomíneos permitem a formulação de hipóteses acerca da origem e divergência de espécies e podem ajudar a entender a sistemática do grupo (Pérez et al., 2005). Segundo Usinger et al. (1966), hibridizações em laboratório podem avaliar quantitativamente a afinidade taxonômica e está correlacionada com o grau de semelhanças morfológicas entre as espécies. Diversos autores têm estudado experimentalmente híbridos entre espécies de triatomíneos (Carcavallo et al., 1997b), algumas delas são: *Triatoma picturata* Usinger, 1939 e *Triatoma pallidipennis* (Stål, 1972); *T. picturata* e *T. pallidipennis*; *T. picturata* e *Triatoma mazzotti* Usinger, 1941; *Triatoma phyllosoma* (Burmeister, 1835) e *T. pallidipennis* (Mazzotti & Osório, 1941, 1942); *T. infestans* e *T. platensis*; *T. platensis* e *T. delpontei* (Abalos, 1948); 'complexo protracta' (Ryckman, 1962); *T. maculata* e *T. pseudomaculata* (Corrêa & Espínola, 1964); *T. brasiliensis* e *T. petrocchae* (Espínola, 1971); *T. infestans* e *T. pseudomaculata* (Schreiber et al., 1974); *R. prolixus* e *R. neglectus* (Carvalho & Barreto, 1976); *T. infestans* e *T. rubrovaria* (Blanch,

1833) (Franca-Rodríguez et al., 1979); (Zárate & Zárate, 1985); *R. prolixus* e *R. robustus* (Galíndez et al., 1994); *T. infestans* e *T. platensis*, *T. platensis* e *T. delpontei*; *T. infestans* e *T. rubrovaria*; *T. infestans* e *T. delpontei* (Pérez et al., 2005). Carcavallo et al. (1997b) consideram que a possibilidade de obtenção de híbridos entre essas várias espécies colocam em dúvida alguns taxa.

O estudo de híbridos é intrigante considerando o conceito de espécie proposto por Mayr et al. (1953): "Espécies são grupos de populações real ou potencialmente intercruzantes que estão isoladas reprodutivamente de outros grupos". Usinger et al. (1966) após revisão de hibridizações entre espécies de triatomíneos reescreveram o conceito de espécie proposto por Mayr et al. (1953): "evidências de laboratório de infertilidade ou de barreiras de esterilidades não estão sempre correlacionadas com evidências morfológicas. Barreiras ecológicas são mais importantes que as barreiras genéticas quando as populações se sobrepõem por causa da domiciliação".

Perlowagora-Szumlewicz et al. (1972, 1974, 1976) estudaram o grau de isolamento reprodutivo entre triatomíneos morfológicamente diferentes e concluíram que a ocorrência de cruzamentos recíprocos (macho de uma espécie com fêmea de outra e vice-versa) entre *T. pseudomaculata* e *T. sordida* demonstra proximidade genética entre essas duas espécies, enquanto cruzamentos unilaterais (ocorrem somente em um sentido, macho de uma espécie e fêmea da outra), como o de *T. pseudomaculata* com *T. infestans* e *T. brasiliensis*, e *R. neglectus* com *R. prolixus*, demonstram relação mais distante.

Estudo citogenético da espermatogênese em híbridos do cruzamento entre *T. infestans* e *T. pseudomaculata* demonstrou que os cromossomos homólogos das duas espécies parentais não pareiam, os espermatozóides dos híbridos apresentam diferenças de forma e tamanho e a quantidade de DNA dos núcleos dos híbridos tem um valor intermediário entre os valores dos pais (Schreiber et al., 1974). Galvão (1978) caracterizou morfológicamente híbridos e suas espécies parentais de diversas espécies vetoras da doença de Chagas. Esse autor acasalou *T. pseudomaculata* com *T. sordida*, *T. infestans* e *T. brasiliensis* e verificou que os híbridos apresentaram dominância parcial dos caracteres somáticos e cromáticos de *T. sordida*, *T. infestans* e *T. brasiliensis*, concluindo que os caracteres dependem da espécie e não do sexo. Em cruzamentos entre *R. prolixus* e *R. neglectus*, a dominância parcial de uma das espécies não foi tão

evidente, sugerindo que os limites interespecíficos entre estas não são tão definidos quanto os das espécies do gênero *Triatoma* (Galvão, 1978).

Várias técnicas vêm sendo utilizadas com sucesso para o estudo comparativo inter e intra-específico de diferentes insetos, entre elas a morfologia comparada, morfometria, isoenzimas e de biologia molecular.

A morfometria, estudo da variação de forma e sua covariação com outras variáveis (Bookstein, 1991), utiliza técnicas analíticas capazes de quantificar a variação morfométrica e separar os componentes genético e ambiental da característica analisada (Jaramillo & Dujardin, 2006). A morfometria tradicional estima distâncias entre pontos anatômicos, ou seja, trabalha com medidas dos organismos; a morfometria geométrica utiliza as coordenadas destes pontos (Dujardin & Slice, 2006). Dessa forma, esta nova abordagem traz algumas vantagens: permite uma quantificação precisa das diferenças de conformação e a sua visualização em gráficos de deformação; através da obtenção de variáveis de conformação e de tamanho separadamente, é possível visualizar e testar a alometria (Bookstein, 1991); é capaz de revelar todas as informações das relações espaciais entre esses pontos (Gumiel et al., 2003). A morfometria geométrica tem sido amplamente utilizada em estudos de triatomíneos, principalmente para estudos populacionais, mas também tem mostrado bons resultados nas análises interespecíficas. Matias et al. (2001) identificaram um espécime de *R. robustus* na Bolívia comparando com outras espécies do gênero através de morfometria geométrica das asas. Patterson et al. (2001) verificaram alto grau de similaridade entre *Triatoma rubrofasciata* (De Geer, 1773) e outras sete espécies de *Triatoma* do Novo Mundo através da morfometria geométrica da cabeça, e sugeriram que estas espécies apresentam ancestralidade comum. Villegas et al. (2002), diferenciaram *R. prolixus* de *R. robustus*, espécies muito similares morfológica e geneticamente.

Algumas técnicas de Biologia Molecular vêm sendo utilizadas na caracterização genética de triatomíneos, que é de fundamental importância para auxiliar na tomada de decisões sobre questões sistemáticas ao nível específico e intraespecífico. O método de sequenciamento genético, produzido pela amplificação enzimática de fragmentos genômicos utilizando seqüências arbitrárias de nucleotídeos sob baixa estrigência (RAPD- "Random Amplified Polymorphic DNA"), é considerado extremamente apropriado para a realização de mapas genéticos, diferenciação específica animal e vegetal, impressões de

DNA, com grande utilidade nos estudos de genética de populações (Williams et al., 1990). Esses fragmentos são amplificados a partir de iniciadores específicos, mas aleatoriamente distribuídos por todo o genoma, apresentando ainda a vantagem de automatização do mapeamento, o que aumenta o poder de análises genéticas de organismos que não apresentam amplo número de marcadores fenotípicos. Apesar dessas vantagens, a RAPD-PCR pode apresentar problemas na reprodutibilidade e interpretação das bandas (Adad-Franch & Monteiro, 2005). Hadrys et al. (1992) estudaram as aplicações da RAPD na área da ecologia molecular e concluíram que ela pode ser utilizada na determinação de identidades taxonômicas, cálculos de graus de parentescos, análises de genomas bem como pode ser aplicada também na presença de pequenas quantidades de DNA. Vanlerberghe-Masutti et al. (1994) usaram técnicas moleculares para identificação e filogenia de sete espécies de vespas do gênero *Trichogramma* e verificaram que os RAPDs são marcadores confiáveis no diagnóstico de espécies de relações filogenéticas. Esta técnica também tem sido utilizada com sucesso em estudos com bactérias (Welsh et al., 1991a), trematódios (Dias Neto et al., 1993), insetos (Ballinger-Crabtree et al., 1992), protozoários (Tybayrenc et al., 1993; Steindel et al., 1993) e mamíferos (Welsh et al., 1991b).

Utilizando a técnica de RAPD no estudo de triatomíneos, Garcia et al. (1998) compararam diferentes gêneros, espécies e algumas populações deste grupo, conseguindo a diferenciação específica de tais insetos, inclusive de algumas consideradas morfologicamente similares (*Rhodnius ecuadoriensis* Lent & Leon, 1958, *Rhodnius pictipes* Stål, 1872 e *R. nasutus*, e a confirmação da afinidade entre as mesmas. Dujardin et al. (1998a), compararam populações de *R. prolixus* da Colômbia e Honduras, com dados de RAPD e morfométricos, e sugeriram que essa espécie foi introduzida no ambiente domiciliar da América Central recentemente, sem qualquer ligação com o ambiente silvestre. Jaramillo et al. (2001), utilizando essa técnica, verificaram que *Rhodnius colombiensis* Mejia, Galvão & Jurberg, 1999 silvestres e *R. prolixus* capturados no intradomicílio são isolados reprodutivamente, e que a primeira espécie apresenta maior variação genética em relação à outra. Populações de *T. brasiliensis* foram separadas segundo seu ecótopo, silvestre, peridomicílio ou domicílio, demonstrando, ainda, que o processo de domiciliação dessa espécie é decorrente de processos múltiplos de invasão das casas por exemplares silvestres (Borges et al., 2000; 2005). Barbosa et al. (2006), agruparam populações de *Panstrongylus*

megistus (Burmeister, 1835) de diferentes áreas geográficas com suas respectivas origens biogeográficas.

O perfil eletroforético de isoenzimas de triatomíneos (diferentes formas moleculares de uma mesma enzima), apesar do baixo polimorfismo do grupo, é amplamente utilizado em estudos intraespecíficos destes insetos com vários objetivos, como o de determinar fluxo gênico, variabilidade e estruturação genética de populações. Em estudos taxonômicos, de identificação de espécies, distinção de espécies crípticas, isolamento reprodutivo entre espécies simpátricas, entre outros (Adad-Franch & Monteiro, 2005). Por ser um marcador co-dominante, também é adequada para o estudo de heterozigidade (Hillis et al., 1996), podendo ser utilizada para demonstrar a possibilidade de obtenção de híbridos, naturais ou experimentais, se utilizadas enzimas que tenham loci específicos para cada espécie estudada. As isoenzimas têm sido amplamente utilizadas em estudos populacionais de *T. infestans* (Dujardin et al., 1987; 1998b; Garcia et al., 1995), *T. brasiliensis* (Costa et al., 1997; Borges et al., 2000a), *T. sordida* (Noireau et al., 1999), *R. prolixus* e *Rhodnius pallescens* Barber, 1932 (Lopez & Moreno, 1995), *R. neglectus* (Soares et al., 1999), *Psammolestes tertius* Lent & Jurberg, 1965 (Soares et al., 2001), *P. megistus* (Barbosa et al., 2003). As isoenzimas também são utilizadas na diferenciação específica, principalmente quando as espécies apresentam difícil distinção morfológica ou pertencem a complexos de espécies (Harry et al., 1992; Lopes & Moreno, 1995; Solano et al., 1996). Harry et al. (1992) diferenciaram *R. pictipes* de *R. prolixus* e *R. robustus*, mas não foi possível a separação dos dois últimos taxa, resultados que foram confirmados por Monteiro et al. (2002). Chavez et al. (1999) agruparam espécies de *Rhodnius* de acordo com a área geográfica original e revelaram relações interespecíficas diferentes do que sugeria a morfologia. Dujardin et al. (1999b), em estudo de reconstrução filogenética do grupo Rhodniini, observaram três principais grupos de espécies dentro do gênero *Rhodnius*. Panzera et al. (1997) confirmaram o status taxonômico de *T. sordida*, *Triatoma guasayana* Wygodzinsky & Abalos, 1949 e *T. patagonica*, que integram o 'complexo *T. sordida*'.

Tendo em vista que os estudos de hibridização em triatomíneos permitem a formulação de hipóteses acerca da origem e divergência de espécies e podem ajudar a entender a sistemática do grupo, este estudo pretende colaborar com o entendimento relacionado à capacidade de produção de híbridos através da determinação do grau de isolamento reprodutivo entre *T. maculata* e *T.*

pseudomaculata, e da caracterização morfológica e genética das espécies e dos híbridos obtidos pelos cruzamentos entre essas espécies, permitindo o cotejamento de aspectos genéticos com outras características biológicas e comportamentais destes insetos.

2 – OBJETIVOS

2.1 - OBJETIVO GERAL:

Determinar a viabilidade do cruzamento entre *T. maculata* e *T. pseudomaculata* e caracterizar morfológica e molecularmente os híbridos obtidos.

2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1- Analisar a biologia de *T. maculata* e *T. pseudomaculata* e de seus cruzamentos interespecíficos quanto:

- ao número de ovos postos diariamente;
- ao tempo de incubação dos ovos;
- à porcentagem de ovos eclodidos.

2- Analisar a viabilidade do cruzamento entre *T. maculata* e *T. pseudomaculata* através da:

- fertilidade dos ovos;
- viabilidade dos embriões;
- capacidade de retrocruzamento com as colônias parentais;
- geração de perfis híbridos de isoenzimas.

3- Caracterizar os híbridos de cruzamentos de *T. maculata* e *T. pseudomaculata* de acordo com:

- morfologia qualitativa;
- morfometria geométrica;
- perfil de isoenzimas;
- perfil de RAPDs.

4- Analisar as relações taxonômicas entre *T. maculata*, *T. pseudomaculata* e *T. wygodzinskyi* através das análises de morfometria geométrica e RAPDs.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - POPULAÇÕES

Os exemplares parentais da colônia de *T. maculata* foram obtidos pela captura em palmeira inajá (*Attalea maripa*), no município de Mucajaí, Roraima (N 2° 26' 16,3" e W 61° 0,1' 14,8"). Os de *T. pseudomaculata* foram capturados no ambiente peridomiciliar de unidades domiciliares do município de Sobral, estado do Ceará (S 3° 47' 22" e W 40° 24' 08"), com a colaboração da FUNASA. Os exemplares de *T. wygodzinskyi*, provenientes de São João da Boa Vista, São Paulo (S 21° 79' 38" e W 46° 84' 71"), foram cedidos pelo insetário do Laboratório de Referência Nacional e Internacional em Triatomíneos, do Instituto Oswaldo Cruz. As colônias foram instaladas no insetário do Centro de Pesquisas René Rachou. As datas de início das colônias foram: *T. maculata*, novembro de 2002; *T. pseudomaculata*, setembro de 2003; e *T. wygodzinskyi*, maio de 2003.

Os insetos foram mantidos em estufa B.O.D com temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ com umidade relativa de $65 \pm 5\%$, em frascos com fundo recoberto com folhas de papel filtro, para a retenção da umidade produzida pelas fezes e urina dos insetos, e uma sanfona vertical de cartolina, com a finalidade de aumentar a superfície interna do frasco, permitindo maior movimentação dos triatomíneos e facilitando a alimentação. As colônias foram alimentadas semanalmente com camundongos anestesiados com Tiopental.

Para a realização dos experimentos, foram utilizados insetos procedentes do campo, ou, no máximo, da primeira geração obtida em laboratório, exceto para *T. wygodzinskyi*, que foram obtidos na segunda geração. Para a caracterização dos híbridos obtidos foram utilizados insetos da primeira geração.

3.2 - CRUZAMENTOS INTRAESPECÍFICOS E INTERESPECÍFICOS

Para a realização dos cruzamentos interespecíficos e intraespecíficos foram constituídos 10 casais de triatomíneos para cada grupo: (1) fêmea de *T. pseudomaculata* e macho de *T. maculata*, (2) fêmea de *T. maculata* e macho de *T. pseudomaculata*, (3) fêmea e macho de *T. pseudomaculata*, (4) fêmea e macho de *T. maculata*, sendo os grupos 3 e 4 considerados controle.

Os insetos foram sexados ainda no quinto estágio e machos e fêmeas mantidos isoladamente, com alimentação semanal em camundongos suíços anestesiados. Os casais foram constituídos, no máximo, três dias após a muda imaginal, mantidos um por frasco, e cada fêmea foi acompanhada diariamente em relação à postura e viabilidade dos ovos. Os híbridos foram mantidos para obtenção de insetos adultos para a posterior caracterização.

Durante o desenvolvimento desse trabalho, foi apresentada a dissertação de Santos (2003), onde ela observou uma maior relação entre *T. pseudomaculata* com *T. wygodzinskyi* do que em relação à *T. maculata*. Iniciamos então a constituição de casais de *T. wygodzinskyi* com *T. maculata* e *T. pseudomaculata* em ambos os sentidos de cruzamento dos quais foram obtidos híbridos. Entretanto, os resultados são preliminares, não sendo mostrados nesse trabalho, e não houve tempo de proceder todas as análises. *T. wygodzinskyi* foi utilizado na análise de morfometria geométrica e de RAPDs, os híbridos só puderam ser utilizados na análise de RAPDs. Os casais e a prole foram mantidos com o mesmo protocolo descrito acima.

Com os dados obtidos das observações diárias foi realizada análise estatística paramétrica (ANOVA) ou não paramétrica (Kruskal Wallis), dependendo das características dos dados, pelo programa Graph Pad Prism version 3.00, e construídas tabelas.

Para analisar a fertilidade dos híbridos foram montados alguns grupos de retrocruzamento (tabela 3.1).

Tabela 3.1 – Grupos de retrocruzamentos montados com os híbridos obtidos do cruzamento entre *T. maculata* e *T. pseudomaculata* e suas espécies parentais.

Macho	Fêmea
Híbridos do cruzamento entre <i>T. maculata</i> macho e <i>T. pseudomaculata</i> fêmea	<i>T. maculata</i>
	<i>T. pseudomaculata</i>
<i>T. maculata</i>	Híbridos do cruzamento entre <i>T. maculata</i> macho e <i>T. pseudomaculata</i> fêmea
<i>T. pseudomaculata</i>	
<i>T. maculata</i>	Híbridos do cruzamento entre <i>T. pseudomaculata</i> macho e <i>T. maculata</i> fêmea

Híbridos machos e fêmeas que não foram utilizados para a obtenção de material para as análises foram mantidos juntos para a observação de cruzamento entre eles. Os grupos foram observados semanalmente quanto à presença de ovos e de espermateca, para a verificação da ocorrência de cruzamento.

3.3 – MORFOLOGIA

Para este estudo foram utilizados 30 insetos (15 machos e 15 fêmeas) de cada espécie e dos híbridos obtidos. As características morfológicas analisadas foram: (1) altura e (2) coloração da cabeça; (3) tamanho dos olhos; (4) manchas na pleura; (5) tamanho dos pêlos do primeiro segmento do rostro; (6) tubérculos e (7) manchas do pronoto; e (8) forma do ângulo ântero-lateral.

Para a análise computacional entre os grupos, foi construída uma matriz de presença/ausência de caracteres morfológicos e gerado um fenograma. A análise foi realizada pelo programa NTSYs (Rohlf, 1998) utilizando-se o coeficiente de associação de Dice (Dice, 1945), que mede as coincidências e as diferenças dos estados dos caracteres entre as OTUs (Unidades Taxonômicas Operacionais). Posteriormente foi construído um fenograma com UPGMA (Método de Agrupamento aos Pares Utilizando Médias Aritméticas) (Sneath & Sokal, 1962; 1973).

3.4 - MORFOMETRIA GEOMÉTRICA

Para este estudo foram utilizadas as duas asas de dez exemplares (cinco machos e cinco fêmeas) de *T. maculata*, *T. pseudomaculata*, *T. wygodzinskyi* e dos dois grupos de híbridos obtidos nos cruzamentos entre *T. maculata* e *T. pseudomaculata*.

As fotos das asas foram tiradas com máquina fotográfica digital em lupa com aumento de 80x.

Foram utilizados nove pontos de referência (figura 3.1) na parte membranosa do hemiélitro. As coordenadas dos pontos de referência foram digitalizadas utilizando o programa COO, versão 36 (Dujardin, 2006).

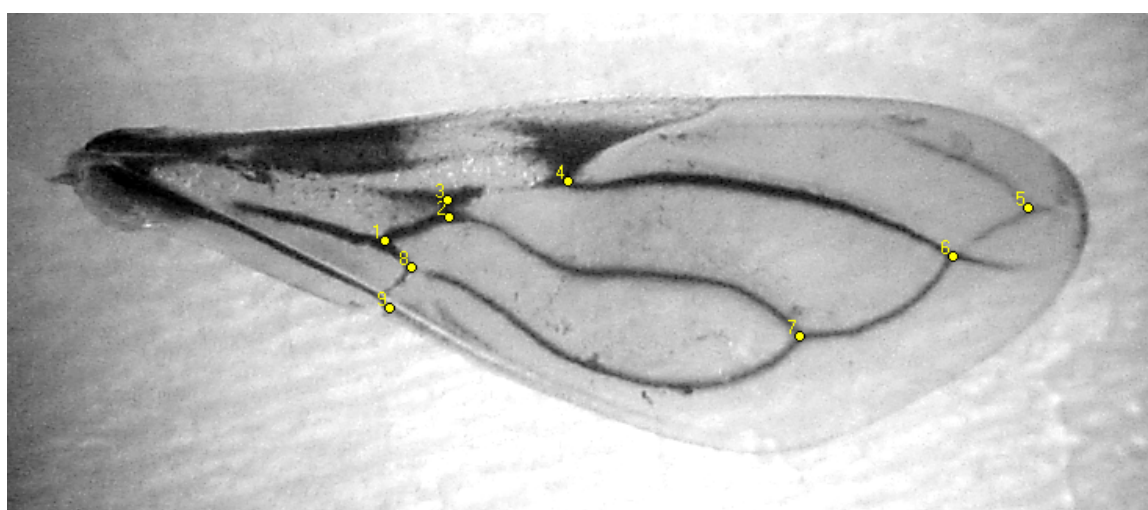


Figura 3.1 – Vista dorsal da asa direita de *T. maculata*. Círculos e números associados indicam os pontos de referência utilizados.

Para a comparação dos tamanhos das asas entre os grupos, foi utilizado o tamanho centróide derivado das coordenadas (MOG, versão 75, Dujardin, 2006). O tamanho centróide é um estimador isométrico que representa o ponto central do polígono formado pelas coordenadas de cada indivíduo. Uma análise estatística (ANOVA) foi realizada para verificar diferença entre o tamanho centróide dos indivíduos de cada grupo (STATISTICA).

A Análise Generalizada de Procrustes, responsável pelo reposicionamento, reescala e reorientação dos pontos de referência também foi realizada com o programa MOG, versão 75 (Dujardin, 2006).

A Análise dos Componentes Principais para a remoção da alometria comum aos grupos foi realizada no programa COV, versão 35 (Dujardin, 2006), com esta análise foi também obtida as distâncias Euclidianas entre os grupos. Utilizando

estas distâncias foi verificado se o resíduo alométrico é igual para todos os grupos (MANCOVA) e obtida uma árvore com UPGMA dos grupos estudados.

Utilizando o programa PAD, versão 82 (Dujardin, 2006) foi realizada a Análise Discriminante, obtidas as distâncias de Mahalanobis das variáveis de conformação, a significância entre estas distâncias (permutação) e construída uma árvore com UPGMA. Para verificar a significância do resíduo alométrico na discriminação dos grupos, foi realizado um teste de regressão linear múltipla entre os valores dos fatores canônicos e o tamanho centróide.

Os programas utilizados para as análises de morfometria geométrica estão disponíveis em <http://www.mpl.ird.fr/morphometrics>.

3.5 - EXTRAÇÃO DE DNA

Realizada a partir de uma pata de cada inseto adulto ou de quinto estágio, conservadas em freezer -70°C, utilizando o Kit de Extração de DNA Genômico Wizard (Promega), segundo protocolo no anexo 1.

A pureza e concentração do DNA foi estimada por leitura em espectrofotômetro (GeneQuant, Amersham Pharmacia Biotech) a 260 e 280nm a partir de 25 µl da solução de DNA adicionado de 25 µl da solução de hidratação de DNA (Promega).

3.6 – POLIMORFISMOS DE DNA AMPLIFICADOS ALEATORIAMENTE (RAPD)

Um estudo inicial com parentais de seis casais de cada cruzamento entre *T. maculata* e *T. pseudomaculata* (total de 12 casais, 24 indivíduos) e com doze descendentes de cada casal (seis machos e seis fêmeas) foi realizado para verificar a ocorrência de variabilidade genética dentro dos grupos e possível diferenciação sexual.

Para a análise e obtenção do fenograma foram utilizadas amostras tomadas aleatoriamente de dois exemplares *T. maculata* (um macho e uma fêmea), dois *T. pseudomaculata* (um macho e uma fêmea), dois *T. wygodzinskyi* (um macho e uma fêmea), dois descendentes (um macho e uma fêmea) de cada casal formado por *T. maculata* e *T. pseudomaculata* (total de 12 híbridos de cada cruzamento), um híbrido do cruzamento entre *T. maculata* macho e *T. wygodzinskyi* fêmea, dois híbridos do cruzamento entre *T. wygodzinskyi* macho e *T. maculata* fêmea, dois híbridos do cruzamento entre *T. pseudomaculata* macho e *T. wygodzinskyi* fêmea, dois híbridos do cruzamento entre *T. wygodzinskyi* macho e *T. pseudomaculata* fêmea, e um *R. prolixus* como grupo externo.

A técnica de RAPD-PCR foi realizada segundo Borges et al. (2000). Foram utilizados quatro iniciadores: 3302 (5' CTGATGCTAC 3'), 3303 (5' TCACGATGCA 3'), 3304 (5' AGCATCTGTT 3') e 3307 (5' AGTGCTACGT 3') sintetizados pelo laboratório químico GIBCO BRL. Esses iniciadores foram selecionados a partir de trabalhos anteriores com *T. brasiliensis* (Borges et al., 2000b), *T. pseudomaculata* (Nunes, 2004) e *P. megistus* (Barbosa et al., 2006), por apresentarem perfis multivariados, com boa definição e maior poder de diferenciação.

Para a amplificação do DNA foi utilizado o Kit Taq DNA Polymerase em tampão de estoque B (Promega, Madison, WI). Para cada 10 µl de reação foram utilizados: 1 µl de tampão de reação livre de cloreto de magnésio (MgCl₂) (20mM Tris-HCl, 100mM KCl, 1,0mM EDTA, 1nM DDT, 50% glicerol, 0,5% Tween ® 20, 0,5% Nonidet®-P40); 0,6µl MgCl₂ 25mM; 1 µl de dNTP com 200µM de cada nucleotídeo (Promega, Madison, WI); 1 µl de iniciador 12,5pmol, 0,2 µl de Taq DNA polimerase 5u/µl; 1 µl de DNA; água q.s.p. 10 µl.

A amplificação enzimática foi realizada em termociclador MJR Research PTC 100, com o seguinte ciclo: desnaturação inicial a 94°C por três minutos; três ciclos com anelamento a 30°C por dois minutos, extensão a 72°C por um minuto, desnaturação a 95°C por 30 segundos; 34 ciclos com anelamento a 40°C

por dois minutos, extensão a 72°C por um minuto, desnaturação a 95°C por 30 segundos; anelamento final a 40°C por um minuto; e extensão final a 72°C por cinco minutos.

Para a análise inicial, os produtos de amplificação foram visualizados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% (anexo 2a) em sistema mini-gel (BioRad) e para a análise entre grupos, em gel de poliacrilamida 6% com 45 canaletas (anexo 2b), ambos corado por prata (anexo 2c). Em cada canaleta foram aplicados 3µl (mini-gel) e 6µl (40 canaletas) da reação amplificada acrescida de igual volume de tampão de amostra concentrado duas vezes.

O tampão de corrida foi o TBE 1x (anexo 2c) e o tempo de corrida foi de aproximadamente 1 hora e 40 minutos a 120 volts (aproximadamente 30mA/gel). Como padrão de tamanho de bandas foi utilizado fragmentos de ΦX 174RF DNA/*Hae III* (Gibco).

Algumas medidas preventivas foram tomadas para a obtenção de uma amplificação livre de produtos inespecíficos: separação física entre o ambientes para preparo das reações de PCR e o de tratamento de produtos amplificados; adoção de múltiplos controles negativos; mistura prévia dos componentes da reação em um "mix", diminuindo o número de manipulações nos tubos da reação; submissão dos tubos, ponteiras, pipetas e alíquotas dos componentes de reação à radiação ultravioleta por 20 minutos antes de sua utilização; limpeza rigorosa do local de preparo com hipoclorito e álcool 70%; utilização do mesmo termociclador a fim de evitar as pequenas variações que podem ocorrer entre uma máquina e outra.

A verificação da ocorrência da variabilidade genética, presença e ausência de bandas de cada grupo foi feita apenas por inspeção visual. Para a análise entre os grupos, foi feita uma matriz táxon/caracter a partir da análise dos perfis individuais. Para essa matriz, cada banda foi tratada como um caracter, sua presença ou ausência foi codificada como 1 ou 0, respectivamente. A matriz foi submetida à análise computacional através do programa NTSYS-pc (versão 2.0), utilizando o coeficiente de associação de Dice (Dice, 1945) e posteriormente construído um fenograma com UPGMA (Sneath & Sokal, 1962, 1973). Para a análise foram selecionadas bandas bem definidas com fácil distinção a fim de evitar erros de interpretação dos perfis.

Os marcadores genéticos RAPDs foram analisados assumindo-se os seguintes pressupostos: os alelos RAPDs segregam em proporções Mendelianas;

as bandas de mesmo tamanho são homólogas; os diferentes loci segregam independentemente; e as populações analisadas se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Apostol et al., 1996).

Para avaliar a diferenciação genética entre os grupos, foram calculadas a identidade genética e distância genética entre eles (Nei, 1972) (programa PopGene versão 1.32). A distância de Nei (1972) é uma medida robusta de distância genética que leva em conta os loci polimórficos e monomórficos e estima o número de códons diferentes por locus entre os grupos (Nei & Roychoudhury, 1974). Essa estatística pressupõe uma medida de identidade genética, “expressa pela probabilidade de que dado alelo de um loco, tomado ao acaso em duas diferentes populações, seja idêntico em relação à probabilidade de que os dois alelos do mesmo loco, tomados também ao acaso em cada população, sejam também idênticos” (Dias, 1998).

Com os valores das distâncias genéticas, foi construído um dendograma UPGMA através do programa Mega v. 2.1 (Kumar et al., 2004) para visualizar as relações entre os grupos estudados.

3.7 – ISOENZIMAS

Foram estudadas sete enzimas: MDH, GPI, 6PGD, ICD, α -GPD, PEP-2 e PGM (anexo 4).

Para este estudo foram utilizados seis casais interespecíficos com dois descendentes de cada cruzamento, *T. maculata* macho com *T. pseudomaculata* fêmea e *T. pseudomaculata* macho e *T. maculata* fêmea. Totalizando 12 insetos (06 machos e 06 fêmeas) de cada espécie e dos híbridos obtidos em cada cruzamento.

As enzimas foram obtidas a partir do músculo alar extraído através de um corte na região pronotal como auxílio de tesoura e pinça. O material extraído foi macerado com pistilo em 100 μ l de estabilizador enzimático (ditiotriol 2mM, ácido aminocapróico 2mM e EDTA 2mM) (Dujardin & Tibayrenc, 1985) e centrifugado à 14.000 rpm a 4°C. O sobrenadante, extrato enzimático, foi congelado e mantido em nitrogênio líquido (-196°C) em forma de pérolas com aproximadamente 10 μ l cada. A partir de uma pérola de cada amostra, foram realizadas eletroforeses em gel de amido (Starch hydrolysed, Sigma).

A eletroforese foi realizada a 4°C segundo Romanha (1982) e Dujardin & Tibayrenc (1985). Os tampões de reação, soluções de revelação, voltagens e tempo de corrida são específicos para cada enzima e estão mostrados no anexo 3. Os resultados foram desenhados e fotografados.

4 – RESULTADOS

4.1 - CRUZAMENTOS INTERESPECÍFICOS

Nenhum dos parâmetros analisados foi significativamente diferente para os cruzamentos específicos, *T. maculata* com *T. maculata* e *T. pseudomaculata* com *T. pseudomaculata* (tabela 4.1).

Os cruzamentos com fêmea de *T. maculata* apresentaram menor número de ovos postos (tabela 4.1A) e maior tempo de desenvolvimento dos embriões (tabela 4.1B) que o cruzamento controle de *T. pseudomaculata*; já os ovos dos cruzamentos com macho de *T. maculata* tiveram menor tempo para eclosão em relação ao cruzamento controle de *T. pseudomaculata* (tabela 4.1B). O percentual de ovos eclodidos foi significativamente diferente apenas para aqueles dos casais de *T. maculata* macho e *T. pseudomaculata* fêmea (tabela 4.1C) em relação ao cruzamento controle de *T. maculata*. Observou-se nesse grupo um casal cujos ovos não eclodiram.

Tabela 4.1 - Tabelas construídas com dados das observações diárias dos cruzamentos com os quatro grupos: *T. maculata* macho com *T. maculata* fêmea ($Tm_{\text{♂}} \times Tm_{\text{♀}}$), *T. pseudomaculata* macho com *T. pseudomaculata* fêmea ($Tp_{\text{♂}} \times Tp_{\text{♀}}$), *T. maculata* macho com *T. pseudomaculata* fêmea ($Tm_{\text{♂}} \times Tp_{\text{♀}}$), *T. pseudomaculata* macho e *T. maculata* fêmea ($Tp_{\text{♂}} \times Tm_{\text{♀}}$). Os valores são referentes à média e o desvio padrão de cada observação. A parte inferior das tabelas refere-se às análises estatísticas realizadas.

A - Média do número de ovos postos

	$Tm_{\text{♂}} \times Tm_{\text{♀}}$	$Tp_{\text{♂}} \times Tp_{\text{♀}}$	$Tm_{\text{♂}} \times Tp_{\text{♀}}$	$Tp_{\text{♂}} \times Tm_{\text{♀}}$
1ª semana	12,6 ± 4,3	16,1 ± 4,5	12,4 ± 4,2	12,4 ± 4,6
2ª semana	9,9 ± 6,0	14,4 ± 4,5	9,5 ± 5,3	8,6 ± 3,0
total	22,5 ± 8,1	30,5 ± 8,2	21,5 ± 7,8	21 ± 5,9
$Tm_{\text{♂}} \times Tm_{\text{♀}}$		ns	ns	ns
$Tp_{\text{♂}} \times Tp_{\text{♀}}$			ns	S
$Tm_{\text{♂}} \times Tp_{\text{♀}}$				ns
$Tp_{\text{♂}} \times Tm_{\text{♀}}$				

ns- diferença não significativa, $p > 0,05$

S - diferença significativa, $p < 0,05$.

Teste estatístico: ANOVA

B - Média do tempo de eclosão

	$Tm_{\text{♂}} \times Tm_{\text{♀}}$	$Tp_{\text{♂}} \times Tp_{\text{♀}}$	$Tm_{\text{♂}} \times Tp_{\text{♀}}$	$Tp_{\text{♂}} \times Tm_{\text{♀}}$
	18,1 ± 0,3	17,2 ± 0,4	16,6 ± 0,5	19,9 ± 0,4
$Tm_{\text{♂}} \times Tm_{\text{♀}}$		ns	ns	ns
$Tp_{\text{♂}} \times Tp_{\text{♀}}$			S	S
$Tm_{\text{♂}} \times Tp_{\text{♀}}$				ns
$Tp_{\text{♂}} \times Tm_{\text{♀}}$				

ns- diferença não significativa, $p > 0,05$

S - diferença significativa, $p < 0,05$.

Teste estatístico: ANOVA

C - Sucesso - porcentagem de ovos eclodidos

	$Tm_{\text{♂}} \times Tm_{\text{♀}}$	$Tp_{\text{♂}} \times Tp_{\text{♀}}$	$Tm_{\text{♂}} \times Tp_{\text{♀}}$	$Tp_{\text{♂}} \times Tm_{\text{♀}}$
	96	89	72	90
$Tm_{\text{♂}} \times Tm_{\text{♀}}$		ns	S	ns
$Tp_{\text{♂}} \times Tp_{\text{♀}}$			ns	ns
$Tm_{\text{♂}} \times Tp_{\text{♀}}$				ns
$Tp_{\text{♂}} \times Tm_{\text{♀}}$				

ns- diferença não significativa, $p > 0,05$

S - diferença significativa, $p < 0,05$.

Teste estatístico: Kruskal-Wallis

Foi observada a presença de espermateca nos frascos dos casais montados para a constatação da ocorrência de acasalamento entre os híbridos e deles com as espécies parentais (retrocruzamento). Esse fato demonstra que houve cruzamento, entretanto, os ovos postos eram inférteis.

4.2 – MORFOLOGIA

Os caracteres analisados e o número de indivíduos que apresentaram cada condição por grupo estão descritos na tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Tabela demonstrando os caracteres observados na análise morfológica e suas condições.

caracter	estado do caracter	TM	TP	Tm♂ x Tp♀	Tp♂ x Tm♀
cabeça	mancha laranja	30	0	28	30
	Inteiramente preta	0	30	2	0
	muito alta posteriormente	12	5	13	14
	menos alta posteriormente	18	25	17	16
olhos	grandes	30	28	30	30
	menores	0	2	0	0
manchas na pleura	metapleura	0	0	21	20
	mesopleura	0	0	4	0
	propleura	0	14	4	0
	mesopleura e propleura	30	0	22	30
	ausente	0	16	0	0
rostro	3° segmento com muitos pêlos longos	30	0	30	30
	3° segmento com muitos pêlos menores	0	30	0	0
pronoto	presença de tubérculo discal	30	30	30	30
	presença de tubérculo lateral	30	30	30	30
	presença de tubérculo sub-lateral	30	24	30	30
	manchas 3+3	30	1	20	23
	manchas 2+2	0	29	9	7
ângulo ântero-lateral	com presença de curva	30	0	11	22
	sem presença de curva	0	30	19	8

TM – *T. maculata*; **TP** – *T. pseudomaculata*; - Híbrido do cruzamento *T. maculata* macho x *T. pseudomaculata* fêmea; **Tp♂ x Tm♀** - Híbrido do cruzamento *T. pseudomaculata* macho x *T. maculata* fêmea. Foram analisados um total de 30 indivíduos em cada grupo.

A coloração da cabeça, o tamanho dos pêlos do 3º segmento do rostro e a forma do ângulo ântero-lateral foram características espécie específicas, sendo que entre os exemplares de híbridos analisados foram observadas as duas condições, exceto para o tamanho dos pêlos do 3º do rostro, que todos se

apresentaram com pêlos longos, assim como *T. maculata*. A figura 4.1 mostra *T. maculata*, *T. pseudomaculata* e híbridos produzidos pelo cruzamento entre as duas espécies.



T. maculata



T. pseudomaculata



Híbrido fêmea do cruzamento
entre *T. maculata* macho e
T. pseudomaculata fêmea



Híbrido fêmea do cruzamento
entre *T. pseudomaculata* macho
e *T. maculata* fêmea

Figura 4.1 - *T. maculata*, *T. pseudomaculata* e híbrido produzidos pelo cruzamento entre as duas espécies.

O fenograma obtido a partir dos caracteres morfológicos observados (figura 4.2) mostra claramente a formação de dois grupos principais. O primeiro representado por todos os indivíduos da espécie *T. pseudomaculata*, e o segundo grupo formado por *T. maculata* e todos os híbridos. Mostrando que considerando os caracteres morfológicos, os híbridos do cruzamento de *T. maculata* com *T. pseudomaculata* estão mais próximos de *T. maculata*.

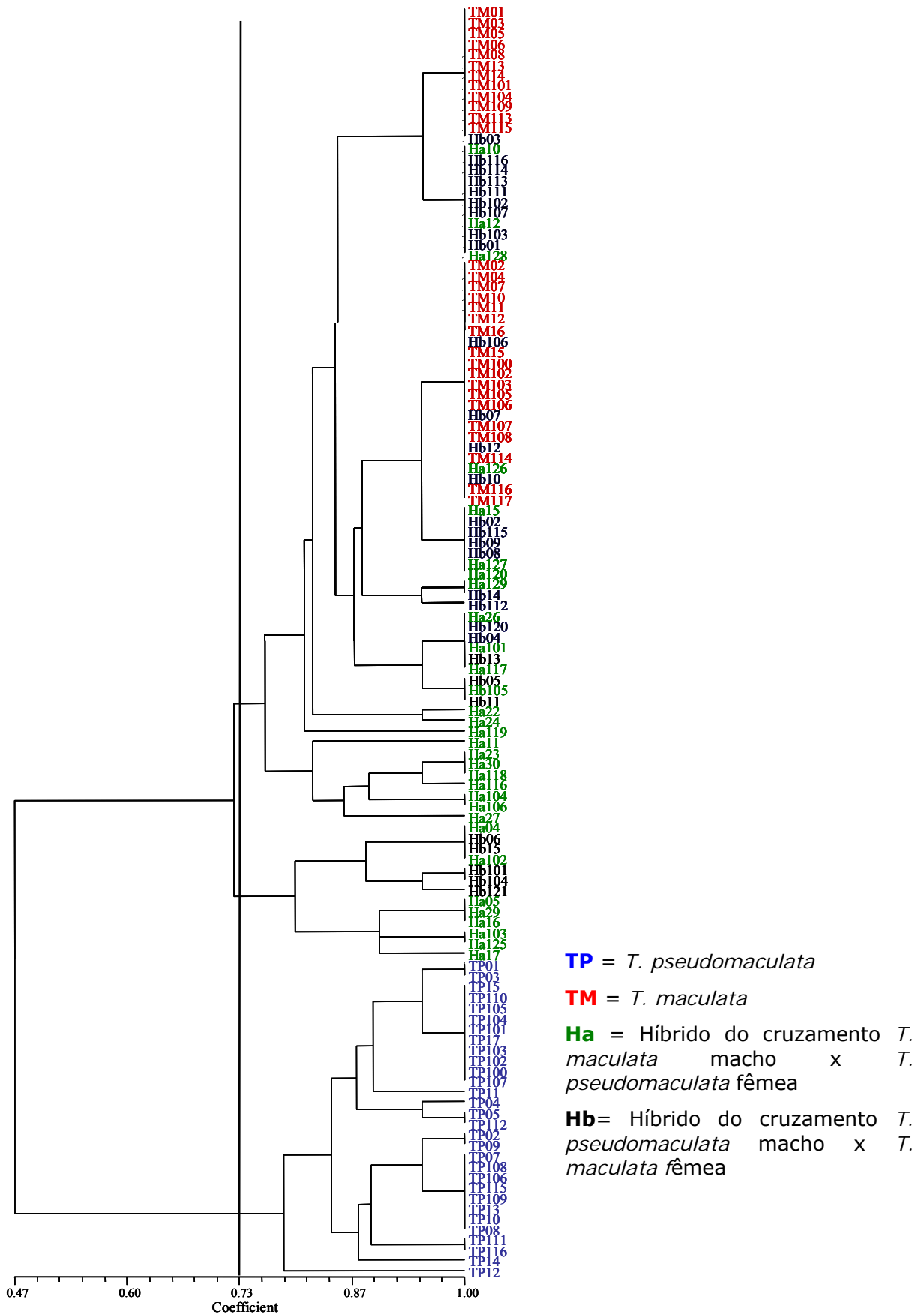


Figura 4.2 – Fenograma construído a partir da matriz de presença e ausência de caracteres obtidos pela análise morfológica utilizando o coeficiente de associação de Dice e UPGMA. A linha vertical representa a linha de fenon.

4.3 - MORFOMETRIA GEOMÉTRICA

A análise do tamanho centróide (figura 4.3) não discrimina as três espécies. A análise estatística realizada demonstra que as asas dos híbridos são significativamente maiores que as dos parentais ($P < 0,005$, baseado no teste de ANOVA).

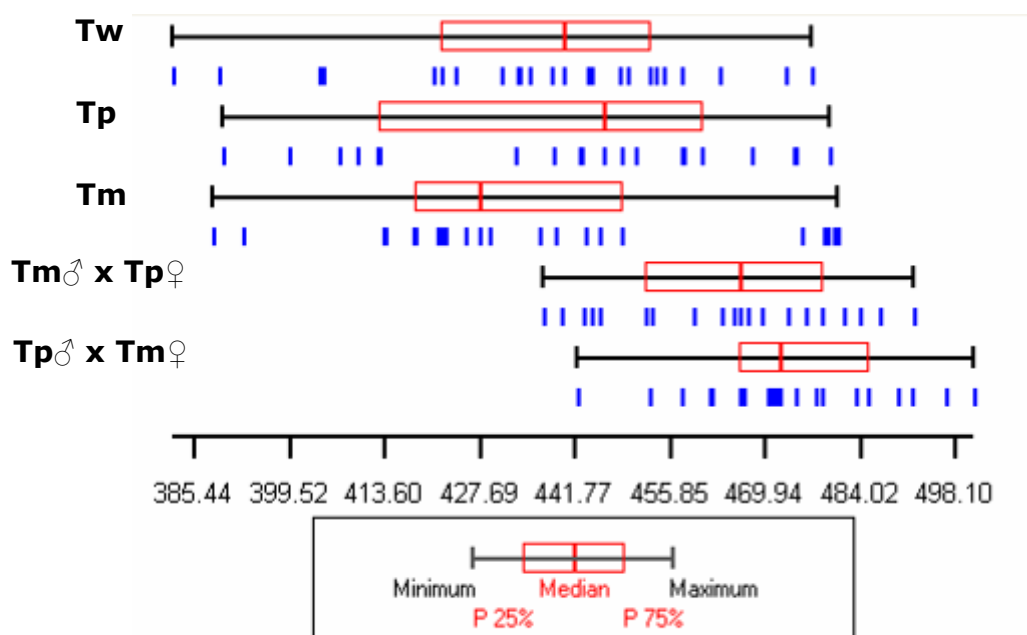


Figura 4.3 – Variação do tamanho centróide entre os grupos: **Tw** – *T. wygodzinskyi*; **Tp** – *T. pseudomaculata*; **Tm** – *T. maculata*; **Tm♂ x Tp♀** - híbridos do cruzamento entre *T. maculata* macho e *T. pseudomaculata* fêmea; **Tp♂ x Tm♀** - híbridos do cruzamento entre *T. pseudomaculata* macho e *T. maculata* fêmea. Cada traço azul representa uma asa.

A regressão múltipla de variáveis de conformação e tamanho isométrico revelou resíduo alométrico significativo nas variáveis de conformação ($P < 0,005$). Através do teste multivariado de significância do resíduo alométrico pôde-se verificar que a sua contribuição não é igual nos diferentes grupos ($P = 0,007$), não podendo ser aceita a premissa de "Common Slope", onde todos os grupos sofrem a mesma influência da alometria. A árvore UPGMA para relação entre os grupos foi obtida somente das distâncias Euclidianas das variáveis de conformação.

A árvore de UPGMA das distâncias Euclidianas das variáveis de conformação discrimina os dois grupos híbridos, porém, eles são os mais próximos, e a espécie mais semelhante é *T. pseudomaculata*. O grupo formado por *T. wygodzinskyi* foi o mais distante dos demais (figura 4.4).

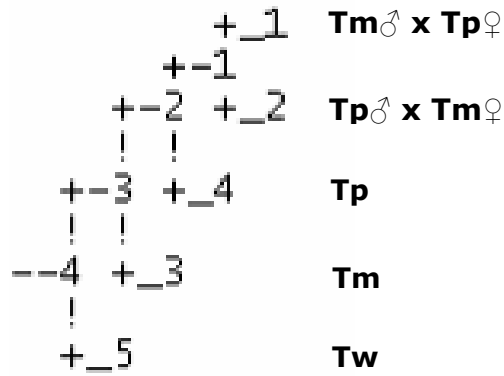


Figura 4.4 - Árvore UPGMA de distâncias Euclidianas de variáveis de conformação derivadas da análise de componentes principais comuns. (**1** e **Tm♂ x Tp♀**- híbridos do cruzamento entre *T. maculata* macho e *T. pseudomaculata* fêmea; **2** e **Tp♂ x Tm♀**- híbridos do cruzamento entre *T. pseudomaculata* macho e *T. maculata* fêmea; **3** e **Tm** - *T. maculata*; **4** e **Tp** - *T. pseudomaculata*, **5** e **Tw** - *T. wygodzinskyi*).

A primeira variável canônica (CV1) derivada da análise discriminante das variáveis de conformação contribuiu com 69% da variação total e separou claramente *T. wygodzinskyi* dos demais grupos. A segunda variável canônica (CV2) contribuiu com 24% da variação total, separando as duas espécies. Os dois grupos de híbridos apresentam conformação semelhante entre si e intermediária às dos parentais (figura 4.5).

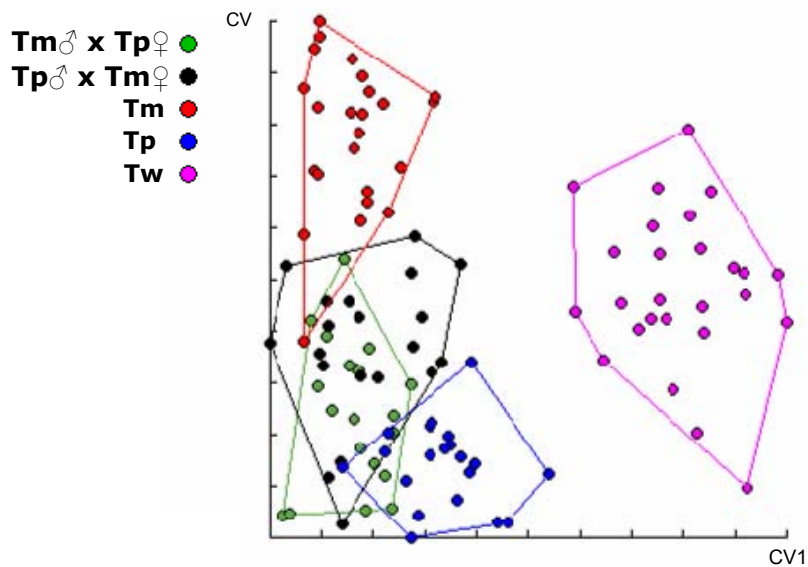


Figura 4.5 – Mapa fatorial mostrando variação de conformação de *T. wygodzinskyi*, *T. maculata*, *T. pseudomaculata* e da prole entre as duas últimas espécies. CV1 e CV2 são o primeiro e o segundo fator canônico derivados da análise discriminante da variação total de conformação. **Tp** – *T. pseudomaculata*; **Tm** – *T. maculata*; **Tw** - *T. wygodzinskyi*; **Tm♂ x Tp♀** - híbridos do cruzamento entre *T. maculata* macho e *T. pseudomaculata* fêmea; **Tp♂ x Tm♀** - híbridos do cruzamento entre *T. pseudomaculata* macho e *T. maculata* fêmea.

Uma análise de regressão entre CV1 e tamanho isométrico mostrou que o tamanho não interfere nas variáveis de conformação ($P= 0,078$), sendo, portanto, uma discriminação livre de alometria.

A árvore UPGMA obtida a partir das distâncias de Mahalanobis de variáveis de conformação derivadas da análise discriminante (figura 4.6), assim como a árvore UPGMA das distâncias Euclidianas (figura 4.4), discrimina todos os grupos e coloca os híbridos mais próximos à *T. pseudomaculata*. *T. wygodzinskyi* se apresentou novamente como a espécie mais diferenciada. A permutação múltipla das distâncias de Mahalanobis demonstrou que as distâncias entre todos os grupos são significativas ($P<0,005$).

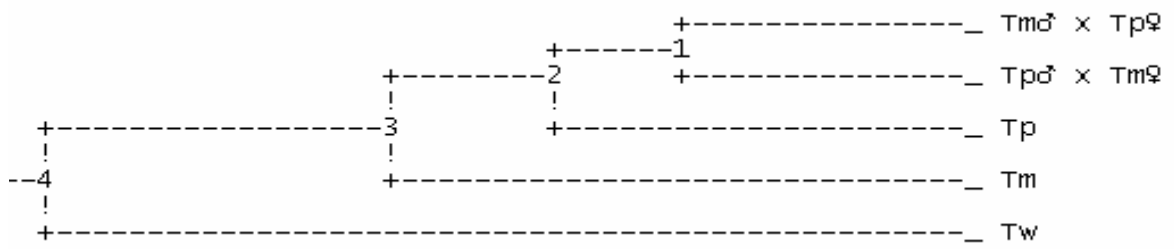


Figura 4.6 - Árvore UPGMA obtida a partir das distâncias de Mahalanobis de variáveis de conformação derivadas da análise discriminante. **1** e $Tm^{\sigma} \times Tp^{\rho}$ - híbridos do cruzamento entre *T. maculata* macho e *T. pseudomaculata* fêmea; **2** e $Tp^{\sigma} \times Tm^{\rho}$ - híbridos do cruzamento entre *T. pseudomaculata* macho e *T. maculata* fêmea; **3** e Tm - *T. maculata*; **4** e Tp - *T. pseudomaculata*; **5** e Tw - *T. wygodzinskyi*.

4.4 – POLIMORFISMO DE DNA AMPLIFICADO ALEATORIAMENTE (RAPD)

A análise dos perfis de RAPD para verificação da ocorrência da variabilidade genética intragrupos mostrou que os grupos são muito homogêneos e que não há diferenciação entre os sexos. As figuras 4.6 A-D mostram exemplos de perfis de RAPD de *T. maculata*, *T. pseudomaculata* e de seus híbridos dos diferentes sexos.

O controle negativo, sem adição de DNA, das reações mostrou-se sem a presença de bandas (figura 4.7).

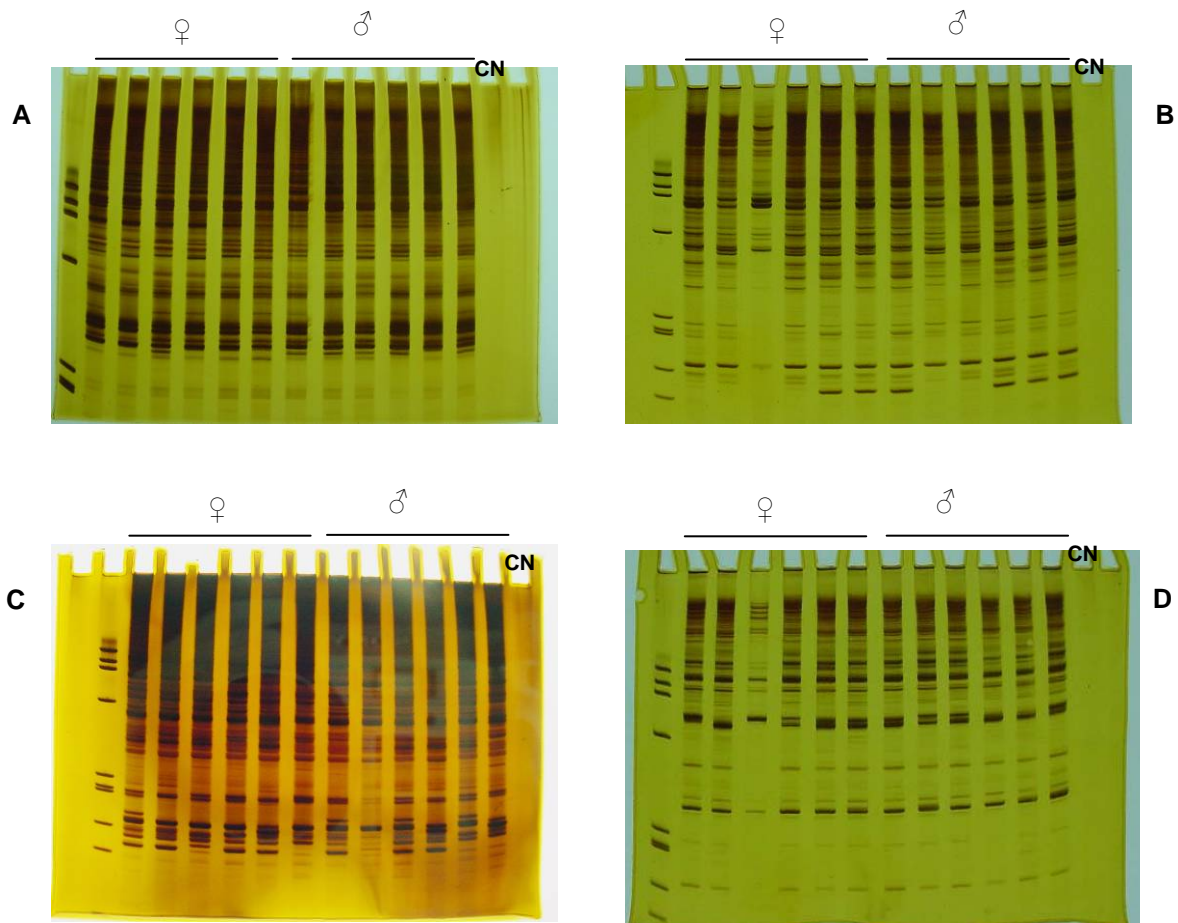


Figura 4.7 – Perfis de RAPDs visualizados em géis de poliacrilamida 8% corado por prata. **A** – amostras de híbridos do cruzamento entre *T. pseudomaculata* macho e *T. maculata* fêmea amplificados com o iniciador 3302; **B** - amostras de híbridos do cruzamento entre *T. maculata* macho e *T. pseudomaculata* fêmea amplificados com o iniciador 3303; **C** – amostras de *T. pseudomaculata* amplificadas com o iniciador 3304; **D** - amostras de *T. maculata* amplificadas com o iniciador 3307. O controle negativo foi aplicado na última canaleta de cada gel.

Para a análise da variabilidade dos perfis de RAPD entre os grupos utilizamos géis de 45 canaletas. Para a obtenção dos dados da matriz de similaridade foram consideradas 110 bandas, geradas pelos quatro iniciadores com tamanhos que variam entre 200 e 880 pares de bases.

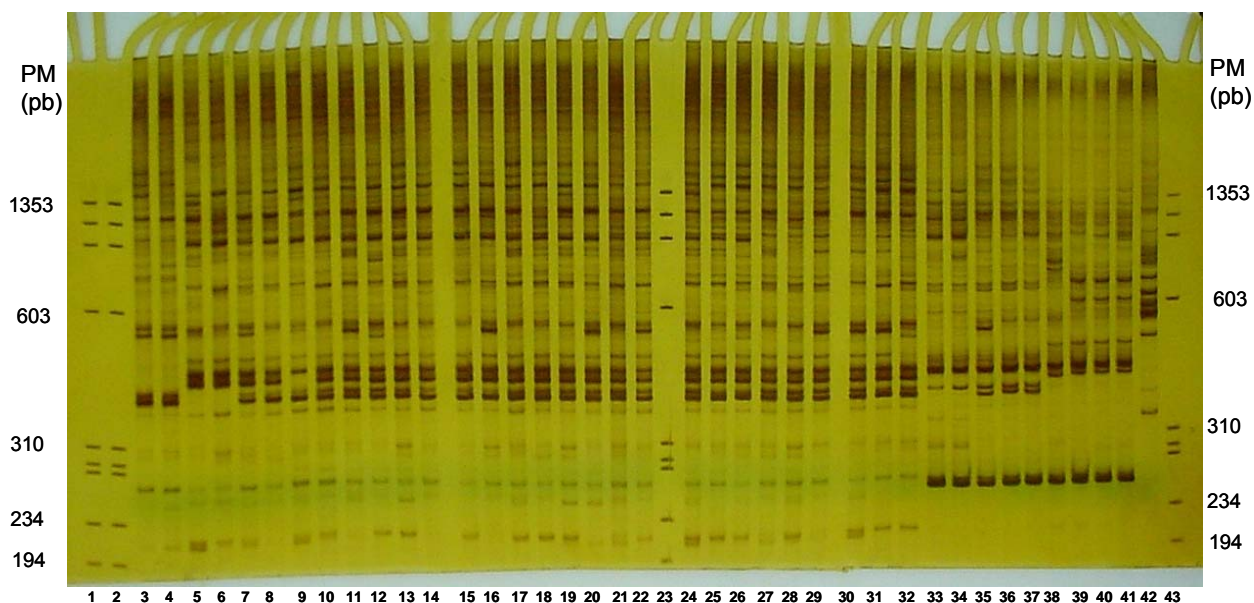


Figura 4.8 – Perfis de RAPD gerados pelo iniciador 3302 visualizados em gel de poliacrilamida 6%, corado pela prata. Canaletas **1** e **2**: padrão de peso molecular (PM); **3**: *T. maculata* macho (TmM); **4**: *T. maculata* fêmea (TmF); **5**: *T. pseudomaculata* macho (TpM); **6**: *T. pseudomaculata* fêmea (TpF); **7**: mistura das amostras amplificadas de *T. maculata* e *T. pseudomaculata*; **8-13**: híbridos fêmeas do cruzamento entre TmM e TpF; **14-19**: híbridos machos do cruzamento entre TmM e TpF; **20 - 22**: híbridos fêmeas do cruzamento entre TpM e TmF; **23**: PM; **24 - 26**: híbridos fêmeas do cruzamento entre TpM e TmF; **27 - 32**: híbridos machos do cruzamento entre TpM e TmF; **33**: *T. wygodzinskyi* macho (TwM); **34**: *T. wygodzinskyi* fêmea (TwF); **35**: híbrido do cruzamento entre TwM e TmF; **36 e 37**: híbridos do cruzamento entre TmM e TwF; **38 e 39**: híbridos do cruzamento entre TwM e TpF; **40 e 41**: híbridos do cruzamento entre TpM e TwF; **42**: *R. prolixus*; **43**: PM. Os valores à direita do gel indicam o número de pares de bases (pb) do padrão de peso molecular (PM).

O fenograma obtido a partir da análise de bandas (figura 4.9) mostra a formação de dois grupos principais. Um formado por *T. maculata*, *T. pseudomaculata* e os seus híbridos, outro por *T. wygodzinskyi* e os seus híbridos com *T. pseudomaculata* e *T. maculata*. Como esperado, *R. prolixus* se constitui um perfil extremo de referência.

O fenograma obtido a partir do coeficiente de associação de Dice da análise de RAPDs (figura 4.9) mostra os híbridos de *T. pseudomaculata* e *T.*

maculata mais próximos a *T. pseudomaculata* e *T. maculata* distante deste grupo. Não há distinção de agrupamento entre híbridos do cruzamento entre *T. maculata* macho e *T. pseudomaculata* fêmea e híbridos do cruzamento entre *T. pseudomaculata* macho e *T. maculata* fêmea. *T. wygodzinskyi* é a espécie mais distante das outras duas. Os híbridos de *T. wygodzinskyi* com *T. pseudomaculata* e *T. maculata* formam subgrupos distintos, de acordo com a espécie que *T. wygodzinskyi* foi cruzada.

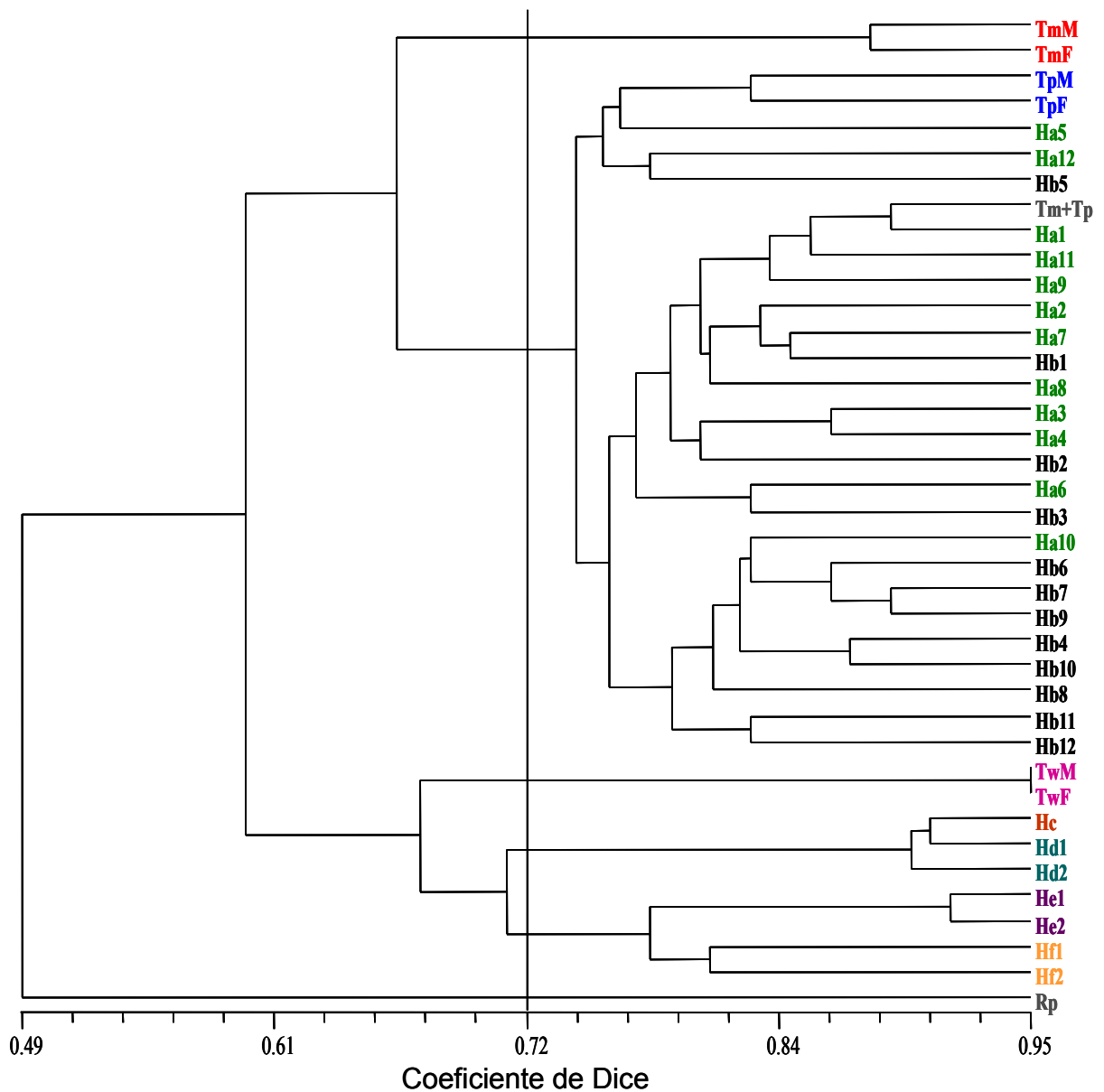


Figura 4.9 – Fenograma construído a partir da matriz de presença e ausência de caracteres obtidos pela análise de RAPDs utilizando o coeficiente de associação de Dice e UPGMA. A linha vertical representa a linha de fenon; **TmM** – *T. maculata* macho; **TmF** – *T. maculata* fêmea; **TpM** – *T. pseudomaculata* macho; **TpF** – *T. pseudomaculata* fêmea; **Ha** - híbridos do cruzamento entre *T. maculata* macho e *T. pseudomaculata* fêmea; **Hb** - híbridos do cruzamento entre *T. pseudomaculata* macho e *T. maculata* fêmea; **TwM** - *T. wygodzinskyi* macho; **Tw** - *T. wygodzinskyi* fêmea; **Hc** - híbrido do cruzamento entre *T. wygodzinskyi* macho e *T. maculata* fêmea; **Hd** - híbridos do cruzamento entre *T. maculata* macho e *T. wygodzinskyi* fêmea; **He** - híbridos do cruzamento entre *T. pseudomaculata* macho e *T. wygodzinskyi* fêmea; **Hf** - híbridos do cruzamento entre *T. wygodzinskyi* macho e *T. pseudomaculata* fêmea; **Rp** – *R. prolixus*.

A árvore obtida com a distância genética de Nei (1972) (figura 4.10) confirma as informações obtidas com a árvore do coeficiente de similaridade de Dice. No caso da árvore com a distância genética de Nei houve uma distinção no agrupamento dos híbridos dos cruzamentos entre *T. pseudomaculata* e *T. maculata* de acordo com o sentido do cruzamento. Novamente, como esperado, *R. prolixus* se constitui um perfil extremo de referência. As distâncias genéticas exatas e o índice de identidade estão apresentados na tabela 4.3

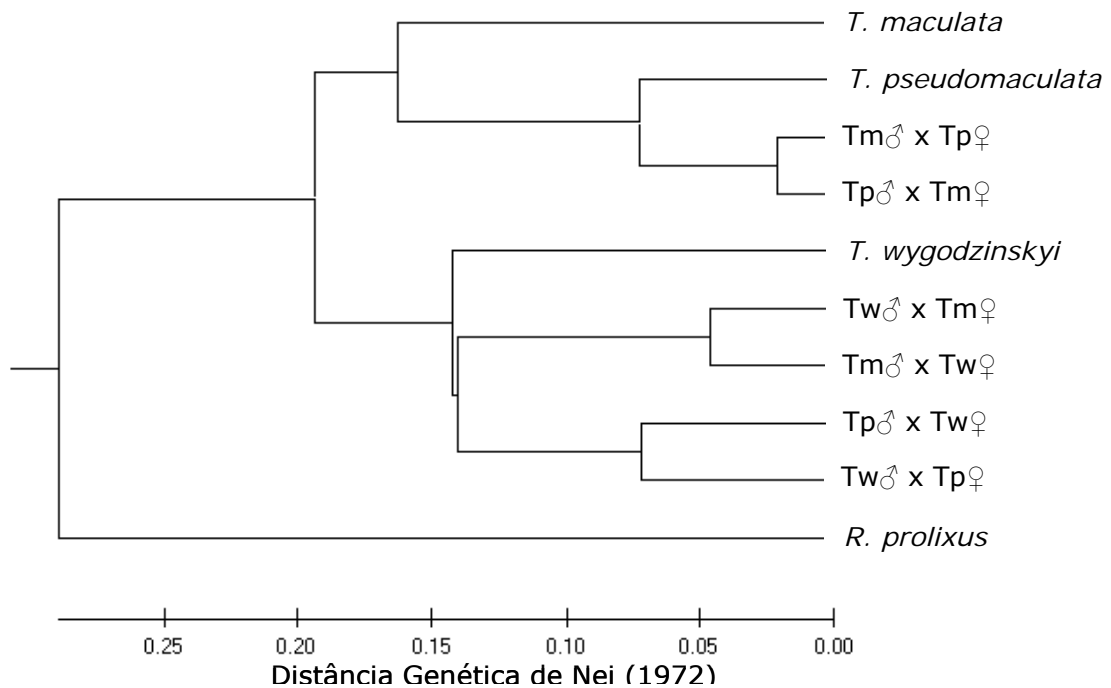


Figura 4.10 - Árvore UPGMA considerando a distância genética de Nei (1972). $Tm^{\sigma} \times Tp^{\rho}$ - híbridos do cruzamento entre *T. maculata* macho e *T. pseudomaculata* fêmea; $Tp^{\sigma} \times Tm^{\rho}$ - híbridos do cruzamento entre *T. pseudomaculata* macho e *T. maculata* fêmea; $Tw^{\sigma} \times Tm^{\rho}$ - híbridos do cruzamento entre *T. wygodzinskyi* macho e *T. maculata* fêmea; $Tm^{\sigma} \times Tw^{\rho}$ - híbridos do cruzamento entre *T. maculata* macho e *T. wygodzinskyi* fêmea; $Tp^{\sigma} \times Tw^{\rho}$ - híbridos do cruzamento entre *T. pseudomaculata* macho e *T. wygodzinskyi* fêmea; $Tw^{\sigma} \times Tp^{\rho}$ - híbridos do cruzamento entre *T. wygodzinskyi* macho e *T. pseudomaculata* fêmea.

Tabela 4.3 – Medidas originais de Nei (1972) de identidade genética (acima da diagonal) e distância genética (abaixo da diagonal).

	Tm	Tp	$\frac{Tm \text{♂} \times Tp \text{♀}}{Tp \text{♀}}$	$\frac{Tp \text{♂} \times Tm \text{♀}}{Tm \text{♀}}$	Tw	$\frac{Tw \text{♂} \times Tm \text{♀}}{Tm \text{♀}}$	$\frac{Tm \text{♂} \times Tw \text{♀}}{Tw \text{♀}}$	$\frac{Tp \text{♂} \times Tw \text{♀}}{Tw \text{♀}}$	$\frac{Tw \text{♂} \times Tp \text{♀}}{Tp \text{♀}}$	Rp
Tm	***	0.6498	0.7657	0.7571	0.5364	0.6443	0.6039	0.6229	0.5950	0.5550
Tp	0.4310	***	0.8801	0.8522	0.6572	0.6938	0.6838	0.6554	0.6566	0.4979
Tm♂ x Tp♀	0.2670	0.1277	***	0.9594	0.6781	0.7628	0.7828	0.6929	0.7192	0.5879
Tp♂ x Tm♀	0.2783	0.1599	0.0415	***	0.6717	0.7819	0.7775	0.7045	0.7168	0.5878
Tw	0.6228	0.4198	0.3885	0.3980	***	0.7423	0.7623	0.7486	0.7562	0.5204
Tw♂ x Tm♀	0.4395	0.3656	0.2708	0.2460	0.2980	***	0.9116	0.7574	0.7955	0.5909
Tm♂ x Tw♀	0.5044	0.3800	0.2449	0.2517	0.2715	0.0926	***	0.7106	0.7635	0.5733
Tp♂ x Tw♀	0.4734	0.4225	0.3668	0.3502	0.2895	0.2778	0.3416	***	0.8670	0.5621
Tw♂ x Tp♀	0.5191	0.4207	0.3296	0.3330	0.2794	0.2288	0.2699	0.1427	***	0.5853
Rp	0.5888	0.6973	0.5312	0.5313	0.6531	0.5261	0.5563	0.5761	0.5356	***

Tm – T. maculata; **Tp** – T. pseudomaculata; **Tm♂ x Tp♀** – híbridos do cruzamento entre T. maculata macho e T. pseudomaculata fêmea; **Tp♂ x Tm♀** – híbridos do cruzamento entre T. pseudomaculata macho e T. maculata fêmea; **Tw** – T. wygodzinskiyi; **Tw♂ x Tm♀** – híbridos do cruzamento entre T. wygodzinskiyi macho e T. maculata fêmea; **Tm♂ x Tw♀** – híbridos do cruzamento entre T. maculata macho e T. wygodzinskiyi fêmea; **Tp♂ x Tw♀** – híbridos do cruzamento entre T. pseudomaculata macho e T. wygodzinskiyi fêmea; **Tw♂ x Tp♀** – híbridos do cruzamento entre T. wygodzinskiyi macho e T. pseudomaculata fêmea; **Rp** – R. prolixus.

As identidades genéticas variaram de 0,498 (entre *T. pseudomaculata* e *R. prolixus*) a 0,959 (entre os dois grupos de híbridos do cruzamento entre *T. maculata* e *T. pseudomaculata*).

A maior distância genética observada foi entre *T. maculata* e *T. wygodzinskyi* (0,623), seguida das relacionadas com o grupo externo (0,526 – 0,6973); a menor foi entre os dois grupos de híbridos do cruzamento entre *T. maculata* e *T. pseudomaculata* (0,042).

4.5 - ISOENZIMAS

Das isoenzimas estudadas, quatro foram polimórficas (GPI, MDH, α GPD e PGM) e três foram monomórficas (PEP-2, ICD e 6PGD). GPI, MDH, α GPD apresentaram perfil de enzimas diméricas e a PGM monomérica (tabela 4.4; figura 4.11). A prole dos cruzamentos interespecíficos apresentou perfil híbrido nas enzimas polimórficas (figura 4.11 e 4.12).

Nenhuma das duas espécies apresentou variabilidade intraespecífica (tabela 4.4).

Tabela 4.4 – Frequências dos perfis isoenzimáticos encontradas entre indivíduos das espécies *T. maculata* (n=12), *T. pseudomaculata* (n=12) e seus híbridos (n=24).

Enzima	Grupos		
	<i>T. maculata</i>	<i>T. pseudomaculata</i>	Híbridos
PEP-2	A (100%)	A (100%)	A (100%)
ICD	A (100%)	A (100%)	A (100%)
6PGD	A (100%)	A (100%)	A (100%)
GPI	A (100%)	B (100%)	AB (100%)
MDH	A (100%)	B (100%)	AB (100%)
α GPD	A (100%)	B (100%)	AB (100%)
PGM	A (100%)	B (100%)	AB (100%)

A, B e AB= perfis enzimáticos

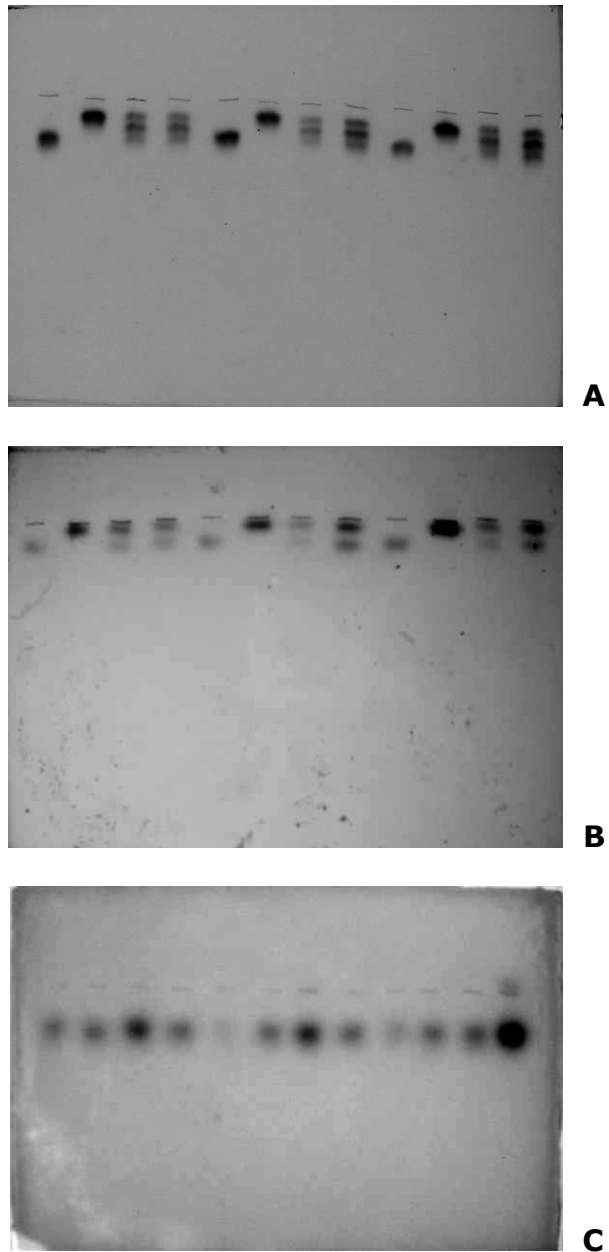


Figura 4.11 – Géis de isoenzimas. **A**- GPI; **B** – PGM, **C**- PEP-2. Canaletas: **1^a** – *T. maculata* fêmea do casal 1; **2^a** – *T. pseudomaculata* macho do casal 1; **3^a** e **4^a** – F1 fêmea e macho, respectivamente, do casal 1; **5^a** – *T. maculata* fêmea do casal 2; **6^a** – *T. pseudomaculata* macho do casal 2; **7^a** e **8^a** – F1 fêmea e macho, respectivamente, do casal 2; **9^a** – *T. maculata* fêmea do casal 3; **10^a** – *T. pseudomaculata* macho do casal 3; **11^a** e **12^a** – F1 fêmea e macho, respectivamente, do casal 3.

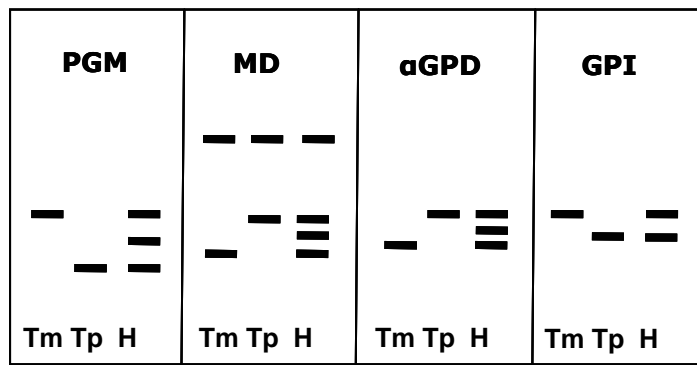


Figura 4.12 – Perfis esquemáticos das enzimas diméricas (GPI, MDH e α GPD) e monoméricas (PGM) estudadas. **Tm** - *T. maculata*; **Tp** - *T. pseudomaculata*; **H** - híbrido do cruzamento entre *T. maculata* e *T. pseudomaculata*.

5 – DISCUSSÃO

Desde a descrição de *T. pseudomaculata*, esta espécie vem sendo considerada oriunda de *T. maculata* devido à grande semelhança morfológica entre elas. Entretanto, nossos estudos indicam que essas espécies são muito distantes geneticamente, conforme proposto por Santos et al. (2001) e confirmado por Hypsa et al. (2003).

A literatura dispõe de algumas informações sobre a biologia de *T. maculata* e *T. pseudomaculata*. Espínola et al. (1981) realizaram cruzamentos de *T. maculata* com a temperatura variando de 26,3°C a 32, 2 °C, umidade relativa média de 60,4% e alimentação com galinha. O número de ovos postos variou de um a 17 ovos por dia, sendo três ovos a média de oviposição mais freqüente; 8,1% dos ovos foram inférteis. Para esta espécie, a média de ovos postos diariamente observada em nosso experimento foi de 12,6 e a porcentagem de ovos inférteis foi 4% apenas. Feliciangeli & Rabinovich (1985) observaram uma média de 19,1 dias de incubação dos ovos de *T. maculata*, resultado similar ao obtido no presente estudo, onde a média foi de 18,1 dias. Silva et al. (1995) estudando a influência da temperatura no desenvolvimento de *T. maculata* compararam as temperaturas de 25°C e 30°C, e verificaram diferença no período de incubação dos ovos, 29 e 16 dias respectivamente, sendo os insetos alimentados em galinha. Moura et al. (2005) também demonstram que quanto maior a temperatura, menor o tempo de incubação. Com a temperatura variando de 21,5 a 32 °C com média de 27,6°C e alimentação semanal em camundongos, os autores observaram uma variação de 14 a 42 dias de incubação dos ovos, apresentando esses dados uma correlação estatisticamente significativa (-0,98).

Estudo anterior sobre a biologia de *T. pseudomaculata* demonstrou que o período de incubação médio para esta espécie é de 18 dias, com temperatura de 28±1°C e 80% de umidade relativa, com alimentação semanal em pombo (Gonçalves et al., 1997). Estes resultados foram semelhantes no presente experimento, mantido a temperatura de 27 ± 1°C com umidade relativa de 65 ± 5%, pois observamos a média do tempo de eclosão 17,2 dias.

Além das condições de manutenção, as diferenças acima apontadas sobre a biologia de *T. maculata* e *T. pseudomaculata* podem ser devidas à variação genética entre as populações utilizadas e ao tempo em que a colônia foi mantida em laboratório (Gonçalves et al., 1997).

Na ocasião da descrição de *T. pseudomaculata*, Espínola realizou cruzamentos entre *T. maculata* e *T. pseudomaculata* e verificou inviabilidade dos

ovos principalmente quando o cruzamento era no sentido *T. pseudomaculata* macho e *T. maculata* fêmea (Corrêa & Espínola, 1964). No presente trabalho, a eclosão dos ovos não foi estatisticamente diferente entre os dois sentidos do cruzamento, 72% dos ovos postos pela fêmea de *T. pseudomaculata* no cruzamento com *T. maculata* eclodiram, e 90% dos ovos ovipostos pela fêmea de *T. maculata* quando acasalada com *T. pseudomaculata* obtiveram sucesso. Esse fato demonstra que neste experimento o sentido do cruzamento não interferiu no desenvolvimento dos embriões. Foi observada diminuição significativa na porcentagem de ovos eclodidos do cruzamento entre *T. maculata* macho e *T. pseudomaculata* fêmea (72%) em relação ao cruzamento controle de *T. maculata* (96%). Entretanto, deve ser observado que neste cruzamento interespecífico houve um casal cujos ovos não eclodiram, este fato pode ocorrer também em cruzamentos intraespecíficos provavelmente devido a infertilidade do macho ou da fêmea. O cruzamento interespecífico com *T. maculata* fêmea apresentou piores resultados em relação ao cruzamento controle com *T. pseudomaculata*; quando o macho foi *T. maculata* no cruzamento interespecífico, os ovos tiveram um menor tempo de desenvolvimento daqueles do cruzamento entre *T. pseudomaculata*. Essas diferenças não mostram influência da espécie da fêmea ou do macho sobre os cruzamentos interespecíficos.

Segundo o conceito de espécie proposto por (Dobzhansky, 1937): “uma espécie é um grupo de indivíduos completamente férteis entre si, mas isolados reprodutivamente de outros grupos semelhantes por suas propriedades fisiológicas (produzindo qualquer incompatibilidade de pais, ou esterilidade dos híbridos, ou ambos)”. Considerando este conceito, a infertilidade dos híbridos, verificada pela inviabilidade dos ovos dos cruzamentos entre os híbridos e nos retrocruzamentos, confirma o status taxonômico de *T. maculata* e *T. pseudomaculata*.

A análise morfológica da prole do cruzamento entre *T. maculata* e *T. pseudomaculata* e das espécies parentais demonstrou que os híbridos apresentam características das duas espécies. Apesar desse fato, o fenograma obtido a partir da análise morfológica demonstra que a prole dos cruzamentos é muito semelhante morfológicamente a *T. maculata*. A dominância dos caracteres morfológicos e cromáticos de *T. sordida*, *T. infestans* e *T. brasiliensis* sobre os de *T. pseudomaculata* em híbridos entre essas espécies, já foi observado por Galvão (1978). A facilidade para estas espécies intercruzarem, embora não produzindo

híbridos férteis, pode ser explicada pelo fato de serem alopátricas. Por não coexistirem, não houve a seleção de características (morfológicas ou comportamentais) que levasse ao isolamento reprodutivo entre *T. pseudomaculata* e *T. maculata*. Além desse fato, é sabido que várias espécies de triatomíneos, semelhantes morfológicamente ou não, próximas geneticamente ou não, produzem híbridos naturalmente e/ou experimentalmente.

Através da análise morfométrica comparamos a conformação e o tamanho de *T. wygodzinskyi*, *T. maculata* e *T. pseudomaculata*, e estas duas últimas espécies com os híbridos do cruzamento entre elas. A análise estatística do tamanho centróide mostrou que as três espécies estudadas apresentam tamanhos semelhantes, apesar de que este estimador isométrico tenha potencial para diferenciar espécies. O tamanho centróide dos híbridos foi significativamente maior que os dos parentais, sugerindo heterose. Este fenômeno é resultado da divergência genética dos parentais, ou seja, quanto mais distantes geneticamente são os pais, maior será o tamanho dos indivíduos da prole (Dujardin & Slice, 2006); dessa forma, *T. maculata* e *T. pseudomaculata* seriam espécies bastante diferenciadas. Comparativamente, híbridos do cruzamento entre *T. infestans* e *T. rubrovaria* também apresentaram maior tamanho em relação aos parentais (Franca-Rodríguez et al., 1979).

A análise de regressão entre as variáveis de conformação e de tamanho isométrico revelou que o resíduo alométrico não é o mesmo para as diferentes espécies e para os grupos de híbridos estudados. Esta variação indica que estruturas homólogas sofreram diferentes processos de evolução e adaptação que levaram à divergência entre elas (Jaramillo & Dujardin, 2006).

O primeiro fator canônico da análise discriminante das variáveis de conformação é responsável pela maior parte da variabilidade total das amostras. Neste trabalho, esse fator representou 69% da variação total e separou claramente *T. wygodzinskyi* de *T. maculata* e *T. pseudomaculata*, e agrupou as duas últimas espécies, que foram diferenciadas apenas pelo segundo fator canônico, responsável por 24% da variabilidade total. A análise discriminante indica, portanto, que *T. wygodzinskyi* está muito mais distante geneticamente de *T. maculata* e *T. pseudomaculata* do que estas duas últimas, que foram diferenciadas por uma menor porcentagem da variabilidade total das amostras.

A árvore UPGMA das distâncias Euclidianas e a árvore UPGMA das distâncias de Mahalanobis das variáveis de conformação diferenciaram todos os

grupos, as espécies e os híbridos do cruzamento entre *T. maculata* macho e *T. pseudomaculata* fêmea do grupo formado pelos híbridos do cruzamento entre *T. pseudomaculata* macho e *T. maculata* fêmea. O fato dos dois grupos de híbridos serem diferentes indica que o sentido do cruzamento influencia na genética da prole. Essa diferenciação é bastante robusta principalmente se considerarmos o teste de permutação múltipla das distâncias de Mahalanobis, que é uma das mais robustas medidas de distância para a análise quantitativa (Dias, 1998), e, neste trabalho, indicou que todas as distâncias entre os grupos são significativas.

Assim como nas duas árvores com UPGMA das variáveis de conformação, os fenogramas obtidos pela análise de RAPDs diferenciam todas as espécies e, em contradição à caracterização morfológica, agrupam os híbridos com *T. pseudomaculata*.

De acordo com a distância genética, *T. maculata* está aproximadamente duas vezes mais distante geneticamente de *T. pseudomaculata* e dos híbridos; esse fato provavelmente deve-se à fixação de caracteres desta espécie e indica que *T. pseudomaculata* é a espécie mais antiga no caso de uma relação filogenética entre elas. *T. wygodzinskyi* foi a espécie que apresentou-se mais distante geneticamente das demais. Este último fato, também observado na análise de morfometria geométrica, discorda dos obtidos por Santos (2003) em estudos isoenzimáticos, onde a autora encontrou maior afinidade entre *T. wygodzinskyi* e *T. pseudomaculata*.

O fenograma obtido a partir do coeficiente de associação de Dice da análise de RAPDs, agrupou em um só grupo *T. pseudomaculata* e os híbridos do cruzamento entre *T. maculata* e *T. pseudomaculata*, sem diferenciá-los quanto ao sentido do cruzamento. Já a árvore obtida a partir das distâncias genéticas, diferencia os híbridos dos dois cruzamentos entre estas espécies, o que vai de acordo com a análise morfométrica, que indicou que o sentido do cruzamento influencia na genética da prole.

A linha de fenon da árvore construída a partir do coeficiente de associação de Dice da análise de RAPDs, separa em dois clusters os híbridos dos cruzamentos com *T. wygodzinskyi* de acordo com a espécie cruzada, reforçando que *T. wygodzinskyi* é a espécie mais distante e sugerindo que seja a mais antiga dentre as espécies estudadas.

A identidade genética de Nei (1972) revela a semelhança entre um mesmo locus em dois grupos e está fortemente ligada à hierarquia taxonômica (Thorpe,

1982). Em uma revisão sobre este tema, Thorpe (1982) propôs uma curva empírica para os níveis de divergência sistemática entre grupos, onde 85% das espécies do mesmo gênero apresentam identidade genética menor que 0,35, e populações coespecíficas entre 0,35 e 0,85. Nos dados obtidos, as identidades genéticas calculadas a partir dos RAPDs foram todas maiores que 0,35, demonstrando que os grupos estudados não apresentam grande variabilidade entre eles. Vale ressaltar que as identidades genéticas entre *R. prolixus* (grupo externo) e as demais espécies estiveram acima de 0,35 (0,5 – 0,59), o que não é esperado para espécies de gêneros diferentes. Este fato demonstra que os índices propostos não estão de acordo com o nosso trabalho, ou seja, que a baixa variabilidade observada possa não refletir afinidade entre espécies de triatomíneos, e não represente um bom indicador genético para o grupo.

As distâncias genéticas conhecidas entre espécies diferentes de triatomíneos são obtidas a partir da análise isoenzimática e estão entre 0,504 e 0,341 (Dujardin et al., 2002). No presente trabalho, foram observadas algumas distâncias genéticas maiores do que as propostas por Dujardin et al. (2002), principalmente em relação à distância de *R. prolixus*, utilizado como grupo externo, com os demais grupos (0,697-0,5261). Este fato não surpreende por se tratarem de espécies de gêneros diferentes e, portanto, serem mais diferenciadas geneticamente. A distância genética entre *T. maculata* e *T. wygodzinskyi* também foi bastante alta (0,623), evidenciando a grande divergência entre estas elas, o que também foi observado com a análise morfométrica. Distâncias genéticas inferiores às consideradas por Dujardin et al. (2002) foram encontradas entre os grupos de híbridos dos cruzamentos recíprocos das mesmas espécies (0,042- 0,1427), como era de se esperar. Embora esses resultados sejam coerentes, o cálculo da distância genética de Nei a partir da análise de RAPDs é criticado, pois, por este marcador ser dominante, não indica as frequências gênicas corretas, o que é necessário para verificar se o grupo, ou população, está em equilíbrio de Hardy- Weinberg, premissa para o cálculo de distância genética (Dujardin et al., 2002).

A eletroforese de isoenzimas é uma ferramenta capaz de diferenciar espécies biológicas e vem sendo bastante utilizada para este fim (Dujardin et al. 1987; Harry et al., 1992; Pereira et al., 1996; Noireau et al., 1998; Noireau et al., 2002). Das sete isoenzimas estudadas neste trabalho, quatro foram polimórficas e diagnósticas para *T. maculata* e *T. pseudomaculata* (GPI, MDH, αGPD e PGM), confirmando seus status de espécies. Santos (2003) obteve as

isoenzimas ACON, FDP, FUM, GDH, GOT, IDH, MDH, MPI, PGM e 6PGDH (anexo 4) como diagnósticas para *T. maculata* e *T. pseudomaculata*.

O uso de isoenzimas é também eficiente no estudo de espécies próximas e de hibridização, embora seja criticada por detectar baixo polimorfismo. Para a realização de análises de distância genética e estudos filogenéticos, é necessário que pelo menos um grupo apresente polimorfismo; ou que, na presença de três ou mais grupos, haja semelhanças e diferenças entre os alelos de alguns deles (Dias, 1998). Como em nosso estudo não foi observado polimorfismo intraespecífico, não foi realizado o cálculo de distância genética e análise filogenética. Este dado está de acordo com outros estudos que demonstram baixa variabilidade isoenzimática em Triatominae (Harry et al., 1992; Pereira et al., 1996; Noireau et al., 1998). Santos (2003) utilizou 13 sistemas isoenzimáticos para comparar *T. maculata*, *T. pseudomaculata* e *T. wygodzinskyi*. ACON, ME, PGM e 6PGDH demonstraram polimorfismo para as populações de *T. pseudomaculata* provenientes de Curaça – BA e João Costa – PI. A autora também utilizou uma população proveniente de Sobral – CE que não apresentou polimorfismo para nenhuma isoenzima estudada, assim como a população de *T. pseudomaculata* do presente trabalho. Apenas PGM foi polimórfica para *T. maculata* (Santos, 2003).

O perfil híbrido da prole do cruzamento entre *T. maculata* e *T. pseudomaculata* comprova o sucesso dos cruzamentos entre essas duas espécies.

Neste trabalho, dentre as técnicas utilizadas para a caracterização das espécies e dos híbridos uma é morfológica e as demais, a morfometria geométrica e a RAPD-PCR, revelam variabilidade genética. Nos resultados obtidos com a caracterização de *T. maculata*, *T. pseudomaculata* e dos híbridos entre essas duas espécies, houve a concordância entre as técnicas genéticas em oposição à caracterização morfológica. A análise morfológica demonstrou dois grupos, um formado por *T. pseudomaculata* e outro por *T. maculata* e todos os híbridos, já as análises de morfometria geométrica e de RAPDs, agruparam os híbridos com *T. pseudomaculata*. Esta contradição leva-nos a supor duas hipóteses: a primeira seria que a semelhança morfológica entre *T. maculata* e *T. pseudomaculata* provavelmente seja resultado de convergência de caracteres. O fato de produzirem híbridos não indicaria que são espécies próximas, já que triatomíneos não relacionados evolutivamente também produzem híbridos

quando cruzados. A segunda hipótese propõe que estas espécies tiveram uma origem comum, entretanto, já se diferenciaram bastante devido a condições ambientais diferentes. Os híbridos seriam mais semelhantes morfológicamente à *T. maculata* devido ao fato das características morfológicas de *T. pseudomaculata* não serem evidenciadas nos híbridos desta espécie com outras, fato já observado por Galvão, 1978 e comentado nesta discussão. O agrupamento dos híbridos com *T. pseudomaculata* nas caracterizações genéticas pode refletir fixação de caracteres sugerindo ancestralidade desta espécie em relação à *T. maculata*. Em qualquer uma das hipóteses, *T. maculata* e *T. pseudomaculata* são espécies já bastante diferenciadas geneticamente e que não devem constituir complexos entre si.

Com as técnicas utilizadas foi também observada uma grande distância entre *T. wygodzinskyi*, *T. maculata* e *T. pseudomaculata*, não justificando a inclusão de *T. wygodzinskyi* no 'complexo maculata', como proposto por Santos (2003).

6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

- Não há diferença na biologia de *T. maculata* e *T. pseudomaculata* quanto ao número de ovos postos, tempo de desenvolvimento dos embriões e sucesso de eclosão.

- *T. maculata* e *T. pseudomaculata* são espécies que inter cruzam produzindo híbridos inférteis. Segundo o conceito de espécie proposto por Dobzhansky (1937), este fato reafirma o status taxonômico destas duas espécies.

- As diferenças encontradas em relação à postura, tempo e sucesso de eclosão dos ovos entre os cruzamentos interespecíficos e controle, não mostraram influência da espécie da fêmea ou do macho sobre os cruzamentos interespecíficos.

- Os híbridos do cruzamento entre *T. pseudomaculata* e *T. maculata* apresentam características morfológicas das duas espécies parentais, entretanto, são mais semelhantes à *T. maculata*.

- *T. maculata*, *T. pseudomaculata* e *T. wygodzinskyi* têm asas de tamanhos semelhantes. Os híbridos do cruzamento entre *T. pseudomaculata* e *T. maculata* apresentam asas maiores que as dos parentais.

- *T. wygodzinskyi* foi a espécie mais diferenciada das demais nas análises de morfometria geométrica e de RAPDs.

- A prole do cruzamento entre *T. pseudomaculata* e *T. maculata* foi mais semelhante geneticamente a *T. pseudomaculata*, em oposição à caracterização morfológica.

- Foi observada através da análise de morfometria geométrica e de distância genética de Nei (1972) diferença genética dos híbridos do cruzamento entre *T. pseudomaculata* e *T. maculata* quanto ao sentido do cruzamento.

- A análise de RAPDs mostra que os híbridos dos cruzamentos de *T. wygodzinskyi* com *T. maculata* e *T. pseudomaculata* formam dois grupos de acordo com a espécie cruzada.

- Os resultados de isoenzimas mostram que as quatro enzimas polimórficas apresentaram perfis distintos para *T. maculata* e *T. pseudomaculata* e sua prole, e que o perfil de todos os indivíduos da prole era híbrido dos parentais.

- Os resultados da análise de postura, da incubação e eclosão dos ovos, da viabilidade dos cruzamentos, da morfologia qualitativa, da morfometria geométrica e dos perfis de isoenzimas e de RAPDs de *T. maculata*, *T. pseudomaculata* e sua prole e das relações taxonômicas entre *T. maculata*, *T. pseudomaculata* e *T. wygodzinskyi* através de morfometria geométrica e RAPDs, permitem-nos concluir que *T. maculata*, *T. pseudomaculata* e *T. wygodzinskyi* são espécies distintas, com status taxonômico definido e que não se justifica constituírem o 'complexo maculata`.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abad-Franch F, Monteiro F. Molecular research and the control of Chagas disease vectors. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 2005; 77(3): 437-454.

Abalos, JW. Sobre híbridos naturales y experimentales de *Triatoma*. *An. inst. Regional* 1948; 2: 209-223

Abderrazack SB; Guerrini F; Mathieu-Daudé F; Truc P; Neubauer K; Lewicka K; Barnabé C, Tibayrenc M. Isoenzyme eletroforesis for parasite characterization.. In: John E, editor. *Methods in Molecular Biology, Protocols in Molecular Parasitology*. Totowa NJ: Hyde Co. Humana Press. Inc. 1993. p. 361-381.

Apostol BL, Black WC, Reiter P, Miller BR. Population genetics with RAPD-PCR markers: the breeding structure of *Aedes aegypti* in Puerto Rico. *Heredity*. 1996; 76 (4):325-34.

Ballinger-Crabtree ME; Black WC, Miller BR. Use of genetic polymorphisms detected by the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) for differentiation and identification of *Aedes aegypti* subspecies and populations. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1992; 47: 893-901.

Barbosa SE, Dujardin JP, Soares RPP, Pires HHR, Margonari C, Romanha AJ, Panzera F, Linardi PM, Duque-De-Melo M, Pimenta PFP, Pereira MH, Diotaiuti L. Interpopulation Variability Among *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae) from Brazil. *Journal Medical Entomology* 2003; 40(4): 411-420.

Barbosa SE, Belisário CJ, Souza RCM, Paula AS, Linardi PM, Romanha AJ, Diotaiuti. Biogeography of Brazilian populations of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) based on molecular marker and paleovegetational data. *Acta Tropica* 2006. (No prelo)

Bargues, MD, Marcilla A, Ramsay JM, Dujardin JP., Schofield CJ, Mas-Coma S. Nuclear rDNA based molecular clock of the evolution of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vectors of Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2000; 95: 67-573.

Barrett VT. Species interfertility and crossing experiments in Triatomine systematics. In: *International Workshop on Population Genetics and Control of Triatominae*. Schofield CJ, Dujardin JP, Jurberg J, editors. Domingo de los Colorados 1995; 24-28.

Bello, A. Diferenças fenotípicas externas entre híbridos interespecíficos e suas respectivas espécies vetoras da doença de Chagas no Brasil (Triatominae, Reduviidae). *Revista Brasileira de Biologia*. 1978; 38:45-54.

Bookstein, FL. *Morphometric tools for landmark data: geometry and biology*. Cambridge: Cambridge University Press, 1991.

Borges EC, Pires HH, Barbosa SE, Nunes CM, Pereira MH, Romanha AJ, Diotaiuti L. Genetic variability in Brazilian triatomines and the risk of domiciliation. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1999;94(1):371-3.

Borges EC; Dujardin JP; Schofield CJ; Romanha AJ, Diotaiuti L. Genetic variability of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae) populations. *Journal of Medical Entomology* 2000a; 37(6): 872-877.

Borges EC, Romanha AJ, Diotaiuti L. Use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in the populational study of *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911. *Cadernos de Saúde Pública* 2000b; 16 (2):97-100.

Borges EC, Dujardin JP, Schofield CJ, Romanha AJ, Diotaiuti L. Dynamics between sylvatic, peridomestic and domestic populations of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae) in Ceara State, Northeastern Brazil. *Acta Tropica* 2005; 93(1):119-26.

Calderon CI, Dorn PL, Melgar S, Chavez JJ, Rodas A, Rosales R, Monroy CM. A preliminary assessment of genetic differentiation of *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) in Guatemala by random amplification of polymorphic DNA-polymerase chain reaction. *J Med Entomol.* 2004; 41(5):882-7.

Carcavallo RU, Girón IG, Jurberg J, Galvão C, Lent H. Chaves gráficas para as tribos, gêneros e espécies da subfamília Triatominae. In: Atlas dos vetores da doença de Chagas nas Américas vol. I, Carcavallo RU, Girón IG, Jurberg J, Lent H, eds.; Rio de Janeiro: Fiocruz, 1997a.

Carcavallo RU, Girón IG, Jurberg J, Galvão C, Noireau F, Canale D. Mutações, híbridos e teratologias. In: Atlas dos vetores da doença de Chagas nas Américas vol. II, Carcavallo RU, Girón IG, Jurberg J, Lent H, eds.; Rio de Janeiro: Fiocruz, 1997b.

Carcavallo RU, Jurberg J, Lent H. Filogenia de Triatomíneos. In: Atlas dos vetores da doença de Chagas nas Américas vol. III, Carcavallo RU, Girón IG, Jurberg J, Lent H, eds.; Rio de Janeiro: Fiocruz, 1999.

Carcavallo RU, Jurberg J, Lent H, Noireau F, Galvão C. Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Proposals for taxonomic arrangements. *Entomologia y Vectores*; 2000; 7 (I):1-99.

Carvalho JR, Barretto MP. Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. LX – tentativas de cruzamento de *Rhodnius prolixus* Stal, 1859 com *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 (Hemiptera, Reduviidae). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 1976; 18(1): 17-23.

Chavez T, Moreno J, Dujardin JP. Isoenzyme electrophoresis of *Rhodnius* species: a phenetic approach to relationships within the genus. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 1999; 93 (3): 299-307.

Corrêa RR. Estudos sobre a morfologia externa do gênero *Triatoma* Laporte, 1883 (Hemiptera, Reduviidae). *Folia Clinica et Biologica*. 1954; 22:23-50.

Corrêa RR, Espínola H. Descrição de *Triatoma maculata*, nova espécie de triatomíneo de Sobral, Ceará (Hemiptera, Reduviidae). *Arquivos de Higiene e Saúde Pública* 1964; 29(101): 115-127.

Costa J, Freitas-Sibajev MGR, Pires MQ, Marchon-Silva V, Pacheco RS. Isozymes detect variation in populations of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 1997; 92: 459-464.

Dias JCP. O controle da doença de Chagas no Brasil. In: O controle da doença de Chagas nos países do Cone Sul da América. História de uma iniciativa

- internacional 1991/2001 (Silveira AC et al). Uberaba: Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, 2002.
- Dias JCP, Diotaiuti L. Vectores secundarios de la enfermedad de Chagas en el Brasil y perspectivas para su control. In: Aspectos Biológicos, Genéticos y Moleculares. Guhl F, Jaramillo CA, eds.; Curso Taller. Control de Tripanosomiasis Americana y Leishmaniosis. Santafé de Bogotá, Colombia: Corcas Editores Ltda, 1998.
- Dias JCP, Machado EMM, Fernandes AL, Vinhaes MC. General situation and perspectives of Chagas disease in Northeastern Region, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, 2000;16(2):13-34.
- Dias LAS. Análises multidimensionais. In: Alfenas, A.C. (Ed.) Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: UFV. 1998. pp. 405-473.
- Dias Neto E, Souza CP, Rollinson D, Katz N, Pena SDJ, Simpson AJG. The random amplification of polymorphic DNA allows the identification of strains and species of schistosome. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1993; 57: 83-88.
- Díaz AV. Consideraciones epidemiológicas de la enfermedad de Chagas. *Archivos Venezolanos de Medicina Tropical y Parasitología Médica*. 1966; 3:187-201.
- Dice L.R. Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology* 1945; 26: 297-302.
- Diotaiuti L, Loiola CF, Falcão PL, Dias JC. The ecology of *Triatoma sordida* in natural environments in two different regions of the state of Minas Gerais, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 1993; 35(3):237-45.
- Dobzhansky, T. *Genetics and the Origins of Species*. New York: Columbia Univ. Press, 1937.
- Dorn PL, Melgar S, Rouzier V, Gutierrez A, Combe C, Rosales R, Rodas A, Kott S, Salvia D, Monroy CM. The Chagas vector, *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae), is panmictic within and among adjacent villages in Guatemala. *Journal of Medical Entomology*. 2003; 40(4):436-40.
- Dujardin JP. Introducción a la morfometría con énfasis en Triatominae y Phebotominae, 2000. Disponível em: www.who.int/ctd/chagas/disease.htm
- Dujardin JP, Slice DE. Contributions of Morphometrics to Medical Entomology. In: *Encyclopedia of Infectious Disease – Modern Methodologies*. 2006.
- Dujardin JP, Tibayrenc CM. Etude de 11 enzymes et données de génétique formelle pour 19 loci enzymatiques chez *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Annales de la Société Belge de Médecine Tropical* 1985; 65(3): 271-280.
- Dujardin JP, Tibayrenc M, Venegas E, Maldonado, L, Desjeux P, Ayala FJ. Isoenzyme evidence of lack of speciation between wild and domestic *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduvvidae) in Bolivia. *Journal of Medical Entomology* 1987; 24(1): 40-45.

Dujardin JP, Muñoz M, Chavez C, Ponce C, Moreno J, Schofield CJ. The origin of *Rhodnius prolixus* in Central America. *Medical and Veterinary Entomology* 1998a; 12: 113-115.

Dujardin JP, Schofield CJ, Tibayrenc M. Population structure of Andean *Triatoma infestans*: allozyme frequencies and their epidemiological relevance. *Medical and Veterinary Entomology* 1998b; 12: 20-29.

Dujardin JP, Steindel M, Chaves T, Machane M, Schofield CJ. Changes in the Sexual Dimorphism of Triatominae in the Transition from Natural to Artificial Habitats. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 1999a; 94(4):565-569.

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). *Journal of Medical Entomology* 1999b; 36 (6): 653-659.

Dujardin JP, Schofield CJ, Panzera F. Los vectores de la Enfermedad de Chagas. ARSOM, Bruselas, 2002. 189pp.

Espínola HN. Reproductive isolation between *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 and *Triatoma petrochii* Pinto & Barreto, 1925 (Hemiptera Reduviidae). *Revista Brasileira de Biologia* 1971; 31(3):278-281.

Espínola HN. Duas novas subespécies do "complexo maculata", "*Triatoma pseudomaculata pseudomaculata*" e "*Triatoma pseudomaculata minasensis*" (hemiptera, reduviidae, triatominae). *Ciência e Cultura* 1974; 26(7): 354-355.

Espínola HN. Brasil. In: Factores Biológicos y Ecológicos en la Enfermedad de Chagas, Carcavallo UR, Rabinovich JE, Tonn RJ orgs; Argentina: Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, 1985.

Espínola HN, Rodríguez F, Bermúdez M, Tonn RJ. Informaciones sobre la biología y el ciclo de vida de *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), en condiciones de laboratorio. *Boletín de la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental* 1981; XXI(2): 140-142.

Feliciangeli MD, Rabinovich J. Vital statistics of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions II. *Triatoma maculata*. *Journal of Medical Entomology* 1985; 22(1): 43-48.

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

Franca-Rodríguez ME, Yong DG, Lozano M. Estudio sobre los descendientes entre *Triatoma infestans* (Klug, 1834) y *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843, (Hemiptera, Reduviidae). *Revista de Biología do Uruguay* 1979; 7:101-115.

Freitas SPC, Lorosa ES, Rodrigues DCS, Freitas AL, Gonçalves TC. Feeding patterns of *Triatoma pseudomaculata* in the state of Ceará, Brazil. *Revista de Saúde Pública* 2005, 39(1):27-32.

Galíndez GI, Barazarte R, Márquez J, Oviedo M, Márquez Y, Morón L, Carcavallo RU. Relaciones reproductivas entre *Rhodnius prolixus* Stal y *Rhodnius robustus*

- Larrousse (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) bajo condiciones de laboratorio. *Entomologia y Vectores* 1994; 1(1):3-13.
- Galvão AB. Diferenças fenotípicas externas entre híbridos interespecíficos e suas respectivas espécies, vetoras da doença de Chagas no Brasil (Triatominae, Reduviidae). *Revista Brasileira de Biologia* 1978; 38(1): 45-54.
- Galvão AB. Contribuição ao conhecimento do *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) e do *Triatoma pseudomaculata* (Corrêa & Espínola, 1964) (Hemiptera, Reduviidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 1973; VII(6): 365-380.
- Galvão C; Carcavallo R; 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.
- Garcia AL; Carrasco HJ; Schofield CJ; Stthard JR; Frame IA; Valente SAS, Miles MA. Random Amplification of Polymorphic DNA as a tool for taxonomic studies of triatomine bugs (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Medical Entomology* 1998; 35(1): 38-45.
- Garcia BA, Soares Barata JM, Blanco A Enzyme polymorphism among *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) colonies. *Journal Medical Entomology* 1995; 32(2):126-33.
- Gonçalves TCM, Cunha V, Oliveira E, Jurberg J. Alguns aspectos da biologia de *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964, em condições de laboratório (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 1997; 92(2): 275-280.
- Gorla DE, Dujardin JP, Schofield CJ. Biosystematics of Old World Triatominae. *Acta Tropica* 1997; 63: 127-140.
- Gumiel M, Catalá S, Noireau F, Rojas de Arias A, García A, Dujardin JP. Wing geometry in *Triatoma infestans* (Klug) and *T. melanosoma* Martinez, Olmedo & Carcavallo (Hemiptera: Reduviidae). *Systematic Entomology* 2003; 28: 173-179.
- Hadrys A, Balick M, Schierwater B. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology* 1992; 1:55-63.
- Harry M, Galindez I, Cariou MI. Isozyme variability and differentiation between *rhodnius-prolixus*, *r-robustus* and *r-pictipes*, vectors of chagas-disease in venezuela. *Medical and Veterinary Entomology* 1992; 6(1):37-43.
- Hillis DM, Moritz C, Mable BK. *Molecular Systematics*, Massachusetts: Sinauer Associates 1996.
- Hypša V, Tietz DF, Zrzavý J, Rego ROM, Galvão C, Jurberg J. Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the Asiatic clade. *Molecular Physiology. Systematic.* 2002; 23:447-457.

Jaramillo C, Montana MFC, Lyda R, Vallejo GA, Guhl F. Differentiation and genetic analysis of *Rhodnius prolixus* and *Rhodnius colombiensis* by rDNA and RAPD amplification. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 2001; 96(8):1043-1048.

Jaramillo N, Castillo D, Wolff M. Geometric morphometric differences between *Panstrongylus geniculatus* from field and laboratory. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 2002; 97 (5): 667-673.

Jaramillo N, Jean-Pierre Dujardin JP. Análisis Morfométrico: significado biológico del tamaño y la conformación. Belo Horizonte; 2006. [texto da Disciplina Morfometria Geométrica – Curso de Pós-Graduação – Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz].

Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. Briefings in Bioinformatics. 2004; 5(2):150-63.

Lent H. Novo *Triatoma* do Estado de Minas Gerais (Brasil) (Hemiptera, Reduviidae). Annual Review of Entomology. 1951; 22(1-3): 349-352.

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

Lopez G, Moreno J Genetic variability and differentiation between populations of *Rhodnius prolixus* and *R. pallescens*, vectors of Chagas's disease in Colombia. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 1995; 90:353-357.

Lucena DT. *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) "Versus" *Triatoma pseudomaculata* (Corrêa & Espínola, 1964). Revista Brasileira de Biologia 1973; 33(2):175-178.

Manguin S, Wilkerson JEC, Rubio-Palis Y, Danoff-Burg, Roberts DR. Population structure of the primary malaria vector in South America, *Anopheles darlingi*, using isoenzyme, random amplified polymorphic DNA, internal transcribed spacer 2, and morphologic markers. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1999; 60(3) 364-376.

Matias A, Riva JX de la, Torrez M, Dujardin JP. *Rhodnius robustus* in Bolivia Identified by its Wings. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 2001; 96(7):947-950.

Mayr E, Linsley EG, Usinger RL. Methods and Principles of Systematic Zoology. New York: McGraw-Hill, 1953.

Mazzotti L, Osorio MT. Resultados obtenidos en cruzamientos con especies diferentes de *Triatoma*. Revista da Faculdade de Bogotá 1941; 10:159-160.

Mazzotti L, Osorio MT. Cruzamientos experimentales entre varias especies de triatomas. Medicina 1942; 22:215-222.

Monteiro FA, Lazoski C, Noireau F, Solé-Cava AM. Allozyme relationships among ten species of Rhodniini, showing paraphyly of *Rhodnius* including *Psammolestes*. Medical and Veterinary Entomology 2002; 16, 83-90.

Luitgards-Moura JF, Vargas AB, Almeida CE, Magno-Esperança G, Agapito-Souza R, Folly-Ramos E et al. A *Triatoma maculata* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) population from Roraima, Amazon region, Brazil, has some bionomic characteristics of a potential Chagas disease vector. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 2005; 47(3): 131-137.

Nei M. Genetic distance between populations. *American Nature* 1972; 106:283-292.

Nei M, Roychoudhury AK. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics* 1974; 76: 379-390.

Noireau F, Gutierrez T, Zegarra M, Flores R, Brenière F, Cardozo L, Dujardin JP. Cryptic speciation in *Triatoma sordida* (Hemiptera:Reduviidae) from de Bolivian Chaco. *Tropical Medicine & International Health* 1998; 3, 346-372.

Noireau F, Flores R, Gutierrez T, Vargas F. Triatomine en Bolivia: Importância actual de los vectores. In: Chagas La Enfermedad en Bolivia – Conocimientos científicos al início del Programa de Control (1998-2002), La Paz, Bolivia: Ediciones Gráficas “É.G.”, 1999.

Noireau F, Flores R, Gutierrez T, Vargas F. Triatomine en Bolivia: Importância actual de los vectores. In: Chagas La Enfermedad en Bolivia – Conocimientos científicos al início del Programa de Control (1998-2002), La Paz, Bolivia: Ediciones Gráficas “É.G.”, 1999.

Noireau F, Dias-Lima AG, Emperaire L, Santos SM, Sherlock IA. Arboreal habitat of *Triatoma pseudomaculata* in the caatinga. [pôster no XV Congresso Latiamericano de Parasitologia; 2001; São Paulo; Brasil].

Noirerau F, Santos SM, Gumiel M, Dujardin JP, Soares MS, Carcavallo RU, Galvão C, Jurberg J. Phylogenetic relationships within the *oliveirai* complex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Infection, Genetics and Evolution* 2002; 2, 11-17.

Nunes MSN. Biosistemática de *Triatoma pseudomaculata* (Corrêa & Espínola, 1964 [dissertação]. Rio de Janeiro (BR): Instituto Oswaldo Cruz; 2004.

Panzer F, Hornos S, Pereira J, Cestau R, Canale D, Diotaiuti L, Dujardin JP, Perez R. Genetic variability and geographic differentiation among three species of triatomine bugs (Hemiptera-Reduviidae). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1997; 57 (6): 732-739.

Patterson JS, Schofield CJ, Dujardin JP, Miles MA. Population morphometric analysis of the tropicopolitan bug *Triatoma rubrofasciata* and relationships with Old World species of *Triatoma*: evidence of New World ancestry. *Medical and Veterinary Entomology* 2001; 15 (4):443-451.

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

Pereira J, Dujardin JP, Salvatella R, Tibayrenc M. Enzymatic variability and phylogenetic relatedness among *Triatoma infestans*, *T. platensis*, *T. delpontei* and *T. rubrovaria*. *Heredity* 1996; 77, 47-54.

Perez R, Panzera Y, Scafiezzo S, Mazzella MC, Panzera F, Dujardin JP, Scvortzoff E. Cytogenetics as a tool for Triatominae species distinction (Hemiptera: Reduviidae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 1992; 87:353-361.

Perez R; Hernández M; Quintero O; Scvortzoff E; Canale D; Méndez L; Cohanoff C; Martino M, Panzera F. Cytogenetic analysis of experimental hybrids in species of Triatominae (Hemiptera-Reduviidae). Genetica 2005; 125: 261-270.

Perlowagora-Szumlewicz A, Correia MV. Introduction of male sterility through manipulation of genetic mechanisms present in vector species of Chagas' disease. Revistado Instituto de Medicina tropical de São Paulo 1972; 14(6) :360-371.

Perlowagora-Szumlewicz A, Correia MV, Trinxet AMR. Introduction of male sterility II: Onset of disappearance of induced sterility in successive backcrosses. Proc. of Munic, F. R. of Germany 1974; 25-31.

Perlowagora-Szumlewicz A. Male sterility induced through interespecific hybridization of Triatominae. [XV International Congress of Entomology; 1976; Wash. D. C.; U.S.A.].

Rebêlo JMM, Barros VLL, Mendes WZ. Espécies de triatominae (Hemiptera: Reduviidae) do Estado do Maranhão – Brasil. Cadernos de Saúde Pública 1998; 14(1): 187-192.

Rohlf FJ. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.0, user guide. Exeter Software, New York, 1998.

Romanha AJ. Heterogeneidade isoenzimática em *Trypanosoma cruzi*. (Tese de Doutorado) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, MG, 1982.

Ryckman, RE. Biosystematics and hosts of the *Triatoma protracta* complex in North América (Hemiptera: Reduviidae) (Rodentia: Cricetidae). University California Public Entomology. 1962; 27: 93-240.

Santos SM. Estudo molecular de *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964 e espécies afins: rastreamento genético populacional e suas implicações na taxonomia e epidemiologia [dissertação]. Rio de Janeiro (BR): Instituto Oswaldo Cruz; 2003.

Santos SM, Noireau F, Lopes CM, Soares MS, Jurberg J. Genetic relationships of the three morphologically related species *Triatoma maculata*, *T. arthurneivai* and *T. pseudomaculata* [pôster no XV Congresso Latiamericano de Parasitologia, São Paulo, Brasil; 2001].

Schaefer CW. Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): Systematic Questions and Some Others. Neotropical Entomology 2003; 32(1):001-010.

Schreiber G, Pinho AC, Parentoni R, Salgado AA, Godoi Jr. TL. Cytogenetics of Triatominae: II Spermatogenesis in hybrid between *Triatoma infestans* and *Triatoma pseudomaculata* (Hemiptera, Reduviidae). Revista Brasileira de Biologia. 1974; 31(1): 1-9.

Schofield CJ. Biosystematics of the Triatominae. In Biosystematics of Haematophagous Insects, Systematics Association, Special Vol. 37, Clarendon Press, Oxford, 1988.

Schofield, C.J. *Trypanosoma cruzi* - the vector-parasite paradox. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 2000; 95: 535-544.

Schofield CJ, Dolling WR. Bedbugs and kissing-bugs (bloodsucking Hemiptera). In R.P. Lane & R.W. Crosskey (eds.), Medical insects and arachnids. London, England: Chapman and Hall; 1993.

Schofield CJ, Dujardin JP. Theories on the evolution of *Rhodnius*. Actualités Biologiques. 1999; 21:183-197.

Silva IG, Fernabdes FF, Silva HHG. Influência da temperatura na biologia de triatomíneos. XX. *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) (Hemiptera, Reduviidae). Revista de Patologia Tropical 1995; 24(1):49-54.

Silveira AC & Rezende DF. Epidemiologia e controle da transmissão vetorial da doença de Chagas no Brasil. Resvista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 1994; 27(III):11-22.

Sneath PHA, Sokal AR. Numerical taxonomy. Nature 1962; 193:853-860.

Sneath PHA, Sokal RR. Numerical Taxonomy. Principles and practice of numerical classification. Freeman, San Francisco, XV, 1973.

Soares RPP, Barbosa SE, Dujardin JP, Schofield CJ, Siqueira AM, Diotaiuti L. Characterization of *Rhodnius neglectus* from two regions of Brazil using isoenzymes, genitalia morphology and morphometry. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 1999; 94(2):161-166.

Soares RPP, Barbosa SE, Borges EC, Melo Júnior TA, Romanha AJ, Dujardin JP, Schofield CJ, Diotaiuti L. Genetic studies of *Psammolestes tertius* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) using male genital morphology, morphometry, isoenzymes, and random amplified polymorphic DNA. Biochemical Genetics 2001; 39(1/2): 1-13.

Solano P, Dujardin JP, Schofield CJ, Romanha C, Tibayrenc M. Isoenzymes as a tool for identification of *Rhodnius* species. Res. Rev. Parasitol. 1996; 56: 41-47.

Souza LC, Frota FCC, Souza JA, Zuza CAS, Lima JWO. Descrição de um foco urbano de *Triatoma pseudomaculata* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) na cidade de Sobral, norte do Ceará. Resultados preliminares. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 1999; 32 (I):84-85.

Steindel M, Dias Neto E, Menezes CLP, Romanha AJ, Simpson AJG. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. Molecular Biochemical Parasitology 1993; 60: 71-80.

Thorpe JP. The Molecular Clock Hypothesis: Biochemical Evolution, Genetic Differentiation and Systematics. Annual Review of Ecology and Systematics 1982; 13: 139-168.

Tonn RJ, Otero MA, Mora E, Espinola H, Carcavallo RU. Aspectos biológicos, ecológicos y distribución geográfica de *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) (Hemiptera, Reduviidae), en Venezuela. Boletín de la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental 1978; XVIII(1): 16-24.

Torrealba JW, Tonn RJ, Carcavallo RU. Venezuela. In: Factores Biológicos y Ecológicos en la Enfermedad de Chagas; Carcavallo UR, Rabinovich JE, Tonn RJ, orgs; Argentina: Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud; 1985.

Tibayrenc M, Neubauer K, Barnabé C, Guerrini F, Skarecky D, Ayala FJ. Genetic characterization of six parasitic protozoa: Parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. Proceedings of the National Academy of the Sciences USA 1993; 90: 1335-1339.

Usinger RL. The Triatominae of North and Central America and the West Indies and their Public Health Significance. Public Health Bulletin 1944; 288.

Usinger RL, Wygodzinsky Ryckman ER. The Biosystematics of Triatominae. Annual Review of Entomology 1966; 11:309-329.

Vanlerberghe-Masutti F. Molecular identification and phylogeny of parasitic wasp species (Hymenoptera: Trichogrammatidae) by mitochondrial DNA RFLP and RAPD markers. Insect Molecular Biology 1994; 3(4), 229-237.

Villegas J, Feliciangeli MD, Dujardin JP. Wing shape divergence between *Rhodnius prolixus* from Cojedes (Venezuela) and *Rhodnius robustus* from Mérida (Venezuela). Infection, Genetics and Evolution 2002; 2: 121-128.

Welsh J; Honeycutt RJ, McClelland M & Sobral BWS. Parentage determination in maize hybrids using the arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR). Theoretical and Applied Genetics 1991a; 82: 473-476.

Welsh J; Petersen C & McClelland M. Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in the mouse: application to strain identification and genetic mapping. Nucleic Acids Research 1991b; 19: 303-306.

WHO, 2006. <http://www.who.int/ctd/chagas/disease.htm>

Williams JGK; Kubelik AR; Livak KJ; Rafalski JÁ & Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 1990; 18(22):6531-6535.

Zárate LG, Zárate RJ. A checklist of the Triatominae (Hemiptera:Reduviidae) of Mexico. International Journal of Entomology 1985; 27(1):102-127.

ANEXO 1 - EXTRAÇÃO DE DNA (DE TRIATOMÍNEO) PELO KIT WIZARD

1. Colocar a pata em um microtubo devidamente rotulado. Lavar a pinça com hipoclorito antes de pegar cada pata.
2. Adicionar 300 μ l da solução de lise nuclear e macerar a pata com auxílio de um pistilo. (Entre uma pata e outra lavar a pinça e pistilo com hipoclorito e água MQ).
3. Deixar à temperatura ambiente ou no multi-block (56°C – 30min) até a solução se tornar viscosa (com bolhas).
4. Adicionar 100 μ l da solução de precipitação protéica e vortex vigorosamente por 20 a 30 segundos visualiza-se o precipitado disperso na solução.
5. Centrifugar a 14000 rpm por 3 min à temperatura ambiente, observando a formação de um "pellet" escuro.
6. Transferir cuidadosamente o sobrenadante para um novo tubo contendo 300 μ l de isopropanol (CH₃CHOHCH₃) e misturar delicadamente (20min- 10 min de cada lado), até o aparecimento de uma massa (pontos) em suspensão – na maioria das vezes os pontos não aparecem.
7. Centrifugar a 14000 rpm à temperatura ambiente por 6 min e observar a formação de um pellet claro.
8. Descartar o sobrenadante (virar o microtubo), adicionar 300 μ l de etanol 70% à temperatura ambiente e inverter o tubo várias vezes delicadamente (5 min de cada lado).
10. Repetir os passos 8 (1 minuto) e 9, centrifugar mais de 1 minuto.
11. Aspirar cuidadosamente o etanol (com pipeta) e colocar o tubo no multi-block até a evaporação total do etanol.
12. Adicionar 70 μ l da solução de hidratação de DNA e incubar a 65°C (ou até mais de 50°C) por 1h ou deixar "overnight" a temperatura ambiente, agitando periodicamente (2 a 3 vezes).

ANEXO 2A - PREPARAÇÃO DE GEL DE POLIACRILAMIDA (MINI-GEL)

1. Limpar com álcool, as placas, os espessadores (2 de 1,5mm e um mais fino) e o pente de 1,5mm.
2. Montar as placas e espessadores evitando desníveis e utilizando o suporte.
3. Preparar o gel de poliacrilamida na porcentagem desejada.
4. Aplicar o gel com a pipeta de revólver no suporte e colocar o pente. Evitar bolhas de ar.
5. Diluir as amostras com tampão de amostra 2X, volume a volume (3 μ l) – evitar pipetar o óleo e limpar sempre a ponta da ponteira para retirar o excesso de óleo. Pode-se colocar a amostra no gelo, para o óleo ficar firme.
6. Conferir se o gel está polimerizado (10min), retirar o pente e lavar as canaletas com água Mili Q para retirar o excesso de acrilamida, utilizando uma agulha para retirar os pedaços de gel, se necessário.
7. Adaptar o suporte na cuba e colocar TBE 1X novo na parte interna e TBE usado na parte externa.
8. Sobre uma placa de vidro maior, coloca-se ao centro papel filme de tamanho relativo ao número de amostras para prepará-las. Cortar um pedaço de papel higiênico para limpar as ponteiras.
 - Colocar o tampão de amostra e logo após a amostra em ordem e homogeneizar.
 - Aplicar a amostra e o padrão, evitando bolhas de ar e tampar a cuba.
9. Correr por 5 min a 50V (15mA/gel) até a separação dos corantes, passando a 80V ou 120V. Verificando se a “Hight voltage” está ligada e se existem bolhinhas de ar subindo dentro da cuba.
10. Após terminar a corrida (quando o segundo corante azul estiver saindo do gel), diminuir a voltagem, desligar a fonte de eletroforese.
11. Retirar com cuidado o gel do suporte e placas e marcá-lo se necessário.
12. Colocar em uma cuba de vidro com solução fixadora por 10 min ou até 24 horas, agitando suavemente.

13. Retirar a solução fixadora (guardar) da cuba e colocar 150ml de corante (Nitrato de Prata), evitando derramá-lo sobre o gel. Agitar suavemente por 10 min.
14. Retirar a solução corante, lavar rapidamente em água Mili Q e lavar novamente com água Mili Q por 2 min agitando suavemente.
15. Desprezar a água Mili Q e colocar 150ml de solução de revelação (Hidróxido de sódio) junto com 0,5ml de formol (formoldeído). Agitar suavemente por cerca de 10 min, observando a intensidade das bandas. Desprezar a solução de revelação e colocar a solução fixadora que havia guardado, quando o gel estiver corado.
16. Colocar os géis na solução fixadora glicerinada (secagem) e guardar em geladeira até secagem definitiva. Se for guardar por tempo prolongado, acrescentar um pouco de álcool.
17. Montar os géis entre folhas de papel celofane molhado.

ANEXO 2B - PREPARAÇÃO DE GEL DE POLIACRILAMIDA (40-45 CANALETAS)

1. Limpar as placas e espaçadores com álcool.
2. Colocar os pentes tomando o cuidado para não ficarem tortos ou fora do lugar.
3. Preparar o gel: Bis-acrilamida 8% - 60 ml; TEMED - 60 μ L, APS - 600 μ L.
4. Aplicar o gel com a placa levantada e ir abaixando aos poucos para as bolhas saírem.
5. Firmar as placas com os cliques e deixar polimerizar (cerca de 40min a 1 hora para gel 8%).
6. Preparar a agarose, derretendo-a em banho-maria.
7. Encher a parte inferior da cuba com TBE 1X (novo ou usado).
8. Após a polimerização do gel, retirar os pentes e lavar as canaletas com água Mili Q.
9. Retirar os espaçadores de baixo e colocar o gel no suporte. Ir colocando as placas devagar e de lado, para que o TBE entre uniformemente na parte inferior das placas e não dê bolha.
10. Prender as placas com os cliques na cuba (dois de cada lado, um mais em cima e outro mais em baixo, com cuidado para não amassar o gel).
11. Passar um filete (1ml) de agarose (líquido) entre a placa e a cuba para que fique bem vedado. Esperar solidificar. Não esquecer de colocar uma placa por trás e vedar (formando uma "piscina").
12. Encher a parte superior da cuba com TBE 1X novo.
13. Diluir as amostras em tampão de amostra 2X (6 μ l/6 μ l) e aplicar no gel.
14. Correr a 50V até os corantes se separarem e a 100-130V até o final da corrida.
15. Ao retirar o gel das placas, cuidado para não parti-lo ao meio. Levantar um dos espaçadores bem devagar e observar se o gel descola da placa.
16. Colocar o gel (preso em uma das placas) dentro de uma cuba com bastante fixador e ir soltando as beiradas do gel com o espaçador. Aos poucos, ir balançando a cuba para que o gel solte por inteiro da placa.

17. Após deixar no mínimo 10 min no fixador, sob agitação leve, retirar esta solução e acrescentar 300ml de solução de nitrato de prata a 0,2% deixando por 8 a 10 min agitando.
18. Retirar a solução de nitrato de prata e lavar rapidamente com água Mili Q. Acrescentar cerca de 300 ml de água MQ e deixar lavando por dois minutos sob agitação leve.
19. Retirar a água e acrescentar 300 ml de revelador com formoldeído e deixar até quando as bandas estiverem nítidas, sob agitação leve.
20. Retirar a solução reveladora e lavar o gel em fixador.
21. Guardar o gel na geladeira em solução fixadora glicerinada (10%) por, no máximo dois dias e depois secar entre folhas de papel celofane.

ANEXO 2c - SOLUÇÕES USADAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Bis-acrilamida 30%

Acrilamida (C ₃ H ₅ NO)	29 g	PM 71.08
Bis (N,N-methylene-bis-acrylamide)	01 g	PM 154.17
Água MQ	q.s.p. 100 ml	

Bis-acrilamida 6 e 8%

concentração	Bis-crilamida 30%	TBE 5x	Água MQ
6%	20 ml	20 ml	q.s.p. 100 ml
8%	27 ml	20 ml	

Solução fixadora

Álcool etílico	100 ml
Ácido acético	5 ml
Água MQ	q.s.p. 1 L

Solução corante / Solução de prata

	para até 3 géis	1 litro
AgNO ₃	0,3 g	2 g
Água MQ	q.s.p. 150 ml	q.s.p. 1.000 ml

Solução de revelação

	para até 3 géis	1 litro
NaOH 0,75M	4,5 g	30 g
Água MQ	q.s.p. 150 ml	q.s.p. 1.000 ml

Obs: acrescentar 450 µl de formaldeído 0,1M antes de colocar a solução nos géis.

APS

Persulfato	1 g
Água DDW	q.s.p. 100 ml

TBE 5x

Tris-Base	54 g
Ácido bórico	27,5 g
EDTA 0,5 M pH 8	20 ml
Água MQ	q.s.p. 1 L

TBE 1x

TBE 5x	200 ml
Água	800 ml

Anexo 3 - Tampões de corrida para isoenzimas

α -GPD - Tris 0,678 M/Ác. Cítrico 0,157 M pH 7,0.

Tris	83,2 g
Ác. Cítrico	30,2 g
H ₂ O dest.	750 ml
H ₂ O	q.s.p. 1000 ml

GPI - Tampão Fosfato 0,2 M, pH 7,4.

Na ₂ HPO ₄	28,4 g
H ₂ O dest.	750 ml
H ₂ O dest.	q.s.p. 1000 ml
HCl conc.	q.s.p. pH 7,4

PGM e 6PGD - Tampão Tris-Maleato 0,15 M pH 7,4.

Tris	18,17 g
Ácido Maleico	17,40 g
EDTA Na ₂ .H ₂ O	5,60 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	3,50 g
H ₂ O dest.	750 ml
H ₂ O dest.	q.s.p. 1000 ml

MDH - Tampão citrato 75 mM, pH 6,0.

Citrato Na ₃ .2H ₂ O	22,06 g
H ₂ O dest.	750 ml
H ₂ O dest.	q.s.p. 1000 ml
HCl conc.	q.s.p. pH 6,0

ICD e PEP-2 - Tampão Tris 0,33 M/Citrato 0,0415M pH 8,6.

Tris	40,03 g
Ácido Cítrico	8,72 g
H ₂ O	q.s.p. 1000 ml

SOLUÇÕES DE REVELAÇÃO PARA ISOENZIMAS

α -GPD

Tris/HCl 0,03 M pH 8,0	2,1 ml
DL-glicerol-3-fosfato Na ₂ .6H ₂ O	384,4 mg
H ₂ O dest.	8,7 ml
Piruvato de sódio	106,4 mg
β -NAD 10,2 mg/ml	1,00 ml
MTT 7,5 mg/ml	0,50 ml
PMS 1,0 mg/ml	0,20 ml
Ágar 1,2 %	150 mg em 12,5 ml H ₂ O dest.

GPI

Tris/HCl 0,3 M pH 8,0	8,50 ml
NADP 12,2 mM	1,00 ml
MgCl ₂ .6H ₂ O 0,5 M	0,20 ml
D-frutose-6P 20,4 mg/ml	0,50 ml
G-6PD 375 u/ml	20 μ l
MTT 7,5 mg/ml	0,50 ml
PMS 1,0 mg/ml	0,20 ml
Ágar 1,2 %	150 mg em 12,5 ml H ₂ O dest.

PGM

Tris/HCl 0,3 M pH 8,0	8,50 ml
NADP 10 mg/ml	1,00 ml
MgCl ₂ .6H ₂ O 0,5 M	2,00 ml
α-D.glicose-1P 20mg/ml	1,00 ml
G-6PD-375μ/ml	20 μl
Imidazol 367 mM	0,20 ml
MTT 7,5 mg/ml	0,50 ml
PMS 1,0 mg/ml	0,20 ml
Ágar 1,2 %	150 mg em 12,5 ml H ₂ O dest.

MDH

Tris/HCl 0,3 M pH 8,0	8,5 ml
β-NAD 10 mg/ml	0,50 ml
Malato 1,1 M pH 7,2	2,30 ml
MTT 7,5 mg/ml	0,50 ml
PMS 1,0 mg/ml	0,20 ml
Ágar 1,2 %	150 mg em 12,5 ml H ₂ O dest.

ICD

Tris 0,135 M/citrato 0,042 pH 7,0	5,50 ml
H ₂ O dest.	3,60 ml
Ácido isocítrico	20,0 ml
MgCl ₂ .6H ₂ O 0,5 M	2,00 ml
NADP 10 mg/ml	0,70 ml
MTT 7,5 mg/ml	0,50 ml
PMS 1,0 mg/ml	0,20 ml
Ágar 1,2 %	150 mg em 12,5 ml H ₂ O dest.

PEP-2

Tampão fosfato 0,1 M pH 7,4	3,0 ml
H ₂ O dest.	8,7 ml
MnCl ₂ 0,1 M	0,3 ml
L-aminoácido oxidase	1,0 mg
Peroxidase	1,0 mg
Leu-ala	10,0 mg
3-amino-9-etilcarbazol	0,50 ml (13,5 mg/0,5 etanol)*
Ágar 1,2 %	150 mg em 12,5 ml H ₂ O dest.

* Preparar com um dia de antecedência.

6PGD

Tris/HCl 0,3 M pH 8,0	8,50 ml
NADP 10 mg/ml	1,00 ml
Ác. 6-P glucônico	7,00 mg
MgCl ₂ .6H ₂ O 0,5 M	0,50ml
H ₂ O	1,30 ml
Imidazol 367 mM	0,50 ml
MTT 7,5 mg/ml	0,50 ml
PMS 1,0 mg/ml	0,20 ml
Ágar 1,2 %	150 mg em 12,5 ml H ₂ O dest.

CONDIÇÕES DE MIGRAÇÃO PARA ISOENZIMAS

enzimas	Migração V/mA	Tempo de migração	Diluição do tampão de corrida para o gel	Pólo de migração
6PGD	180/25	180	1:10	+
PEP-2	200	120	2:5	+
αGPD	242/20	150	1:7	+
GPI	242/20	180	3:4	+
PGM	242/24	180	1:10	-
MDH	242/25	150	1:10	+ -
ICD	300	120	2:5	+

ANEXO 4 - NOMES E CÓDIGOS DE IDENTIFICAÇÃO DOS SISTEMAS ENZIMÁTICOS

Abreviatura	Nome
PGM	Fosfoglicomutase
MDH	Malato Desidrogenase
GPI	Glicose Fosfato Isomerase
ICD	Isocitrato Desidrogenase
PEP2	L.Leucil Glicil Glicina Aminopeptidase
6PGD	6 Fosfato Desidrogenase
α -GPD	α -Glicerofosfato Desidrogenase
ACON	Aconitase
FDP	Frutose-1-6-difosfato
FUM	Fumarase Hidrase
GDH	Glutamato Desidrogenase
GOT	Glutamato Oxaloacetato Transaminase
IDH	Isocitrato Desidrogenase
6PGDH	6-fosfoglutanato Desidrogenase
