

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto René Rachou – Fiocruz Minas
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

**Taxonomia integrativa de espécies do subgênero *Evandromyia* (*Aldamyia*) Galati, 2003
(Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) do Brasil**

por
Bruno Leite Rodrigues

Belo Horizonte

2020

DISSERTAÇÃO

MCS – IRR

B. L. RODRIGUES

2020

BRUNO LEITE RODRIGUES

**Taxonomia integrativa de espécies do subgênero *Evandromyia* (*Aldamyia*) Galati, 2003
(Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) do Brasil**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde - área de concentração Transmissores de Patógenos.

Orientação: Dra. Paloma Helena Fernandes Shimabukuro

Belo Horizonte

2020

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do IRR
CRB/6 1975

R618t
2020

Rodrigues, Bruno Leite.

Taxonomia integrativa de espécies do subgênero *Evandromyia* (*Aldamyia*) Galati, 2003 (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) do Brasil / Bruno Leite Rodrigues. – Belo Horizonte, 2020.

XII, 71 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 60-71

Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de concentração: Transmissores de Patógenos.

1. DNA/classificação. 2. Evolução biológica. 3. Phlebotominae. 4. Taxonomia por Código de Barras de DNA. 6. Tipagem de Sequência Multilocus. I. Título. II. Shimabukuro, Paloma Helena Fernandes.

CDD – 22. ed. – 595.7

BRUNO LEITE RODRIGUES

**Taxonomia integrativa de espécies do subgênero *Evandromyia* (*Aldamyia*) Galati, 2003
(Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) do Brasil**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração Transmissores de Patógenos.

Orientação: Paloma Helena Fernandes Shimabukuro

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Paloma Helena Fernandes Shimabukuro (IRR) Presidente

Profa. Dra. Kirstern Lica Follmann Haseyama (UFMG) Titular

Profa. Dra. Roberta Lima Caldeira (IRR) Titular

Profa. Dra. Laila Alves Nahum (IRR) Suplente

Dissertação/Tese defendida e aprovada em Belo Horizonte, 20/02/2020

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer ao Instituto René Rachou e a Pós-Graduação em Ciências da Saúde pela oportunidade de realização da dissertação aqui apresentada.

Gostaríamos de agradecer ao auxílio financeiro responsável pela realização desse estudo pela FAPEMIG (APQ-02569-15) e bolsa de estudos a mim concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço aos pesquisadores e colegas José D. Andrade-Filho, Gabriel B. Tonelli, Júlia B. Miranda, Tiago K. Krolow, André S. Fernandes, Márcio S. Teixeira, e Raíssa L. Pontes que auxiliaram nas coletas dos flebotomíneos utilizados nesse estudo nos municípios de Lassance (MG), Porto Nacional (TO), Caracaraí (RR) e Barreirinhas (MA).

Agradeço a Luke A. Baton pela colaboração e grande auxílio principalmente da análise de dados e discussão desse trabalho.

Gostaria de agradecer a todos os integrantes do Grupo de Estudos em Leishmanioses (GEL) que ajudaram de forma direta e indireta na realização desse trabalho, com ênfase para minha orientadora Paloma H. F. Shimabukuro por toda a confiança, carinho e companheirismo desses dois anos.

Por último gostaria de agradecer a todos os familiares e amigos que forneceram todo o apoio necessário para a conclusão desse estudo e conseqüentemente para minha formação, e em especial, aos meus pais por todo o suporte financeiro e emocional. Obrigado por acreditarem em mim.

RESUMO

O subgênero *Evandromyia* (*Aldamyia*) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) possui 15 espécies formalmente descritas por caracteres morfológicos, além de uma espécie cujo nome não atende o princípio de nomenclatura binomial (artigos 5.1 e 11.4, ICZN). Por conta da complexidade da identificação morfológica desses insetos, métodos moleculares podem ser utilizados de forma integrativa para elucidar sua correta identificação, como é o caso da amplificação e análise do DNA Barcoding (fragmento do gene *citocromo oxidase subunidade I – col*). Três das espécies desse subgênero – *E. carmelinoi*, *E. evandroi* e *E. lenti* – não são corretamente delimitadas pelo gene *col*. Logo, nesse estudo foi avaliada a utilidade da taxonomia molecular para a identificação de espécies desse subgênero, incluindo a análise de marcadores suplementares ao *COI*, bem como a utilização de métodos sofisticados de delimitação de espécies “multilocus”. Para isso, foram analisadas sequências do gene *COI* de 10 morfoespécies, além de sequências dos genes *CYTB*, *CAC*, *PER* e rDNA 28S para três espécies indistinguíveis pelo *COI*, provenientes de 11 localidades do Brasil. Foram combinadas ao nosso conjunto de dados 44 “barcodes” de *COI* previamente publicadas, que foram analisadas pelos critérios de similaridade de sequências “best-match”, enquanto quatro diferentes métodos de delimitação de espécies “single-locus” (ABGD, GMYC, PTP e TCS) foram utilizados para inferir unidades taxonômicas operacionais (OTUs). A utilidade de marcadores suplementares na delimitação de espécies pelo *COI* foi conduzida pelo método “multilocus” de coalescência de múltiplas espécies (MSC) no programa BPP. De forma geral, seis das morfoespécies analisadas foram corretamente delimitadas pelos “barcodes”, formando clados bem apoiados pelas análises filogenéticas e inferência de OTUs, enquanto outras quatro – *E. carmelinoi*, *E. evandroi*, *E. lenti* e *E. piperiformis* – formaram um único clado/OTU bem apoiado. Apesar de *E. carmelinoi*, *E. evandroi* e *E. lenti* serem indistinguíveis por sequências de *COI*, *E. piperiformis* formou um clado único, e pode ser corretamente identificado pelos critérios de “best-match”. A análise dos marcadores suplementares *CYTB*, *CAC*, *PER* e 28S não foram suficientes para delimitar corretamente as três espécies indistinguíveis pelo *COI*, mas ao analisadas por métodos “multilocus” foram capazes para delimitar *E. evandroi* como uma espécie distinta de *E. carmelinoi*/*E. lenti*. Apesar das nítidas diferenças morfológicas, essas quatro últimas espécies não podem ser identificadas como táxons distintos na maioria das análises moleculares, e por conta disso propomos que devam ser consideradas como membros de um complexo de espécies recentes (complexo Evandroi).

Palavras-chave: DNA barcoding, filogenética, flebotomíneos, complexo de espécies, delimitação de espécies, “multilocus”, coalescência.

ABSTRACT

The subgenus *Evandromyia* (*Aldamyia*) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) has 15 species formally described by morphological characters, in addition, one species does not comply with the Principle of Binominal Nomenclature (articles 5.1 and 11.4, ICZN). Due to the complexity of the morphological identification of these insects, molecular methods may be used in an integrative way to elucidate their correct identification, such as the amplification and analysis of DNA Barcoding (a fragment of the gene *cytochrome oxidase subunit I* - *COI*). Three species of this subgenus – *E. carmelinoi*, *E. evandroi* and *E. lenti* – are not correctly delimited by *COI*-barcodes. Therefore, this study evaluated the usefulness of molecular taxonomy for the identification of *Evandromyia* (*Aldamyia*) species, including the analysis of supplementary markers to *COI*, as well as the use of sophisticated *multilocus* species delimitation methods. For this, we analyzed *COI* sequences of 10 morphospecies, as well as sequences of the *CYTB*, *CAC*, *PER* and rDNA 28S genes for three species indistinguishable by *COI* from 11 localities in Brazil. Forty-four previously published *COI*-barcodes were combined with our dataset, which were analyzed by the best-match sequence similarity criteria, while four different *single-locus* species delimitation methods (ABGD, GMYC, PTP and TCS) were used to infer operational taxonomic units (OTUs). The usefulness of supplemental markers in species delimitation was also conducted by the multi-species coalescent (MSC) method in the BPP software. Overall, 6 of the morphospecies were congruent with both the well-supported clades identified by phylogenetic analysis and the OTUs inferred by species delimitation, while the remaining 4 morphospecies – *E. carmelinoi*, *E. evandroi*, *E. lenti* and *E. piperiformis* – were merged into a single well-supported clade/MOTU. Although *E. carmelinoi*, *E. evandroi*, *E. lenti* were indistinguishable using *COI* DNA barcodes, *E. piperiformis* did form a distinct phylogenetic cluster and could be correctly identified using best-match criteria. The analysis of the other markers *CYTB*, *CAC*, *PER* and 28S were insufficient to correctly identify the three species indistinguishable by *COI*, but when analyzed by *multilocus* methods were sufficient to delimit *E. evandroi* as a distinct species of *E. carmelinoi* / *E. lenti*. Despite the clear morphological differences, these last four species cannot be delimited as distinct taxa in most of the molecular analyzes, and we therefore propose that they should be considered as members of a recently-diverged species complex (*evandroi* complex).

Keywords: DNA barcodes, sand fly, phylogenetics, species delimitation, species complex, taxonomy, multi-species coalescent.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fêmea do flebotomíneo *Phlebotomus papatasi* realizando repasto sanguíneo. Fonte: Centers for Disease Control and Prevention's Public Health Image Library (PHIL), ID: #10275..... 13
- Figura 2.** Exemplos de flebotomos fêmea (a) e macho (b) do subgênero *Evandromyia* (*Aldamyia*). Círculos em vermelho destacam o dimorfismo sexual presente na terminália da subfamília Phlebotominae. 14
- Figura 3.** Árvores neighbor-joining de sequências do gene *COI* para flebotomíneos das espécies *E. lenti*, *E. evandroi* e *E. carmelinoi*. (a) Recorte da árvore obtida e adaptada de RODRIGUES et al., (2018) (b) recorte da árvore obtida e adaptada de PINTO et al., (2015). . 20
- Figura 4.** Mapa do Brasil mostrando a distribuição geográfica das espécies *Evandromyia carmelinoi*, *E. evandroi*, *E. lenti* e *E. piperiformis* de acordo com os estados brasileiros..... 21
- Figura 5.** Fotografias de microscopia ótica dos últimos segmentos abdominais de fêmeas do subgênero *Evandromyia* (*Aldamyia*), com ênfase no formato das espermatecas de (a) *E. carmelinoi*, (b) *E. evandroi*, (c) *E. lenti* e (d) *E. piperiformis*. 22
- Figura 6.** Fotografias de microscopia ótica da terminália de machos do subgênero *Evandromyia* (*Aldamyia*), demonstrando aspectos gerais (à esquerda), e o ápice dos dutos edeagais (à direita circulado em vermelho) de (a,b) *E. carmelinoi*, (c,d) *E. evandroi*, (e,f) *E. lenti* e (g,h) *E. piperiformis*. 23
- Figura 7.** Mapa do Brasil mostrando os sítios de coleta de espécimes do subgênero *Evandromyia* (*Aldamyia*) utilizados nesse estudo: (1) Manaus – AM; (2) Lábrea – AM; (3) Ubajara – CE; (4) Porto Nacional – TO; (5) Lassance – MG; (6) Lagoa Santa – MG; (7) Jacareacanga – PA; (8) Barreirinhas – MA; (9) Caracaraí – RR; (10) Urbano Santos – MA; (11) Viana – ES. Padrões de coloração dos pontos indicam suas respectivas espécies amostradas. 34
- Figura 8.** Fotografias dos sítios de coleta de espécimes do subgênero *Evandromyia* (*Aldamyia*): (a) Parque Nacional de Ubajara – Ceará, (b) Armadilha luminosa instalada no Parque Nacional do Viruá – Roraima, (c) Área rural do município de Porto Nacional – Tocantins, (d) Armadilha luminosa instalada em cavernas no Parque Nacional de Ubajara. . 35
- Figura 9.** Gel de agarose (1%) corado com EtBr mostrando padrão de amplificação positivo para o gene *PER* (cerca de 500 bp) de flebotomíneos do subgênero *Evandromyia* (*Aldamyia*). 38
- Figura 10.** Distribuição de frequências das distâncias genéticas p intra- e interespecíficas ($n = 3,741$) baseadas em sequências do gene *COI* de 87 indivíduos de 10 morfoespécies do subgênero *Evandromyia* (*Aldamyia*)..... 44
- Figura 11.** Árvore filogenética de sequências do gene *COI* de 10 diferentes morfoespécies do subgênero *Evandromyia* (*Aldamyia*). A topologia é referente a árvore de máxima credibilidade de clado (MCC) da BI. Valores próximos aos nós representam a probabilidade posterior (> 0.95) da BI e suporte de bootstrap (> 70) da árvore de ML. O esquema de cores das identificações segue as diferentes morfoespécies. As primeiras duas letras de cada táxon representam uma morfoespécie, como a seguir: AN = *E. andersoni*, TE = *E. termitophila*, BA = *E. bacula*, CA = *E. carmelinoi*, LE = *E. lenti*, EV = *E. evandroi*, PI = *E. piperiformis*, WI = *E.*

williamsi, WA = *E. walkeri*, BD = *E. sp.* de Baduel. Barras verticais representam a delimitação de espécies pelos algoritmos GMYC, PTP, TCS e ABGD. As barras horizontais no gráfico à direita ilustram a variação entre as distâncias genética intraespecífica máxima e a mínima interespecífica para cada indivíduo; as barras horizontais em cinza indicam aquelas que possuem o “barcode gap” (com a distância intraespecífica máxima à esquerda, e a mínima interespecífica à direita, no final das barras), enquanto as barras horizontais em vermelho demonstram a extensão da sobreposição entre as distâncias intra- e interespecíficas para sequencias sem o “barcode gap” (nesse caso, com a distância mínima interespecífica à esquerda, e a máxima intraespecífica à direita, ao final das barras). 46

Figura 12. Rede de haplótipos TCS de sequencias do gene *COI* de 10 diferentes morfoespécies do subgênero *Evandromyia* (*Aldamyia*). Redes desconectadas representam OTUs delimitadas. Cada círculo colorido representa um haplótipo, com seu tamanho proporcional ao número de indivíduos ($n = 87$) naquele haplótipo. Círculos menores em branco representam haplótipos não observados que foram inferidos pelo algoritmo. 47

Figura 13. Árvore filogenética de máxima credibilidade de clado (MCC) do gene *CYTB* de três espécies do complexo Evandroi. Valores próximos aos nós representam a probabilidade posterior (PP>0.95). As primeiras duas letras na identificação das sequencias representam as morfoespécies: CA = *E. carmelinoi*, EV = *E. evandroi*, LE = *E. lenti*, enquanto as demais letras identificam a localidade das amostras: PN = Porto Nacional – Tocantins, LAS = Lassance – Minas Gerais, BAR = Barreirinhas – Maranhão. 48

Figura 14. Árvore filogenética de máxima credibilidade de clado (MCC) dos genes nucleares rDNA 28S (a), *CAC* (b), e *PER* (c) de três espécies do complexo Evandroi. Valores próximos aos nós representam a probabilidade posterior (PP). As primeiras duas letras na identificação das sequencias representam as morfoespécies: CA = *E. carmelinoi*, EV = *E. evandroi*, LE = *E. lenti*, enquanto as demais letras identificam a localidade das amostras: PN = Porto Nacional – Tocantins, LAS = Lassance – Tocantins, BAR = Barreirinhas – Maranhão, PAR = Parque de Ubajara – Ceará, URS = Urbano Santos – Maranhão, VES = Viana – Espírito Santo. 49

Figura 15. Árvore de espécies gerada pela análise “multilocus” no *BEAST e visualizada no DensiTree. Todas as topologias geradas na análise (18,000 árvores após burn-in) foram sobrepostas (azul), e uma árvore de consenso foi gerada (branco). 50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Identificação, sexo, data e sítios de coleta de espécies do subgênero <i>Evandromyia</i> (<i>Aldamyia</i>) amplificadas nesse estudo e extraídas do GenBank para o gene <i>COI</i>	26
Tabela 2. Identificação, sexo, data e sítios de coleta de espécies do subgênero <i>Evandromyia</i> (<i>Aldamyia</i>) amplificadas nesse estudo para o gene <i>CYTB</i>	30
Tabela 3. Identificação, sexo, data e sítios de coleta de espécies do subgênero <i>Evandromyia</i> (<i>Aldamyia</i>) amplificadas nesse estudo para o gene <i>CAC</i>	31
Tabela 4. Identificação, sexo, data e sítios de coleta de espécies do subgênero <i>Evandromyia</i> (<i>Aldamyia</i>) amplificadas nesse estudo para o gene <i>PER</i>	32
Tabela 5. Identificação, sexo, data e sítios de coleta de espécies do subgênero <i>Evandromyia</i> (<i>Aldamyia</i>) amplificadas nesse estudo para o gene rDNA 28S.	33
Tabela 6. Lista de genes e seus respectivos primers utilizados na amplificação desses fragmentos.	37
Tabela 7. Marcadores utilizados com suas respectivas condições e ciclos de amplificação por PCR. Concentração inicial dos reagentes entre parênteses.....	37
Tabela 8. Distâncias genéticas <i>p</i> intra- e interespecíficas do gene <i>COI</i> de espécies do subgênero <i>Evandromyia</i> (<i>Aldamyia</i>). Valores em negrito correspondem às distâncias intraespecíficas. Valores marcados em vermelho representam as distâncias intra- e interespecíficas das espécies do complexo Evandroi.	45
Tabela 9. Inferência conjunta da árvore e delimitação de espécies dos táxons <i>E. carmelinoi</i> (C), <i>E. evandroi</i> (E) e <i>E. lenti</i> (L). Valores em vermelho indicam cenários com baixo valor de suporte (PP < 0.95).....	51

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABGD	Automatic Barcode Gap Discovery
BCM	Best Close Match
BI	Bayesian inference
BIN	Barcode Index Number
BM	Best Match
BOLD	Barcode of Life Data System
bp	base pair
BPP	Bayesian Phylogenetics and Phylogeography
CAC	cacophony
<i>COI</i>	cytochrome c oxidase subunit I
<i>CYTB</i>	cythochrome b
GMYC	Generalized Mixed Yule-Coalescent
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
MCMC	Markov Monte Carlo Chain
ML	maximum likelihood
MSC	multi-species coalescent
mtDNA	mitochondrial DNA
nDNA	nuclear DNA
OTU	operational taxonomic unit
PCR	polymerase chain reaction
<i>PER</i>	period
PTP	Poisson Tree Processes
rDNA	ribosomal DNA

SUMÁRIO

1. Introdução	13
1.1. Subfamília Phlebotominae	13
1.2. Taxonomia molecular de flebotomíneos	15
1.3. Subgênero <i>Evandromyia</i> (<i>Aldamyia</i>)	18
2. Objetivos.....	24
2.1. Objetivo geral	24
2.2. Objetivos específicos	24
3. Metodologia.....	25
3.1. Coleta, preparação e identificação morfológica dos espécimes.....	25
3.2. Extração de DNA.....	36
3.3. PCR e sequenciamento de DNA	36
3.4. Análise de dados.....	38
3.4.1. Reconstrução filogenética do gene <i>COI</i>	39
3.4.2. Identificação e delimitação de espécies “single-locus”	40
3.4.2. Delimitação de espécies “multilocus”	42
4. Resultados	43
4.1. DNA Barcoding de espécies do subgênero <i>Evandromyia</i> (<i>Aldamyia</i>)	43
4.2. Delimitação de espécies “multilocus” do complexo <i>Evandroi</i>	48
5. Discussão	52
5.1. DNA Barcoding de espécies do subgênero <i>Evandromyia</i> (<i>Aldamyia</i>)	52
5.2. Delimitação de espécies “multilocus” do complexo <i>Evandroi</i>	56
6. Conclusão.....	59
Referências	60

1. Introdução

1.1. Subfamília Phlebotominae

Os flebotomíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) são insetos responsáveis pela transmissão de vários patógenos, como protozoários do gênero *Leishmania*, arbovírus e bactérias do gênero *Bartonella* (MAROLI et al., 2013; READY, 2013; BRAZIL et al., 2015). Regiões mais quentes do globo apresentam uma maior diversidade e riqueza desses insetos, como América Central, América do Sul, África, Oriente Médio e sul da Eurásia. A subfamília Phlebotominae compreende, somente nas Américas, mais de 500 espécies pertencentes a 23 gêneros (SHIMABUKURO et al., 2017).

Os flebotomíneos são insetos de pequeno porte (cerca de 3 mm), no qual a morfologia do adulto alado é bem característica por conta do aspecto hirsuto de seu corpo (Figura 1). Além do grande número de cerdas, os flebotomíneos, ao pousar, deixam suas asas levantadas sobre o corpo em formato de “v”, tornando-os facilmente distinguíveis de outros membros da família Psychodidae. O dimorfismo sexual é perceptível por vezes a olho nu, já que suas respectivas terminálias possuem aspectos muito diferentes (Figura 2). Ambos os sexos se alimentam de soluções açucaradas de plantas e secreção de afídeos, mas as fêmeas também utilizam a hematofagia como fonte nutricional para maturação dos ovos, que são postos principalmente em solo rico de matéria orgânica (KILLICK-KENDRICK, 1999).



Figura 1. Fêmea do flebotomíneo *Phlebotomus papatasi* realizando repasto sanguíneo. Fonte: Centers for Disease Control and Prevention's Public Health Image Library (PHIL), ID: #10275.

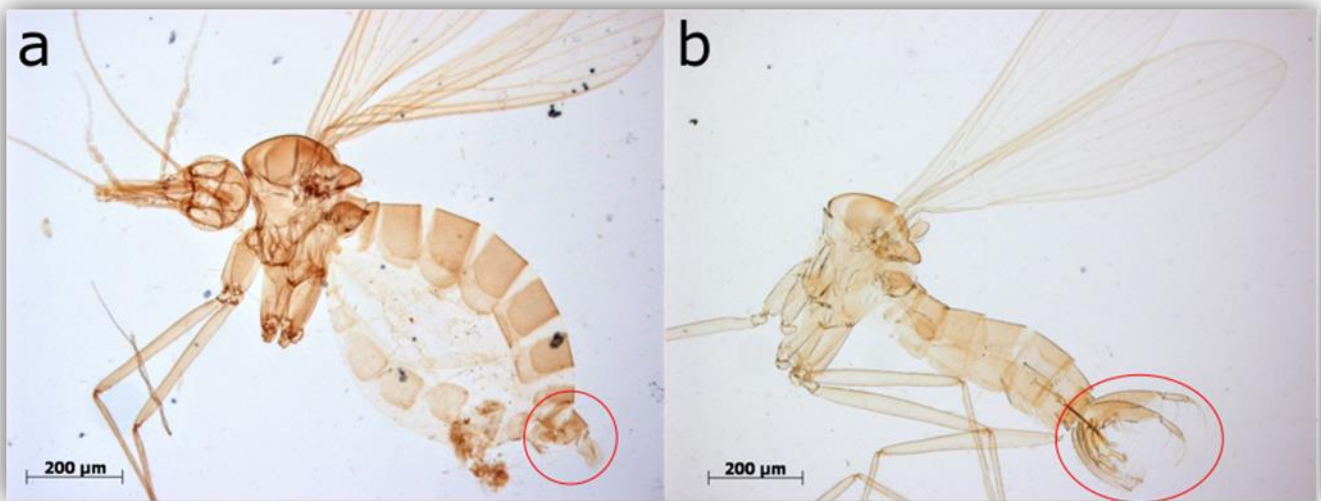


Figura 2. Exemplares de flebotomos fêmea (a) e macho (b) do subgênero *Evandromyia* (*Aldamyia*). Círculos em vermelho destacam o dimorfismo sexual presente na terminália da subfamília Phlebotominae.

Sua capacidade de voo é muito limitada, e várias espécies de flebotomíneos estão restritas a condições ambientais específicas. Essas restrições podem estar relacionadas aos biomas, temperatura, umidade, altitude e a distribuição de hospedeiros específicos. Por exemplo, é sabido que as fêmeas da espécie *Bichromomyia flaviscutellata* (Mangabeira, 1942) possuem grande afinidade por roedores como fontes de repasto sanguíneo e ocupação de criadouros (SHAW & LAINSON 1968), e que *Nyssomyia umbratilis* (Ward & Fraiha, 1977) pode ocupar em grande abundância o dossel de árvores (READY et al., 1986), diferente da maioria dos flebotomíneos.

A complexidade ecológica dos flebotomíneos torna o controle desses insetos um esforço árduo. Do ponto de vista da saúde pública, o entendimento da biologia desses insetos é de grande relevância na prevenção de surtos de doenças como as leishmanioses (BATES et al., 2015), em que a associação de uma espécie vetor com um determinado tipo de ambiente ou hospedeiro, pode ser essencial para o controle dessas enfermidades. Com isso, a identificação de flebotomíneos ao nível de espécie se torna de grande relevância para o entendimento tanto da ecologia desses insetos, quanto das doenças as quais estão associados.

A taxonomia dos flebotomíneos é baseada em caracteres morfológicos, mas apesar de sua importância é por vezes confusa e complexa. Alguns gêneros possuem espécies em

que as fêmeas são isomórficas (e.g. *Brumptomyia*, *Psychodopygus*, *Trichophoromyia*, *Evandromyia*, etc.), nos quais somente os machos são identificados ao nível de espécie. Há também casos em que caracteres de difícil visualização são utilizados para separar espécies (GALATI, 2003; 2018), e um grande número de estruturas utilizadas na identificação morfológica, como antenas e palpos, podem ser facilmente perdidas durante a coleta e/ou preparação dos exemplares. As chaves de identificação morfológica das espécies de flebotomíneos requerem a montagem dos insetos em lâminas para visualização dos caracteres diagnósticos por microscopia ótica (YOUNG & DUNCAN, 1994; GALATI 2003; 2018), tornando o processo lento e dependente da "expertise" do identificador. Estas chaves também desconsideram a possibilidade da ocorrência de espécies crípticas, apesar da grande relevância dos complexos de espécies do ponto de vista da capacidade de transmitir patógenos e entendimento da diversificação dos flebotomíneos e das leishmanioses (MAINGON et al., 2008).

1.2. Taxonomia molecular de flebotomíneos

Todos os fatores supracitados tornam a identificação e delimitação de espécies de flebotomíneos um processo laborioso e, em certos casos, impossível de ser executada ao nível específico. Por conta disso, metodologias integrativas vêm sendo utilizadas na delimitação dessas espécies, como a morfometria (GODOY et al., 2014; 2018) e a biologia molecular (DEPAQUIT, 2014).

Com o intuito de resolver muitos desses problemas taxonômicos, HEBERT et al., (2003) propuseram a utilização de um fragmento do gene *citocromo c oxidase subunidade I (COI)*, que codifica proteínas que participam ativamente na cadeia transportadora de elétrons presente no processo de fosforilação oxidativa da mitocôndria. Um fragmento desse gene, chamado de "barcode region" é amplamente utilizado na taxonomia e sistemática molecular de metazoários por conta da alta taxa de mutações entre espécies ou até mesmo populações de um mesmo táxon (HEBERT et al. 2003). O sequenciamento dessa região e sua análise no Barcode of Life Data Systems (BOLD Systems) (RATNASINGHAM & HEBERT, 2007) permite a identificação de sequências sem a necessidade da identificação morfológica prévia. Isso permite que organismos sejam identificados apenas com alguns

fragmentos do corpo (e.g. pernas de flebotomíneos), a partir de qualquer estágio de vida (e.g. larvas e pupas de flebotomíneos) ou até mesmo de espécies crípticas.

Apesar das notáveis vantagens, esse método possui limitações em grupos de organismos que divergiram muito recentemente (Stoeckle, 2003) e em casos de hibridização acompanhada da introgressão do mtDNA (Pinto et al., 2015). Esses casos específicos devem ser avaliados por meio de estudos comparativos entre a delimitação de espécies por dados morfológicos e moleculares.

Muitos pesquisadores vêm utilizando o marcador usualmente empregado na identificação de animais (gene *COI*) no intuito de validar sua utilidade na identificação de flebotomíneos das regiões Neotropical (AZPURUA et al., 2010; SCARPASSA & ALENCAR, 2013; GUTIÉRREZ et al., 2014; NZELU et al., 2015; PINTO et al., 2015; ROMERO-RICARDO et al., 2016; MEJÍA et al., 2018; RODRIGUES et al., 2018; CARRERO-SARMIENTO & HOYOS-LÓPEZ, 2018; LAURITO et al., 2019), Neártica (FLORIN & TÉLLEZ, 2013; ADENIRAN et al., 2019; LOZANO-SARDANETA et al., 2020), Paleártica (CHASKOPOULOU et al., 2016; DOKIANAKIS et al., 2016; DOKIANAKIS et al., 2018; KASAP et al., 2019), e Oriental (KUMAR et al., 2012; SRINIVASAN et al., 2014; POLSEELA et al., 2016; GAJAPATHY et al., 2016; SUKANTAMALA et al., 2016).

A amplificação e análise desse fragmento permitiu a identificação de diversidade críptica associada a várias espécies, como por exemplo, *Sergentomyia bailyi* (KUMAR et al., 2012), *Lutzomyia longipalpis* (RODRIGUES et al., 2018), *S. barraudi* (POLSEELA et al., 2016), *Evandromyia edwardsi* (PINTO et al., 2015), etc. Essa identificação de diversidade molecular pode ser realizada por meio de vários métodos, sendo o mais robusto a identificação por meio de algoritmos que organizem as sequências em clusters denominados “operational taxonomic units (OTUs)” de acordo com sua similaridade genética (PINTO et al., 2015; POLSEELA et al., 2016; RODRIGUES et al., 2018). Apesar disso, a simples formação de “clusters” independentes em árvores de “neighbor-joining” e/ou que excedem o limite de 3% de distância genética intraespecífica proposto por HEBERT et al., (2003), podem ser interpretados como a presença de diversidade críptica em uma espécie (GUTIÉRREZ et al., 2014), tendo em vista que essa delimitação, pelo menos para flebotomíneos, é feita de forma arbitrária e não padronizada. Esses achados de diversidade críptica por dados moleculares devem ser analisados com cautela, e sempre que possível serem corroborados pela morfologia, como por exemplo, o complexo *S. bailyi*, descrito inicialmente pelo DNA

Barcoding (KUMAR et al., 2012) e posteriormente pela taxonomia clássica (e.g. YOGESWARI & SRINIVASAN, 2016).

Além de espécies crípticas, a taxonomia molecular de flebotomíneos vem se mostrando promissora na associação de machos com fêmeas de espécies isomórficas (SRINIVASAN et al., 2014; NZELU et al., 2015; PINTO et al., 2015; RODRIGUES et al., 2018), bem como sequências de estágios imaturos com as de adultos identificados morfologicamente (VIVERO et al., 2017).

Tendo em vista esses estudos e o progresso da taxonomia molecular de flebotomíneos, atualmente estão depositadas “barcodes” de 7,110 indivíduos de 338 espécies de flebotomíneos no BOLD Systems (última checagem em 16/03/2020). Desses, 2,466 sequências de 250 espécies estão com acesso público. Para o gênero *Evandromyia*, somente nove das 46 espécies possuem sequências depositadas.

Aliado ao gene *COI*, outros marcadores moleculares podem ser utilizados na taxonomia, sistemática e genética de populações de flebotomíneos. Um fragmento de outro gene do mtDNA, *citocromo b (CYTB)*, também responsável pela regulação de elétrons na mitocôndria, é utilizado na descoberta de estruturação de populações de flebotomíneos (HAMARSHEH et al. 2007; COHNSTAEDT et al. 2012; PECH-MAY et al. 2013), ou até mesmo como marcador alternativo para delimitação de espécies por meio do DNA Barcoding (KRÜGER et al. 2011).

Apesar disso, a ineficácia do mtDNA em estudos de diversidade molecular podem acontecer devido a eventos de introgressão e/ou separação incompleta das linhagens. A infecção de bactérias endossimbiontes (e.g. gênero *Wolbachia*), podem confundir os padrões de variação do mtDNA, levando a interpretações errôneas de dados moleculares destinados a taxonomia (WHITWORTH et al. 2007; GALTIER et al. 2009; KODANDARAMAIAH et al. 2013). Por conta disso, outros marcadores do DNA nuclear (nDNA) podem ser utilizados no estudo de flebotomíneos.

O gene do nDNA *cacophony (CAC)* está diretamente relacionado aos sons de cópula da mosca *Drosophila melanogaster* (PEIXOTO & HALL, 1998), e pode ser utilizado na sistemática de insetos, bem como no estudo de processos de especiação (LINS et al. 2002). PEIXOTO et al. (2001) isolaram um gene homólogo ao *CAC* de *Drosophila* para o flebotomo *L. longipalpis*, que compreende uma região de íntron variável utilizada na sistemática de Phlebotominae (LINS et al. 2002; BOTTECCHIA et al. 2004; GRACE-LEMA et al. 2015).

Semelhante a isso, o gene *period* (*PER*) está relacionado aos sons de copula de insetos, e também possui conexão com o comportamento desse grupo por meio do ritmo circadiano (KONOPKA & BENZER, 1971). Um homólogo desse gene, também isolado em flebotomíneos por PEIXOTO et al. (2001), é utilizado no estudo da sistemática (MAZZONI et al. 2002) e genética de populações (BAUZER et al. 2002; COSTA et al. 2015) desses insetos.

Por outro lado, o DNA ribossomal (rDNA) possui regiões que codificam a produção de RNA ribossomal (rRNA), que junto de outras proteínas formam os ribossomos, moléculas responsáveis pela tradução de RNAm em cadeias polipeptídicas. Dada a natureza do marcador, os genes do rDNA possuem dinâmica evolutiva diferenciada daqueles que produzem proteínas, tendo regiões com taxas de mutação variada. Um desses genes, o 28S, pode ser utilizado em estudos de eventos recentes de filogenias (HILLIS & DIXON, 1991), incluindo os flebotomíneos (BEATI et al. 2014).

1.3. Subgênero *Evandromyia* (*Aldamyia*)

O gênero *Evandromyia* foi inicialmente descrito como um subgênero de *Flebotomus*¹ (sic) por MANGABEIRA (1941), que agrupou as espécies *Flebotomus* (*Evandromyia*) *bourrouli*² Barretto & Coutinho, 1941, *F. (E.) brachiphallus* Mangabeira, 1941 e *F. (E.) infraspinosus* Mangabeira, 1941 por conta dos caracteres (i) gonocoxito com tufo de cerdas, (ii) gonóstilo com quatro espinhos, (iii) presença de cerda espiniforme pré-apical e (iv) presença de cerdas não caducas no ápice do lobo epandrial e (v) lobo epandrial maior que o gonocoxito

BARRETTO (1962) reconhece *Evandromyia* como um subgênero de *Lutzomyia* França, 1924. Para esse agrupamento são utilizados os caracteres: (i) tufo de cerdas na região basal do gonocoxito, (ii) gonóstilo com quatro espinhos, (iii) presença de cerda espiniforme pré-apical no gonóstilo, (iv) lobo epandrial maior ou igual ao comprimento do gonocoxito, (v) cibário com quatro dentes posteriores e (vi) arco esclerotizado completo. Na classificação de THEODOR (1965) *Evandromyia* é incluído como subgênero de *Lutzomyia* e os caracteres (i)

¹Por meio da opinião 256 da ICZN (1950) fica alterado o gênero citado em sua grafia correta *Phlebotomus* Rondani, 1840.

²Para preservar as alterações históricas da nomenclatura, os nomes foram mantidos assim como postos em suas respectivas classificações.

ausência de cerdas no tergito 8 e (ii) ápice do lobo epandrial afilado para esse grupo, são adicionados aos já descritos em BARRETTO (1962).

Após cinco décadas da descrição inicial, GALATI (1995)³ elevou esse e outros subgêneros de flebotomíneos ao nível genérico com sua classificação que leva em conta a filogenia desse grupo. Para isso, utilizou dos seguintes caracteres para discriminar o gênero *Evandromyia*: (i) gonocoxito com tufo de setas compactas na região basal, (ii) gonocoxito com ausência de franja de cerdas na face dorsal interna, (iii) lobo epandrial de ápice afilado e (iv) relação do comprimento entre clipeo/cabeça maior que $\frac{1}{3}$.

Em duas revisões posteriores (GALATI, 2003; 2018) foram incluídas novas séries e subgêneros para *Evandromyia*. Atualmente esse gênero possui 46 espécies descritas, distribuídas nos subgêneros (*Aldamyia*) Galati, 2003, (*Evandromyia*) sensu stricto (Mangabeira, 1941) (séries Infraspinosa, Saulensis e Rupicola) e (*Barrettomyia*) Martins & Silva, 1968 (séries Monstruosa, Tupynambai e Cortelezzii).

O subgênero *Evandromyia* (*Aldamyia*), também descrito por GALATI (2003; 2018), possui 15 espécies formalmente descritas por caracteres morfológicos, além de *E. (A.)* sp. de Baduel, uma espécie cujo nome não atende o princípio de nomenclatura binomial (artigos 5.1 e 11.4, ICZN), (SHIMABUKURO et al., 2017). Todas possuem registros de ocorrência no Brasil, com exceção de *E. hashiguchii* León, Teran, Neira & Le Pont, 2009 que foi registrada somente no Equador (SHIMABUKURO et al., 2017). Os caracteres utilizados para delimitação desse subgênero são (i) presença de papilas terciais com bordos proeminentes, (ii) cibário com dentes anteriores lateralizados e (iii) espermatecas em formato de maçã (com exceção de *E. termitophila*).

Alguns grupos de pesquisa ainda utilizam classificações e chaves de identificação antigas (e.g. YOUNG & DUNCAN, 1994) que incluem *Evandromyia* como apenas um subgênero de *Lutzomyia*. Para nosso estudo, adotamos a classificação de GALATI (1995; 2003; 2018) e assumiremos *Evandromyia* como um gênero pertencente à subtribo Lutzomyiina.

Apesar da grande semelhança de caracteres morfológicos entre algumas espécies, todas podem ser delimitadas pela taxonomia clássica (GALATI, 2003). Entretanto, algumas

³ De acordo com as normas da ICZN essa classificação não possui validade, pois não especifica e demonstra os caracteres diagnósticos para separar as espécies analisadas. Sendo assim, os táxons descritos passam a ter validade em Galati (2003), no qual é elaborada uma chave taxonômica para distinção dos táxons estudados.

espécies como *E. lenti*, *E. evandroi* e *E. carmelinoi* são indistinguíveis pelo DNA Barcoding (PINTO et al., 2015; RODRIGUES et al., 2018) (Figura 3). Essas três espécies possuem distribuição simpátrica na maioria dos estados brasileiros (Figura 4), e são morfológicamente muito próximas, mas apesar disso, suas diferenças morfológicas são nítidas e facilmente visualizadas em estruturas como o formato da espermateca nas fêmeas (Figura 4), o parâmero e o ápice do duto edeagal da terminália dos machos (Figura 5) (GALATI, 2003; 2018). A discordância visualizada entre as identificações molecular e morfológica dentro desse grupo levanta questões sobre possíveis eventos de hibridização e introgressão do genoma mitocondrial entre essas espécies, levando ao decréscimo da variabilidade genética. Nesse sentido, eventos de introgressão têm sido encontrados em outros gêneros de flebotomíneos (PESSON et al., 2004; MAZZONI et al., 2006; 2008).

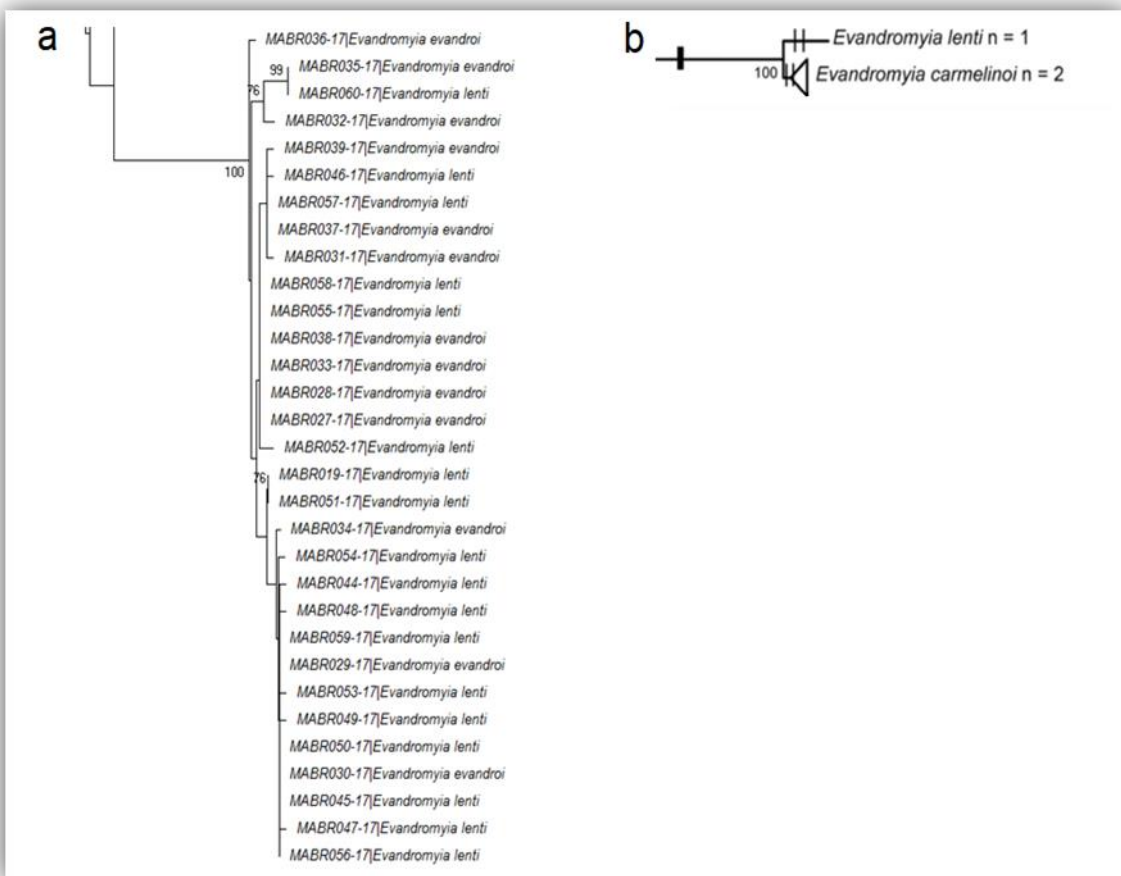


Figura 3. Árvores neighbor-joining de sequências do gene *COI* para flebotomíneos das espécies *E. lenti*, *E. evandroi* e *E. carmelinoi*. (a) Recorte da árvore obtida e adaptada de RODRIGUES et al., (2018) (b) recorte da árvore obtida e adaptada de PINTO et al., (2015).

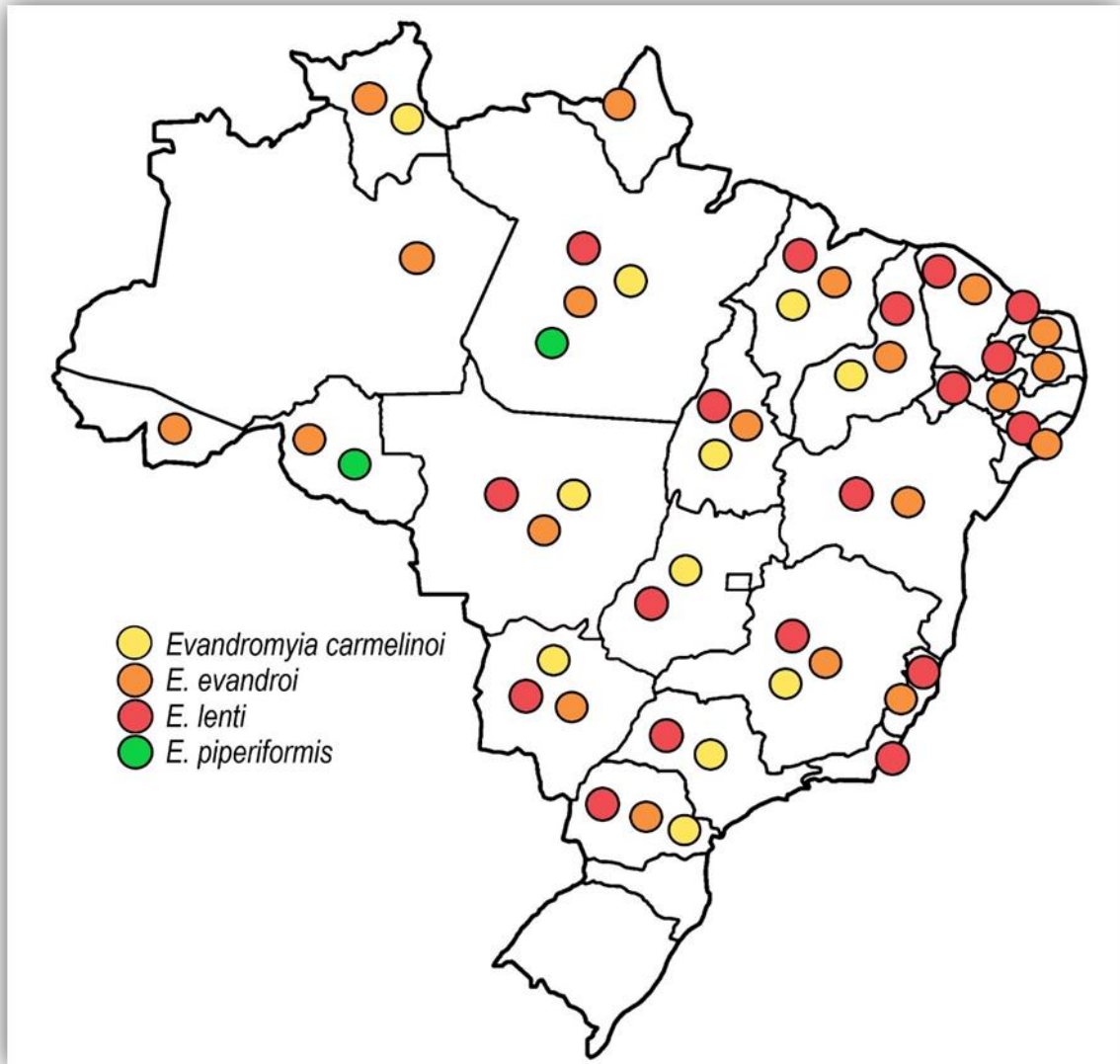


Figura 4. Mapa do Brasil mostrando a distribuição geográfica das espécies *Evandromyia carmelinoi*, *E. evandroi*, *E. lenti* e *E. piperiformis* de acordo com os estados brasileiros.

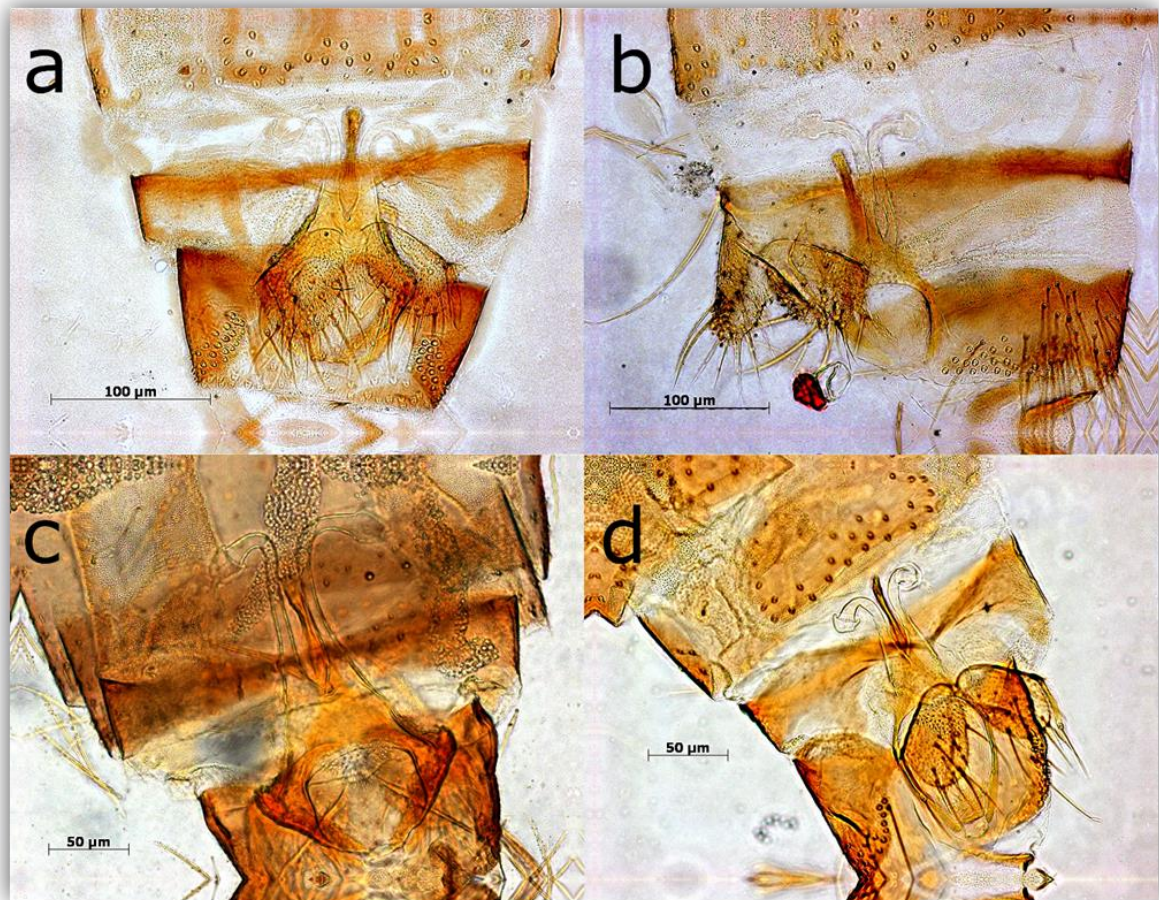


Figura 5. Fotografias de microscopia ótica dos últimos segmentos abdominais de fêmeas do subgênero *Evandromyia* (*Aldamyia*), com ênfase no formato das espermatecas de (a) *E. carmelinoi*, (b) *E. evandroi*, (c) *E. lenti* e (d) *E. piperiformis*.

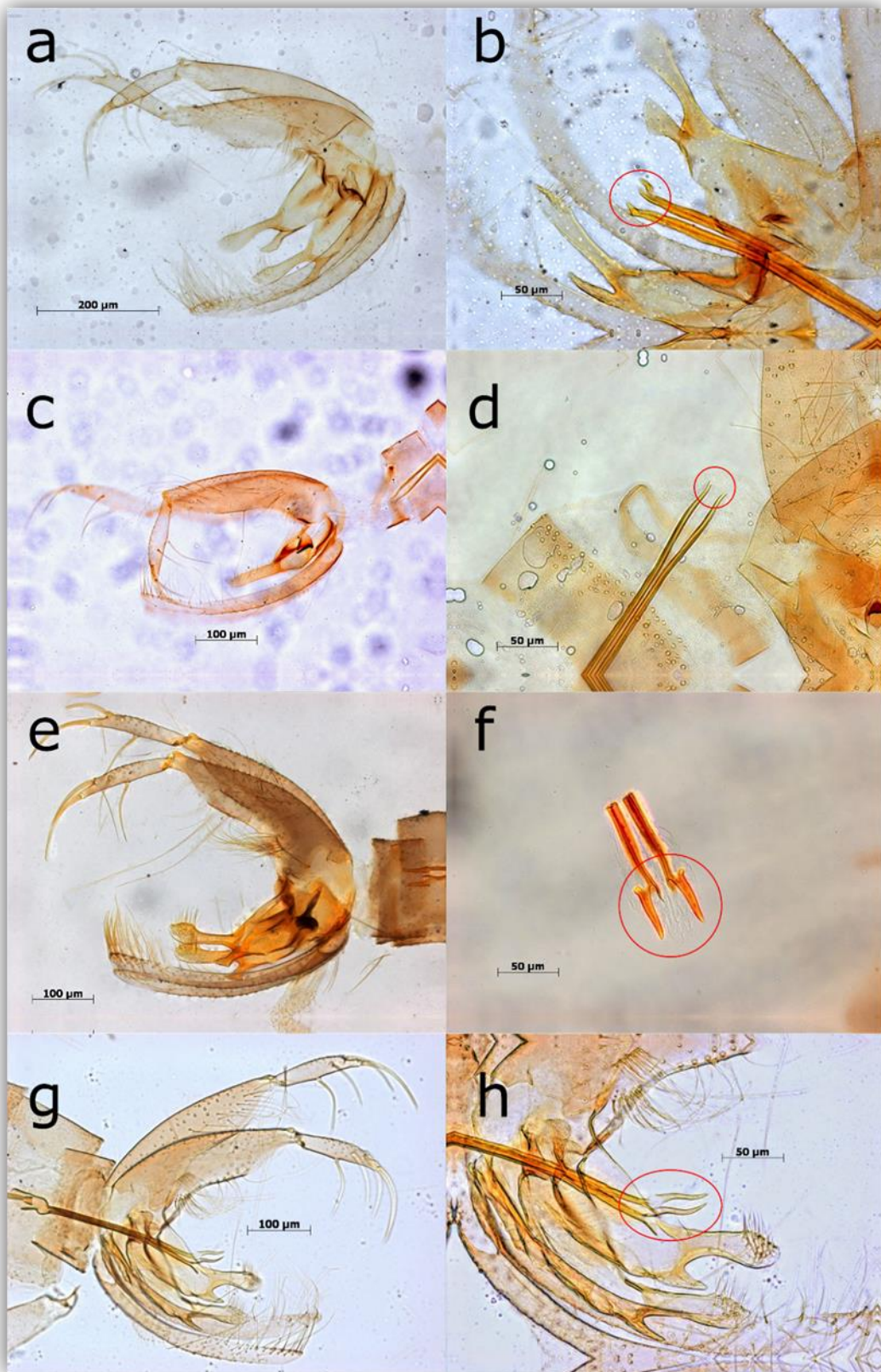


Figura 6. Fotografias de microscopia ótica da terminália de machos do subgênero *Evandromyia* (*Aldamyia*), demonstrando aspectos gerais (à esquerda), e o ápice dos dutos eedeagais (à direita circulado em vermelho) de (a,b) *E. carmelinoi*, (c,d) *E. evandroi*, (e,f) *E. lenti* e (g,h) *E. piperiformis*.

A correta identificação molecular das espécies desse subgênero pode ser de grande relevância para a saúde pública e entendimento da epidemiologia das leishmanioses. O papel dos flebotomíneos do subgênero *Evandromyia* (*Aldamyia*) na transmissão de *Leishmania* é pouco estudado, e foi geralmente descontinuado por conta de um único estudo que demonstrou que *E. lenti* é refratária a infecção por *L. amazonensis* (BRAZIL et al., 1997), bem como experimentos não publicados que declaram que *E. carmelinoi* não pode ser infectada experimentalmente por uma série de leishmânias não especificadas (RYAN et al., 1986). Entretanto, na natureza, espécies de *Evandromyia* são sabidamente associadas a tatus (Dasypodidae) (AGUIAR & VIEIRA, 2018), que são reservatórios comprovados de diversas espécies de *Leishmania* no Novo Mundo (LAINSON et al., 1979; LAINSON et al., 1981; LAINSON & SHAW, 1989). Consequentemente, o subgênero *Evandromyia* (*Aldamyia*) pode estar associado ao ciclo silvestre da transmissão de *Leishmania*. Além disso, a presença de DNA, bem como de flagelados de *L. infantum* foi reportada em *E. evandroi*, *E. lenti* e *E. termitophila* coletada em ambientes peridomésticos de localidades endêmicas para leishmanioses no Brasil (SHERLOCK, 1996; RÊGO et al., 2015; FONTELES et al., 2018; LOPES et al., 2019), sugerindo a participação desses insetos na transmissão de patógenos nessas áreas.

Tendo em vista o interesse desses insetos para a saúde pública, a delimitação correta é de grande relevância. Para isso, a utilização de marcadores suplementares ao *COI*, bem como a avaliação de diferentes métodos de delimitação de espécies, devem ser utilizados para ajudar a elucidar o real status taxonômico do subgênero *Evandromyia* (*Aldamyia*).

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

- ✓ Avaliar a utilização de marcadores moleculares na delimitação de espécies do subgênero *Evandromyia* (*Aldamyia*).

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Avaliar sequências do gene *COI* (DNA Barcoding) na identificação de espécies do subgênero *Evandromyia* (*Aldamyia*);

- ✓ Avaliar o uso de marcadores moleculares suplementares para taxonomia de espécies indistinguíveis pelo *COI* (mtDNA);
- ✓ Utilizar e avaliar algoritmos de identificação e delimitação de espécies baseado em métodos diferentes.

3. Metodologia

3.1. Coleta, preparação e identificação morfológica dos espécimes

Os flebotomíneos utilizados nesse trabalho são provenientes de 11 localidades distribuídas em oito estados do Brasil, incluindo coletas previamente realizadas no Parque Nacional de Ubajara – Ceará, Reserva Florestal Alfonso Ducke – Amazonas, e nas margens do rio Teles Pires – Pará/Mato Grosso. Além disso, novas coletas foram feitas nos municípios de Barreirinhas – Maranhão, Porto Nacional – Tocantis, Lassance – Minas Gerais e Parque Nacional do Viruá – Roraima (Tabela 1, 2, 3, 4, 5 e Figura 6). Todas as campanhas foram executadas com armadilhas luminosas do tipo CDC, que foram colocadas em mata ou peridomicílio de habitações humanas (Figura 7). Em cada sítio de coleta as armadilhas funcionaram durante dois dias consecutivos, sendo instaladas às 17 h do primeiro dia e retiradas aproximadamente às 9 h do último dia. Os insetos coletados foram armazenados em álcool 70% a -20 °C, que foram posteriormente triados em Lupa Stemi DV4, Zeiss®.

Tabela 1. Identificação, sexo, data e sítios de coleta de espécies do subgênero *Evandromyia* (*Aldamyia*) amplificadas nesse estudo e extraídas do GenBank para o gene *COI*.

Nº de acesso GenBank	ID da amostra	Voucher coleção	Espécie	Sexo	Estado	Município	Localidade	Data de coleta	Referência
MN181527	AN 329 B16 14/9	91654	<i>E. andersoni</i>	F	Amazonas	Manaus	Reserva Florestal Adolpho Ducke	ix.12	Esse estudo
MN181526	AN PAR 1	91679a	<i>E. andersoni</i>	M	Ceará	Ubajara	Parque Nacional de Ubajara	xi.17	Esse estudo
MN548338	AN PAR 2	91679b	<i>E. andersoni</i>	M	Ceará	Ubajara	Parque Nacional de Ubajara	xi.17	Esse estudo
MN181529	BA LAB 10	91665	<i>E. bacula</i>	F	Amazonas	Lábrea	Terra Indígena Caititu	ii.12	Esse estudo
MN181531	BA LAB 12	91667	<i>E. bacula</i>	F	Amazonas	Lábrea	Terra Indígena Caititu	ii.12	Esse estudo
MN181532	BA LAB 7	91670	<i>E. bacula</i>	F	Amazonas	Lábrea	Terra Indígena Caititu	ii.12	Esse estudo
MN181528	BA LAB 8	91671	<i>E. bacula</i>	F	Amazonas	Lábrea	Terra Indígena Caititu	ii.12	Esse estudo
MN181530	BA LAB 9	91672	<i>E. bacula</i>	F	Amazonas	Lábrea	Terra Indígena Caititu	ii.12	Esse estudo
MN181534	CA PN 12	91684f	<i>E. carmelinoi</i>	F	Tocantins	Porto Nacional	Peridomicílio	ii.19	Esse estudo
MN181535	CA PN 15	91685a	<i>E. carmelinoi</i>	M	Tocantins	Porto Nacional	Peridomicílio	ii.19	Esse estudo
MN181536	CA PN 17	91685b	<i>E. carmelinoi</i>	M	Tocantins	Porto Nacional	Peridomicílio	ii.19	Esse estudo
MN181537	CA PN 18	91685c	<i>E. carmelinoi</i>	M	Tocantins	Porto Nacional	Peridomicílio	ii.19	Esse estudo
MN181538	CA PN 5	91686b	<i>E. carmelinoi</i>	M	Tocantins	Porto Nacional	Peridomicílio	ii.19	Esse estudo
MN181539	CA PN 7	91684a	<i>E. carmelinoi</i>	M	Tocantins	Porto Nacional	Peridomicílio	ii.19	Esse estudo
MN181533	CA PN 9	91684c	<i>E. carmelinoi</i>	M	Tocantins	Porto Nacional	Peridomicílio	ii.19	Esse estudo
MN181540	EV BAR 46	91661b	<i>E. evandroi</i>	M	Maranhão	Barreirinhas	Peridomicílio	i.18	Esse estudo
MN181541	EV LAS 10	91674	<i>E. evandroi</i>	M	Minas Gerais	Lassance	Peridomicílio	ix.18	Esse estudo
MN181542	EV LAS 18	91675	<i>E. evandroi</i>	M	Minas Gerais	Lassance	Peridomicílio	ix.18	Esse estudo
MN181543	EV LAS 2	91667a	<i>E. evandroi</i>	F	Minas Gerais	Lassance	Peridomicílio	ix.18	Esse estudo
MN181544	EV LAS 20	91676	<i>E. evandroi</i>	M	Minas Gerais	Lassance	Peridomicílio	ix.18	Esse estudo
MN181545	EV LAS 4	91667b	<i>E. evandroi</i>	F	Minas Gerais	Lassance	Peridomicílio	ix.18	Esse estudo
MN181553	LE BAR 26	91658	<i>E. lenti</i>	M	Maranhão	Barreirinhas	Peridomicílio	i.18	Esse estudo

MN181552	LE LAS 29	91678b	<i>E. lenti</i>	M	Minas Gerais	Lassance	Peridomicílio	ix.18	Esse estudo
MN181546	LE LAS 6	91667c	<i>E. lenti</i>	M	Minas Gerais	Lassance	Peridomicílio	ix.18	Esse estudo
MN181551	LE PAR 52	91682b	<i>E. lenti</i>	F	Ceará	Ubajara	Parque Nacional de Ubajara	xi.17	Esse estudo
MN181550	LE PAR 53	91682c	<i>E. lenti</i>	M	Ceará	Ubajara	Parque Nacional de Ubajara	xi.17	Esse estudo
MN181549	LE PN 10	91684d	<i>E. lenti</i>	F	Tocantins	Porto Nacional	Porto Nacional	ii.19	Esse estudo
MN181548	LE PN 4	91686a	<i>E. lenti</i>	F	Tocantins	Porto Nacional	Porto Nacional	ii.19	Esse estudo
MN181547	LE PN 8	91684b	<i>E. lenti</i>	M	Tocantins	Porto Nacional	Porto Nacional	ii.19	Esse estudo
MN181554	PI FF 1	91644a	<i>E. piperiformis</i>	M	Pará	Jacareacanga	Fazenda Fortuna	i.17	Esse estudo
MN181555	PI MT 295	N/A	<i>E. piperiformis</i>	M	Pará	Jacareacanga	Fazenda Fortuna	x.16	Esse estudo
MN181556	PI MT 297	N/A	<i>E. piperiformis</i>	M	Pará	Jacareacanga	Fazenda Fortuna	x.16	Esse estudo
MN181525	SP1 B4 14/9	91657	<i>E. williamsi</i>	F	Amazonas	Manaus	Reserva Florestal Adolpho Ducke	ix.12	Esse estudo
MN181557	TE LABR 400	91673	<i>E. termitophila</i>	F	Amazonas	Lábrea	Ramal Remansinho	iv.13	Esse estudo
MN181558	TE S622	N/A	<i>E. termitophila</i>	F	Minas Gerais	Lagoa Santa	Parque Estadual do Sumidouro	2013	Esse estudo
MN181559	TE S704	N/A	<i>E. termitophila</i>	F	Minas Gerais	Lagoa Santa	Parque Estadual do Sumidouro	2013	Esse estudo
MN181564	WA 1B	N/A	<i>E. walkeri</i>	F	Amazonas	Lábrea	Reserva Florestal Adolpho Ducke	ix.12	Esse estudo
MN181561	WA 6-13 22-23	91655	<i>E. walkeri</i>	F	Amazonas	Lábrea	Terra Indígena Caititu	ii.12	Esse estudo
MN181563	WA 9-1 22/23	91656	<i>E. walkeri</i>	F	Amazonas	Lábrea	Terra Indígena Caititu	ii.12	Esse estudo
MN181562	WA LAB 11	91666	<i>E. walkeri</i>	F	Amazonas	Lábrea	Terra Indígena Caititu	ii.12	Esse estudo
MN181560	WA LAB 13	91668	<i>E. walkeri</i>	F	Amazonas	Lábrea	Terra Indígena Caititu	ii.12	Esse estudo
MN181565	WA LAB 14	91669	<i>E. walkeri</i>	F	Amazonas	Lábrea	Terra Indígena Caititu	ii.12	Esse estudo
MN548339	BD VIR 126	91690	<i>E. sp. de Baduel</i>	F	Roraima	Caracaráí	Parque Nacional do Viruá	viii.19	Esse estudo
KP112534.1	LBMI#0398	90766	<i>E. carmelinoi</i>	F	Mato Grosso	Cáceres	Laranjeiras	N/A	PINTO et al., 2015
KP112535.1	LBMI#0400	90768	<i>E. carmelinoi</i>	F	Mato Grosso	Cáceres	Laranjeiras	N/A	PINTO et al., 2015
MG234310.1	N/A	N/A	<i>E. evandroi</i>	N/A	Maranhão	Barreirinhas	N/A	N/A	RODRIGUES et al., 2018

MG234311.1	N/A	N/A	<i>E. evandroi</i>	N/A	Maranhão	Barreirinhas	N/A	N/A	RODRIGUES et al., 2018
MG234312.1	N/A	N/A	<i>E. evandroi</i>	N/A	Maranhão	Barreirinhas	N/A	N/A	RODRIGUES et al., 2018
MG234313.1	N/A	N/A	<i>E. evandroi</i>	N/A	Maranhão	Barreirinhas	N/A	N/A	RODRIGUES et al., 2018
MG234314.1	N/A	N/A	<i>E. evandroi</i>	N/A	Maranhão	Barreirinhas	N/A	N/A	RODRIGUES et al., 2018
MG234315.1	N/A	N/A	<i>E. evandroi</i>	N/A	Maranhão	Barreirinhas	N/A	N/A	RODRIGUES et al., 2018
MG234316.1	N/A	N/A	<i>E. evandroi</i>	N/A	Maranhão	Barreirinhas	N/A	N/A	RODRIGUES et al., 2018
MG234317.1	N/A	N/A	<i>E. evandroi</i>	N/A	Maranhão	Barreirinhas	N/A	N/A	RODRIGUES et al., 2018
MG234318.1	N/A	N/A	<i>E. evandroi</i>	N/A	Maranhão	Barreirinhas	N/A	N/A	RODRIGUES et al., 2018
MG234319.1	N/A	N/A	<i>E. evandroi</i>	N/A	Maranhão	Barreirinhas	N/A	N/A	RODRIGUES et al., 2018
MG234320.1	N/A	N/A	<i>E. evandroi</i>	N/A	Maranhão	Barreirinhas	N/A	N/A	RODRIGUES et al., 2018
MG234321.1	N/A	N/A	<i>E. evandroi</i>	N/A	Maranhão	Barreirinhas	N/A	N/A	RODRIGUES et al., 2018
MG234322.1	N/A	N/A	<i>E. evandroi</i>	N/A	Maranhão	Barreirinhas	N/A	N/A	RODRIGUES et al., 2018
KP112548.1	LBMI#0026	90189	<i>E. lenti</i>	M	Espírito Santo	Pancas	N/A	x.10	PINTO et al., 2015
MG234327.1	N/A	N/A	<i>E. lenti</i>	N/A	Maranhão	Barreirinhas	N/A	N/A	RODRIGUES et al., 2018
MG234328.1	N/A	N/A	<i>E. lenti</i>	N/A	Maranhão	Barreirinhas	N/A	N/A	RODRIGUES et al., 2018
MG234329.1	N/A	N/A	<i>E. lenti</i>	N/A	Maranhão	Barreirinhas	N/A	N/A	RODRIGUES et al., 2018
MG234330.1	N/A	N/A	<i>E. lenti</i>	N/A	Maranhão	Barreirinhas	N/A	N/A	RODRIGUES et al., 2018
MG234331.1	N/A	N/A	<i>E. lenti</i>	N/A	Maranhão	Barreirinhas	N/A	N/A	RODRIGUES et al., 2018
MG234332.1	N/A	N/A	<i>E. lenti</i>	N/A	Maranhão	Barreirinhas	N/A	N/A	RODRIGUES et al., 2018
MG234333.1	N/A	N/A	<i>E. lenti</i>	N/A	Maranhão	Barreirinhas	N/A	N/A	RODRIGUES et al., 2018
MG234334.1	N/A	N/A	<i>E. lenti</i>	N/A	Maranhão	Barreirinhas	N/A	N/A	RODRIGUES et al., 2018
MG234335.1	N/A	N/A	<i>E. lenti</i>	N/A	Maranhão	Barreirinhas	N/A	N/A	RODRIGUES et al., 2018
MG234336.1	N/A	N/A	<i>E. lenti</i>	N/A	Maranhão	Barreirinhas	N/A	N/A	RODRIGUES et al., 2018
MG234337.1	N/A	N/A	<i>E. lenti</i>	N/A	Maranhão	Barreirinhas	N/A	N/A	RODRIGUES et al., 2018
MG234338.1	N/A	N/A	<i>E. lenti</i>	N/A	Maranhão	Barreirinhas	N/A	N/A	RODRIGUES et al., 2018
MG234339.1	N/A	N/A	<i>E. lenti</i>	N/A	Maranhão	Barreirinhas	N/A	N/A	RODRIGUES et al., 2018
MG234340.1	N/A	N/A	<i>E. lenti</i>	N/A	Maranhão	Barreirinhas	N/A	N/A	RODRIGUES et al., 2018
MG234341.1	N/A	N/A	<i>E. lenti</i>	N/A	Maranhão	Barreirinhas	N/A	N/A	RODRIGUES et al., 2018

MG234342.1	N/A	N/A	<i>E. lenti</i>	N/A	Maranhão	Barreirinhas	N/A	N/A	RODRIGUES et al., 2018
MG234343.1	N/A	N/A	<i>E. lenti</i>	N/A	Maranhão	Barreirinhas	N/A	N/A	RODRIGUES et al., 2018
MG234344.1	N/A	N/A	<i>E. lenti</i>	N/A	Maranhão	Barreirinhas	N/A	N/A	RODRIGUES et al., 2018
KP112560.1	LBMI#0401	90769	<i>E. termitophila</i>	F	Mato Grosso	Cáceres	Laranjeiras	xii.12	PINTO et al., 2015
KP112561.1	LBMI#0396	90764	<i>E. termitophila</i>	F	Mato Grosso	Cáceres	Laranjeiras	xii.12	PINTO et al., 2015
MG234345.1	N/A	N/A	<i>E. termitophila</i>	N/A	Maranhão	Barreirinhas	N/A	N/A	RODRIGUES et al., 2018
MG234346.1	N/A	N/A	<i>E. termitophila</i>	N/A	Maranhão	Itinga	N/A	N/A	RODRIGUES et al., 2018
MG234347.1	N/A	N/A	<i>E. termitophila</i>	N/A	Maranhão	Barreirinhas	N/A	N/A	RODRIGUES et al., 2018
MG234348.1	N/A	N/A	<i>E. termitophila</i>	N/A	Maranhão	Barreirinhas	N/A	N/A	RODRIGUES et al., 2018
FJ437285.1	N/A	N/A	<i>E. walkeri</i>	M	Huíla (Colombia)	N/A	N/A	N/A	COHNSTAEDT et al., 2011
FJ437286.1	N/A	N/A	<i>E. walkeri</i>	M	Huíla (Colombia)	N/A	N/A	N/A	COHNSTAEDT et al., 2011
KC921317.1	N/A	N/A	<i>E. walkeri</i>	N/A	Caldas (Colombia)	N/A	N/A	N/A	CONTRERAS GUTIERREZ et al., 2014
KC921318.1	N/A	N/A	<i>E. walkeri</i>	N/A	Caldas (Colombia)	N/A	N/A	N/A	CONTRERAS GUTIERREZ et al., 2014

Tabela 2. Identificação, sexo, data e sítios de coleta de espécies do subgênero *Evandromyia* (*Aldamyia*) amplificadas nesse estudo para o gene *CYTB*.

ID da amostra	Espécie	Sexo	Estado	Município	Localidade	Data de coleta
CA PN 12	<i>E. carmelinoi</i>	F	Tocantins	Porto Nacional	Peridomicílio	ii.19
CA PN 15	<i>E. carmelinoi</i>	M	Tocantins	Porto Nacional	Peridomicílio	ii.19
CA PN 5	<i>E. carmelinoi</i>	M	Tocantins	Porto Nacional	Peridomicílio	ii.19
CA PN 9	<i>E. carmelinoi</i>	M	Tocantins	Porto Nacional	Peridomicílio	ii.19
EV BAR 36	<i>E. evandroi</i>	M	Maranhão	Barreirinhas	Peridomicílio	i.18
EV BAR 40	<i>E. evandroi</i>	M	Maranhão	Barreirinhas	Peridomicílio	i.18
EV BAR 44	<i>E. evandroi</i>	M	Maranhão	Barreirinhas	Peridomicílio	i.18
EV LAS 10	<i>E. evandroi</i>	M	Minas Gerais	Lassance	Peridomicílio	ix.18
EV LAS 2	<i>E. evandroi</i>	F	Minas Gerais	Lassance	Peridomicílio	ix.18
EV LAS 20	<i>E. evandroi</i>	M	Minas Gerais	Lassance	Peridomicílio	ix.18
EV LAS 5	<i>E. evandroi</i>	M	Minas Gerais	Lassance	Peridomicílio	ix.18
LE BAR 51	<i>E. lenti</i>	M	Maranhão	Barreirinhas	Peridomicílio	i.18
LE BAR 7	<i>E. lenti</i>	M	Maranhão	Barreirinhas	Peridomicílio	i.18
LE LAS 26	<i>E. lenti</i>	F	Minas Gerais	Lassance	Peridomicílio	ix.18
LE LAS 29	<i>E. lenti</i>	M	Minas Gerais	Lassance	Peridomicílio	ix.18
LE LAS 6	<i>E. lenti</i>	M	Minas Gerais	Lassance	Peridomicílio	ix.18
LE PAR 23	<i>E. lenti</i>	F	Ceará	Ubajara	Parque Nacional de Ubajara	xi.17
LE PAR 26	<i>E. lenti</i>	M	Ceará	Ubajara	Parque Nacional de Ubajara	xi.17
LE PN 8	<i>E. lenti</i>	M	Tocantins	Porto Nacional	Peridomicílio	ii.19

Tabela 3. Identificação, sexo, data e sítios de coleta de espécies do subgênero *Evandromyia* (*Aldamyia*) amplificadas nesse estudo para o gene CAC.

ID da amostra	Espécie	Sexo	Estado	Município	Localidade	Data de coleta
CA PN 12	<i>E. carmelinoi</i>	F	Tocantins	Porto Nacional	Peridomicílio	ii.19
CA PN 15	<i>E. carmelinoi</i>	M	Tocantins	Porto Nacional	Peridomicílio	ii.19
CA PN 5	<i>E. carmelinoi</i>	M	Tocantins	Porto Nacional	Peridomicílio	ii.19
CA PN 9	<i>E. carmelinoi</i>	M	Tocantins	Porto Nacional	Peridomicílio	ii.19
EV BAR 36	<i>E. evandroi</i>	M	Maranhão	Barreirinhas	Peridomicílio	i.18
EV BAR 44	<i>E. evandroi</i>	M	Maranhão	Barreirinhas	Peridomicílio	i.18
EV BAR 8	<i>E. evandroi</i>	M	Maranhão	Barreirinhas	Peridomicílio	i.18
EV LAS 18	<i>E. evandroi</i>	M	Minas Gerais	Lassance	Peridomicílio	ix.18
EV LAS 2	<i>E. evandroi</i>	F	Minas Gerais	Lassance	Peridomicílio	ix.18
EV LAS 20	<i>E. evandroi</i>	M	Minas Gerais	Lassance	Peridomicílio	ix.18
EV LAS 5	<i>E. evandroi</i>	M	Minas Gerais	Lassance	Peridomicílio	ix.18
LE BAR 7	<i>E. lenti</i>	M	Maranhão	Barreirinhas	Peridomicílio	i.18
LE LAS 26	<i>E. lenti</i>	F	Minas Gerais	Lassance	Peridomicílio	ix.18
LE LAS 29	<i>E. lenti</i>	M	Minas Gerais	Lassance	Peridomicílio	ix.18
LE LAS 6	<i>E. lenti</i>	M	Minas Gerais	Lassance	Peridomicílio	ix.18
LE PAR 23	<i>E. lenti</i>	F	Ceará	Ubajara	Parque Nacional de Ubajara	xi.17
LE PAR 26	<i>E. lenti</i>	M	Ceará	Ubajara	Parque Nacional de Ubajara	xi.17
LE PAR 72	<i>E. lenti</i>	M	Ceará	Ubajara	Parque Nacional de Ubajara	xi.17
LE PN 11	<i>E. lenti</i>	M	Tocantins	Porto Nacional	Peridomicílio	ii.19
LE PN 8	<i>E. lenti</i>	M	Tocantins	Porto Nacional	Peridomicílio	ii.19

Tabela 4. Identificação, sexo, data e sítios de coleta de espécies do subgênero *Evandromyia* (*Aldamyia*) amplificadas nesse estudo para o gene *PER*.

ID da amostra	Espécie	Sexo	Estado	Município	Localidade	Data de coleta
CA PN 12	<i>E. carmelinoi</i>	F	Tocantins	Porto Nacional	Peridomicílio	ii.19
CA PN 5	<i>E. carmelinoi</i>	M	Tocantins	Porto Nacional	Peridomicílio	ii.19
CA PN 9	<i>E. carmelinoi</i>	M	Tocantins	Porto Nacional	Peridomicílio	ii.19
EV BAR 36	<i>E. evandroi</i>	M	Maranhão	Barreirinhas	Peridomicílio	i.18
EV BAR 41	<i>E. evandroi</i>	M	Maranhão	Barreirinhas	Peridomicílio	i.18
EV BAR 44	<i>E. evandroi</i>	M	Maranhão	Barreirinhas	Peridomicílio	i.18
EV BAR 8	<i>E. evandroi</i>	M	Maranhão	Barreirinhas	Peridomicílio	i.18
EV LAS 18	<i>E. evandroi</i>	M	Minas Gerais	Lassance	Peridomicílio	ix.18
EV LAS 2	<i>E. evandroi</i>	F	Minas Gerais	Lassance	Peridomicílio	ix.18
EV LAS 20	<i>E. evandroi</i>	M	Minas Gerais	Lassance	Peridomicílio	ix.18
EV LAS 5	<i>E. evandroi</i>	M	Minas Gerais	Lassance	Peridomicílio	ix.18
LE BAR 7	<i>E. lenti</i>	M	Maranhão	Barreirinhas	Peridomicílio	i.18
LE LAS 26	<i>E. lenti</i>	F	Minas Gerais	Lassance	Peridomicílio	ix.18
LE LAS 29	<i>E. lenti</i>	M	Minas Gerais	Lassance	Peridomicílio	ix.18
LE LAS 6	<i>E. lenti</i>	M	Minas Gerais	Lassance	Peridomicílio	ix.18
LE PAR 19	<i>E. lenti</i>	M	Ceará	Ubajara	Parque Nacional de Ubajara	xi.17
LE PAR 20	<i>E. lenti</i>	M	Ceará	Ubajara	Parque Nacional de Ubajara	xi.17
LE PAR 23	<i>E. lenti</i>	F	Ceará	Ubajara	Parque Nacional de Ubajara	xi.17
LE PAR 26	<i>E. lenti</i>	M	Ceará	Ubajara	Parque Nacional de Ubajara	xi.17
LE PAR 51	<i>E. lenti</i>	F	Ceará	Ubajara	Parque Nacional de Ubajara	xi.17
LE PN 8	<i>E. lenti</i>	M	Tocantins	Porto Nacional	Peridomicílio	ii.19
LE URS 1	<i>E. lenti</i>	M	Maranhão	Urbano Santos	Peridomicílio	vi.16
LE URS 2	<i>E. lenti</i>	M	Maranhão	Urbano Santos	Peridomicílio	vi.16
LE VES 3	<i>E. lenti</i>	M	Espírito Santo	Viana	Peridomicílio	xi.17

Tabela 5. Identificação, sexo, data e sítios de coleta de espécies do subgênero *Evandromyia* (*Aldamyia*) amplificadas nesse estudo para o gene rDNA 28S.

ID da amostra	Espécie	Sexo	Estado	Município	Localidade	Data de coleta
CA PN 12	<i>E. carmelinoi</i>	F	Tocantins	Porto Nacional	Peridomicílio	ii.19
CA PN 15	<i>E. carmelinoi</i>	M	Tocantins	Porto Nacional	Peridomicílio	ii.19
CA PN 5	<i>E. carmelinoi</i>	M	Tocantins	Porto Nacional	Peridomicílio	ii.19
CA PN 9	<i>E. carmelinoi</i>	M	Tocantins	Porto Nacional	Peridomicílio	ii.19
EV BAR 36	<i>E. evandroi</i>	M	Maranhão	Barreirinhas	Peridomicílio	i.18
EV BAR 41	<i>E. evandroi</i>	M	Maranhão	Barreirinhas	Peridomicílio	i.18
EV BAR 44	<i>E. evandroi</i>	M	Maranhão	Barreirinhas	Peridomicílio	i.18
EV LAS 18	<i>E. evandroi</i>	M	Minas Gerais	Lassance	Peridomicílio	ix.18
EV LAS 2	<i>E. evandroi</i>	F	Minas Gerais	Lassance	Peridomicílio	ix.18
EV LAS 5	<i>E. evandroi</i>	M	Minas Gerais	Lassance	Peridomicílio	ix.18
LE LAS 26	<i>E. lenti</i>	F	Minas Gerais	Lassance	Peridomicílio	ix.18
LE LAS 29	<i>E. lenti</i>	M	Minas Gerais	Lassance	Peridomicílio	ix.18
LE LAS 6	<i>E. lenti</i>	M	Minas Gerais	Lassance	Peridomicílio	ix.18
LE PAR 23	<i>E. lenti</i>	F	Ceará	Ubajara	Parque Nacional de Ubajara	xi.17
LE PAR 26	<i>E. lenti</i>	M	Ceará	Ubajara	Parque Nacional de Ubajara	xi.17
LE PN 11	<i>E. lenti</i>	M	Tocantins	Porto Nacional	Peridomicílio	ii.19
LE PN 8	<i>E. lenti</i>	M	Tocantins	Porto Nacional	Peridomicílio	ii.19

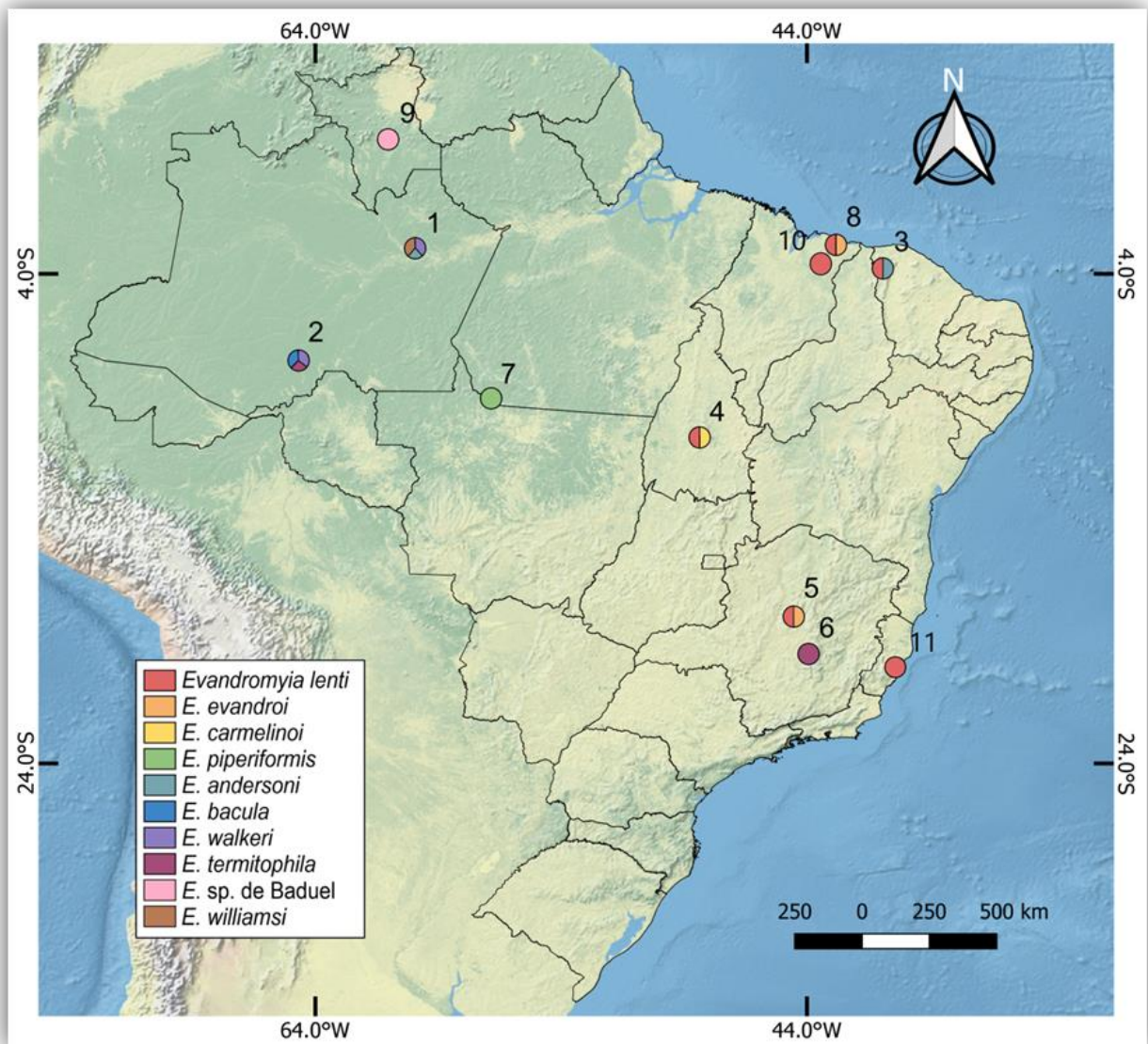


Figura 7. Mapa do Brasil mostrando os sítios de coleta de espécimes do subgênero *Evandromyia* (*Aldamyia*) utilizados nesse estudo: (1) Manaus – AM; (2) Lábrea – AM; (3) Ubajara – CE; (4) Porto Nacional – TO; (5) Lassance – MG; (6) Lagoa Santa – MG; (7) Jacareacanga – PA; (8) Barreirinhas – MA; (9) Caracaraí – RR; (10) Urbano Santos – MA; (11) Viana – ES. Padrões de coloração dos pontos indicam suas respectivas espécies amostradas.



Figura 8. Fotografias dos sítios de coleta de espécimes do subgênero *Evandromyia* (*Aldamyia*): (a) Parque Nacional de Ubajara – Ceará, (b) Armadilha luminosa instalada no Parque Nacional do Viruá – Roraima, (c) Área rural do município de Porto Nacional – Tocantins, (d) Armadilha luminosa instalada em cavernas no Parque Nacional de Ubajara.

Depois de triados os flebotomíneos foram montados em lâminas para microscopia óptica. Para isso, os espécimes foram dissecados individualmente em placas de petri contendo álcool 70%, sendo a cabeça e os três últimos segmentos abdominais montados diretamente em Berlese para clarificação das estruturas internas importantes na identificação de flebotomíneos (e.g. cibário, espermatecas). As pernas foram acondicionadas individualmente em microtubos de 0,2 mL para posterior amplificação direta dos marcadores utilizados, e o tórax, asas e primeiros segmentos abdominais armazenados em tubos de 1,5 mL para posterior extração de DNA. Após secagem do Berlese, que durou aproximadamente cinco dias, os flebotomíneos foram identificados ao nível de espécie utilizando chave taxonômica e classificação proposta por GALATI (2003; 2018) em

microscópio óptico Scope.A1, Zeiss® disponível no laboratório do Grupo de Estudos em Leishmanioses (GEL) do Instituto René Rachou – Fiocruz Minas.

3.2. Extração de DNA

Por conta do grande número de cópias no genoma, os marcadores do DNA mitocondrial (mtDNA) são fáceis de serem amplificados por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). Logo, nesse estudo utilizamos uma perna de flebotomíneo como “template” nas reações desses marcadores. A fim de estudar também genes nucleares (nDNA), fizemos a extração do DNA do tórax, asas e primeiros segmentos abdominais das amostras.

A extração do DNA foi realizada com o kit de extração de tecidos Gentra Puregene™ (QIAGEN), seguindo instruções do fabricante com pequenas modificações. Foram adicionados 100 µL de solução de lise para maceração dos flebotomíneos, que após a adição de 1 µL de proteinase K foram incubados em banho seco à 55 °C por aproximadamente 20 h. Após isso, foi adicionado em cada amostra 1 µL de RNase seguido de incubação à 37 °C por 30 min. Foram adicionados 100 µL de solução de precipitação de proteínas nas amostras, seguida de incubação em gelo para posterior centrifugação a 14.000 rpm por 8 min. O sobrenadante foi removido para novo tubo estéril, onde foi adicionado 300 µL de isopropanol para novo ciclo de centrifugação a 14.000 rpm por 10 min. Após descarte do sobrenadante, o “pellet” foi lavado com a adição de 300 µL de etanol 70% e 30 µL de acetato de sódio 3M com nova centrifugação de 14.000 rpm por 10 min. O tubo foi seco em temperatura ambiente por aproximadamente 20 h, e o DNA posteriormente ressuspendido em 15 µL de água Milli-Q autoclavada, sendo armazenado a -20 °C.

3.3. PCR e sequenciamento de DNA

Foram utilizados cinco marcadores nesse estudo, tanto do DNA mitocondrial (mtDNA), quanto do nuclear (nDNA), afim de estudar genes sob pressões seletivas diferenciadas no genoma de flebotomíneos e que são informativos para a sistemática desse grupo (Tabela 6). Analisamos os marcadores não mitocondriais: *cacophony* (CAC), *period* (PER) e 28S rDNA.

Todas as reações foram feitas com o kit GoTaq® G2 Green Master Mix (Promega) seguindo instruções do fabricante e primers listados na tabela 6. O volume final das reações foi de 40 µL (38-39 µL de Mix + 1-2 µL de DNA ou 40 µL de Mix + uma perna de flebótomo) e condições listadas na tabela 7. Para todas as reações foram incluídos controles negativos substituindo DNA das amostras por água Milli-Q autoclavada.

Tabela 6. Lista de genes e seus respectivos primers utilizados na amplificação desses fragmentos.

Marcador	Origem	Tamanho do fragmento (bp)	Primers	Ref. Primers
<i>COI</i>	mtDNA	658	LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') e HCO2198 (5'-TAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3')	FOLMER et al. (1994)
<i>CYTB</i>	mtDNA	712	cytbSFuniF (5'-GAGGACAAATATCWTTYTGAGG-3') e cytbSFuniR (5'-AGGAACWTTACCTCGTTATCG-3')	BATON et al. (in prep.)
<i>CAC</i>	nDNA	221	5LIcac (5'-GTGGCCGAACATAATGT TAG-3') e 3LIcac (5'-CCACGAACAAGT TCAACATC-3')	LINS et al. (2002)
<i>PER</i>	nDNA	525	5Llper2 (5'-AGCATCCTTTTGTAGCAAAC-3') e 3Llper2 (5'-TCAGATGAACTCTTGCTGTC-3')	MAZZONI et al. (2002)
28S	rDNA	700	28v (5'-AAGGTAGCCAAATGCCTCGTCATC-3') e 28x (5'-GTGAATTNTGCTTCACAATGATAGGAAGAGCC-3')	HILLIS & DIXON (1991)

Tabela 7. Marcadores utilizados com suas respectivas condições e ciclos de amplificação por PCR. Concentração inicial dos reagentes entre parênteses.

Marcador	Mix da PCR	Ciclos de amplificação
¹ <i>COI</i>	20 µL GoTaq (400 µM DNTP e 3 mM MgCl ₂); 4 µL primer forward (2 µM); 4 µL primer reverse (2 µM); 0.8 µL MgCl ₂ (50 mM); 11.2 µL água Milli-Q.	95 °C – 2' 95 °C – 1', 52 °C – 1', 72 °C – 1'30" (34x) 72 °C – 10'
¹ <i>CYTB</i>	20 µL GoTaq (400 µM DNTP e 3 mM MgCl ₂); 4 µL primer forward (2 µM); 4 µL primer reverse (2 µM); 1.2 µL MgCl ₂ (50 mM); 10.8 µL água Milli-Q.	95 °C – 5' 95 °C – 1', 50 °C – 1', 72 °C – 1'30" (34x) 72 °C – 10'
² <i>CAC</i>	20 µL GoTaq (400 µM DNTP e 3 mM MgCl ₂); 4 µL primer forward (2 µM); 4 µL primer reverse (2 µM); 0.8 µL MgCl ₂ (50 mM); 9.2 µL água Milli-Q.	95 °C – 5' 95 °C – 30", 55 °C – 30", 72 °C – 30" (34x) 72 °C – 10'
² <i>PER</i>	20 µL GoTaq (400 µM DNTP e 3 mM MgCl ₂); 4 µL primer forward (2 µM); 4 µL primer reverse (2 µM); 0.8 µL MgCl ₂ (50 mM); 9.2 µL água Milli-Q.	95 °C – 2' 95 °C – 45", 52 °C – 1', 72 °C – 1' (34x) 72 °C – 10'
³ 28S	20 µL GoTaq (400 µM DNTP e 3 mM MgCl ₂); 4 µL primer forward (2 µM); 4 µL primer reverse (2 µM); 11 µL água Milli-Q.	95 °C – 2' 95 °C – 45", 58 °C – 45", 72 °C – 1' (34x) 72 °C – 10'

¹ 40 µL de Mix + uma perna de flebótomo, ² 38 µL de Mix + 2 µL de DNA, ³ 39 µL de Mix + 1 µL de DNA.

A amplificação foi verificada por eletroforese com gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio (Figura 8). Todas as reações positivas, que apresentavam tamanho molecular consistente com o tamanho fragmento estudado, foram enviadas a empresa Macrogen Inc. (Korea) para purificação e sequenciamento direto dos amplicons utilizando primers forward e reverse.

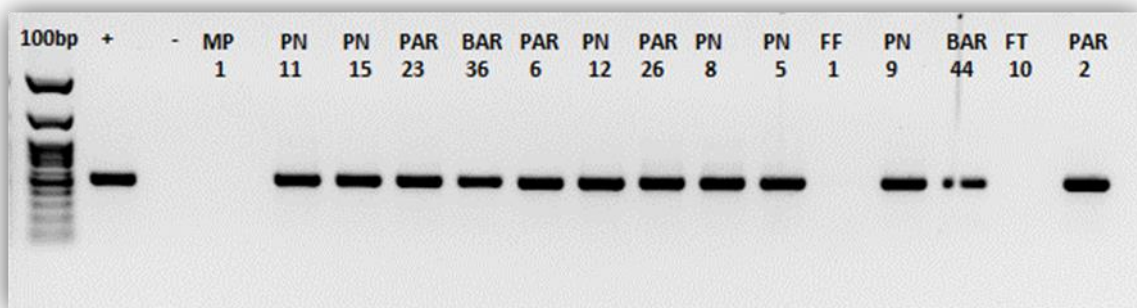


Figura 9. Gel de agarose (1%) corado com EtBr mostrando padrão de amplificação positivo para o gene *PER* (cerca de 500 bp) de flebotomíneos do subgênero *Evandromyia* (*Aldamyia*).

3.4. Análise de dados

A qualidade dos eletroferogramas, remoção das sequências dos primers, e formação de sequências de consenso foram executadas no software SeqTrace 0.9.0 (<http://seqtrace.googlecode.com/>; STUCKY, 2012). Sítios ambíguos que não puderam ser recuperados foram marcados com código correspondente a recomendação da IUPAC, International Union of Pure and Applied Chemistry. Sequências dos genes nucleares de indivíduos heterozigotos tiveram os haplótipos reconstruídos pelo algoritmo PHASE no software DnaSP v5 (LIBRADO & ROZAS, 2009). Sequências dos genes *CAC* e *PER* de indivíduos heterozigotos, que possuíam alelos com tamanhos diferentes, foram reconstruídos com auxílio dos softwares Champuru v1.0 (<http://jfflot.mnhn.fr/champuru/>; FLOT, 2007) e Indelligent v1.2 (<http://dmitriev.speciesfile.org/indel.asp>; DMITRIEV & RAKITOV, 2008).

As novas sequências geradas para o subgênero *Evandromyia* (*Aldamyia*) foram combinadas com aquelas previamente depositadas no banco de dados de sequências GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>; BENSON et al., 2013). As sequências foram alinhadas para cada marcador com o algoritmo MUSCLE (EDGAR, 2004) disponível no

software MEGA 7 (KUMAR et al., 2016), e posteriormente exportadas no formato FASTA para análise em outros programas. Também foram gerados arquivos em formato PHYLIP e NEXUS utilizando o servidor online ALTER (<http://www.sing-group.org/ALTER/>; GLEZ-PEÑA et al., 2010).

3.4.1. Reconstrução filogenética do gene *COI*

Alguns dos algoritmos utilizados executam a delimitação de espécies baseada em árvores filogenéticas como arquivo de entrada. Para isso, conduzimos análises filogenéticas baseadas em critérios de máxima verossimilhança (ML) (FELSENSTEIN, 1981) e inferência Bayesiana (BI) (DRUMMOND et al., 2002).

Árvores de ML foram geradas utilizando o programa RAxML 8.1.2 (STAMATAKIS, 2014) implementado na interface gráfica raxmlGUI 1.5 (SILVESTRO & MICHALAK, 2012), o qual realizou buscas heurísticas com 1.000 pseudoréplicas de bootstrap, utilizando o modelo “default” de substituição nucleotídica GTRGAMMA.

Para inferência Bayesiana foi utilizado o programa BEAST v2.5 (BOUCKAERT et al., 2019). A escolha do melhor modelo de substituição nucleotídica foi realizada automaticamente pelo plugin bModelTest, que executa a seleção ao longo das cadeias de Markov (BOUCKAERT & DRUMMOND, 2017). Como “prior” das árvores foi selecionado o modelo Yule, que é mais adequado em descrever relação de conjunto de dados entre diferentes espécies. Foram conduzidas duas buscas paralelas com 20,000,000 de gerações (amostrando a cada 1,000) nas cadeias de Markov Monte Carlo (MCMC). Para checar a convergência das corridas, e os valores estatísticos das análises, foi utilizado o programa Tracer v1.7 (RAMBAUT et al., 2018). As árvores das duas buscas independentes foram agrupadas no programa LogCombiner v2.5.2 descartando 20% dos dados iniciais como burn-in, e uma árvore ultramétrica de máxima credibilidade foi feita com as árvores restantes no programa TreeAnnotator v2.5.2 (Beast2, BOUCKAERT et al., 2014). Para visualização e edição de árvores foi utilizado o programa FigTree v.1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>).

3.4.2. Identificação e delimitação de espécies “single-locus”

Com o intuito de acessar a utilidade das sequências de “barcodes” para identificar diferentes morfoespécies do subgênero *Evandromyia* (*Aldamyia*), conduzimos análises de similaridade de sequências pelos critérios de Best Match (BM) e Best Close Match (BCM), ambos implementados no software TaxonDNA (MEIER et al., 2006). A “identificação de espécies” por esses dois métodos visa avaliar se uma mesma morfoespécie, assinalada *a priori*, possui correspondência com sequências da mesma morfoespécie no conjunto de dados amostrado. Nesse caso, sequências que tiveram sucesso na identificação são aquelas que possuem os “barcodes” mais próximos correspondentes à mesma espécie nominal, enquanto é considerada incorreta/ambígua se a sequência mais próxima corresponder a outra espécie (MEIER et al., 2006).

Por conta das críticas a cerca da utilização do modelo de substituição nucleotídica Kimura 2-parâmetros (K2P) para avaliar o uso do DNA Barcoding na delimitação de espécies (BARLEY & THOMSON, 2016; COLLINS et al., 2012; SRIVATHSAN & MEIER, 2012), utilizamos nesse estudo as distâncias não corrigidas (*p*-distances) nas situações em que as distâncias pareadas eram avaliadas (i.e., inferência do “barcode gap” e delimitação de espécies pelo algoritmo ABGD). Foram também utilizadas as distâncias genéticas de acordo com o melhor modelo de substituição nucleotídica HKY+I+G, proposto pelo programa JModelTest2 (DARRIBA et al., 2012). Por conta da similaridade dos resultados, apenas aqueles das distâncias *p* foram reportados abaixo.

As distâncias genéticas *p* intra- e interespecíficas foram geradas pelo software TaxonDNA, e então foram plotadas para gerar um gráfico de distribuição de frequências para checar a presença do “barcode gap” (i.e. lacuna entre as distâncias intra- e interespecíficas, que usualmente é utilizado para definir a utilidade do DNA Barcoding para a taxonomia). Além disso, o “barcode gap” foi avaliado para cada sequência individualmente, checando a distância intraespecífica máxima, e a interespecífica mínima, com auxílio dos pacotes do software R *ape* (PARADIS & SCHLIEP, 2019) e *spider* (BROWN et al., 2012).

As sequências originadas de flebotomíneos previamente identificados pela morfologia foram caracterizadas ao nível de unidade taxonômica operacional (OTU), que no caso de dados moleculares são “clusters” de organismos alocados em um grupo por conta de suas similaridades em um marcador genético (BLAXTER et al., 2005). Com isso, visamos associar espécies morfologicamente distintas desse trabalho com a formação de OTUs das

suas respectivas sequências, avaliando assim a utilidade do DNA Barcoding na delimitação de espécies do subgênero *Evandromyia* (*Aldamyia*). Para isso, adotamos os critérios de quatro algoritmos; Generalized Mixed Yule-Coalescent (GMYC) (PONS et al., 2006; FUJISAWA & BARRACLOUGH, 2013), Poisson Tree Processes (PTP) (ZHANG et al., 2013), Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) (PUILLANDRE et al., 2012) e redes de haplótipos TCS (CLEMENT et al., 2000).

GMYC e PTP são métodos baseados na teoria da coalescência (NORDBORG, 2001), e buscam diferenciar processos estocásticos populacionais de eventos de especiação em árvores filogenéticas. Para delimitação pelo GMYC foram executados os métodos de busca “single” e “multi threshold” (sGMYC e mGMYC) utilizando árvores ultramétricas, previamente adquiridas pela inferência bayesiana, no servidor online (<https://species.h-its.org/gmyc/>). De outra forma, a delimitação de OTUs pelo PTP foi conduzida no servidor online (<https://species.h-its.org/ptp/>), usando árvores de máxima verossimilhança geradas para cada gene.

O ABGD agrupa sequências em OTUs de acordo com uma matriz de distâncias nucleotídicas pareada. Foi submetida uma matriz de distâncias p não corrigidas no servidor online (<https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/abgd/abgdweb.html>) utilizando as configurações “default” do programa, com exceção do parâmetro Pmin, o qual foi ajustado para 0.005 de acordo com RATNASINGHAM & HEBERT (2013). Ao interpretar os resultados das partições geradas pelo ABGD, foram considerados apenas valores de “prior intraspecific divergence” entre 1% e 2.5%, assim como descrito em PINTO et al., (2015).

Também foram geradas redes de haplótipos pelo método de parcimônia estatística (TEMPLETON et al., 1992) no programa TCS v1.21 (CLEMENT et al., 2000). Esse método é utilizado na delimitação de espécies com dados moleculares, uma vez que usualmente recupera redes desconectadas para diferentes entidades biológicas (HART & SUNDAY 2007; KEKKONEN et al., 2015). Redes desconectadas foram assinaladas como unidades taxonômicas independentes, que foram visualizadas no servidor online tcsBU (<https://cibio.up.pt/software/tcsBU/>, SANTOS et al., 2015).

3.4.2. Delimitação de espécies “multilocus”

Com o intuito de avaliar o uso de marcadores suplementares para a identificação molecular de espécies indistinguíveis por todos os métodos “single-locus” do DNA Barcoding, foram amplificados e analisados fragmentos dos genes *CYTB*, *PER*, *CAC* e 28S supracitados para as espécies do complexo Evandroi (veja abaixo), com exceção de *E. piperiformis* por conta do número insuficiente de sequências geradas para essa espécie. Os alinhamentos foram analisados para cada marcador individualmente, no qual foram geradas as distâncias genéticas p no software MEGA v7, e árvores filogenéticas no software BEAST v2.5 assim como descrito para o marcador *COI*.

Devido à heterogeneidade do genoma e incongruências de árvores de genes/árvore de espécies (MADDISON, 1997; NICHOLS, 2001), os marcadores também foram analisados em conjunto com o modelo de coalescência de múltiplas espécies (multispecies coalescent, MSC) pelo software BPP v4.1 (YANG, 2015). Para isso, foram feitas análises do tipo A11 (i.e. inferência conjunta da árvore e delimitação de espécies) (YANG & RANNALA, 2014). Esse método compara diferentes modelos de árvores/delimitação de espécies em uma estrutura de inferência bayesiana, levando em consideração a separação incompleta das linhagens e a discordância de árvores de espécies e genes. Todas as sequências analisadas foram assinaladas “a priori” a grupos de espécies de acordo com sua identificação morfológica, e por conta disso foram excluídas sequências provenientes do GenBank, pois nem todas possuíam voucher para validação da identificação morfológica dos espécimes. As análises foram conduzidas com diferentes combinações de valores dos “priors” de tamanho populacional (θ) e tempo de divergência até a raiz da árvore de espécies (τ) para testar a sensibilidade dos dados frente a esses parâmetros, variando entre valores altos (3, 0.02) / (3, 0.02) e baixos (3, 0.0004) / (3, 0.0004) de tamanho populacional e tempo de divergência. Foi inferido, também, a sensibilidade dos “loci” utilizados nas análises de três diferentes conjuntos de dados; (i) mtDNA+nDNA, (ii) nDNA, e (iii) mtDNA. Cada análise foi conduzida duas vezes com diferentes “seeds” para checar convergência das inferências. Foram utilizadas 200,000 gerações para cada análise descartando as primeiras 20,000 como “burn-in”, e amostrando a cada 2 gerações. A inferência “multilocus” da árvore de espécies também foi realizada no software *BEAST (BOUCKAERT et al., 2019) utilizando os mesmos parâmetros da inferência “single-locus”, com o intuito de gerar uma representação gráfica da árvore de espécies dos três táxons analisados (Figura 14).

4. Resultados

4.1. DNA Barcoding de espécies do subgênero *Evandromyia* (*Aldamyia*)

A identificação morfológica dos flebotomíneos permitiu a identificação de 10 das 16 morfoespécies reconhecidas para o subgênero *Evandromyia* (*Aldamyia*) nas coletas realizadas em 11 localidades do Brasil: *E. andersoni* (Le Pont & Desjeux, 1988), *E. bacula* (Martins, Falcão & da Silva, 1965), *E. carmelinoi*, *E. evandroi*, *E. lenti*, *E. piperiformis* Godoy, Cunha & Galati, 2017, *E. termitophila*, *E. walkeri*, *E. williamsi* (Damasceno, Causey & Arouck, 1945), e *E. sp. de Baduel* (Floch & Abonnenc, 1945).

Das 10 morfoespécies analisadas, foram geradas 43 novas sequencias de “barcodes” (i.e. fragmentos do gene *COI*) (com tamanho variável entre 565 e 658 pares de base, bp). Essas sequencias incluem cinco espécies que não tinham sido sequenciadas até então – *E. andersoni*, *E. bacula*, *E. piperiformis*, *E. williamsi*, and *E. sp. de Baduel* – assim como amostras de novas localidades das que já possuíam dados disponíveis no GenBank. Nós combinamos essas novas sequencias com aquelas previamente publicadas para o mesmo subgênero (COHNSTAEDT et al., 2011; CONTRERAS GUTIERREZ et al., 2014; PINTO et al., 2015; RODRIGUES et al., 2018), gerando, então, um conjunto de dados de 87 sequencias (Anexo 1).

No nosso conjunto de dados combinado de 87 “barcodes”, somente 34 (39%) espécimes foram corretamente identificados com os critérios BM e BCM. As identificações corretas foram adquiridas a partir da análise de sequencias das espécies *E. andersoni*, *E. bacula*, *E. piperiformis*, *E. termitophila* e *E. walkeri*. Identificações ambíguas (46%) e incorretas (15%) foram geradas para *E. carmelinoi*, *E. evandroi* e *E. lenti*. Espécies que possuíam apenas uma sequência (i.e. *E. williamsi* e *E. sp. de Baduel*) não puderam ser avaliadas por conta da falta de amostras coespecíficas.

A distância genética p intraespecífica entre as 87 sequencias de “barcodes” possuíam uma distribuição unimodal (Figura 9), no qual variou de 0.0 a 3.7%, enquanto a distância interespecífica apresentou distribuição trimodal que variou de 0.0 a 15.1% (Figura 9). As sequencias pertencentes ao primeiro grupo de distâncias interespecíficas (aquele entre 0 e 4%) compreendeu comparações pareadas de amostras das morfoespécies *E.*

carmelinoi, *E. evandroi*, *E. lenti* e *E. piperiformis* (doravante referidas coletivamente como “o complexo Evandroi”) (Tabela 8), padrão esse que destoa de todas as outras distâncias interespecíficas, além de possuir sobreposição com as demais distâncias intraespecíficas (i.e. não houve a formação do “barcode gap” entre as classes de distâncias) (Figura 9). Em contraste, as distâncias interespecíficas das outras seis morfoespécies (tanto entre elas quanto em comparação às do complexo Evandroi) não apresentaram sobreposição com nenhuma distância intraespecífica, indicando uma evidente lacuna entre elas (i.e. “barcode gap”).

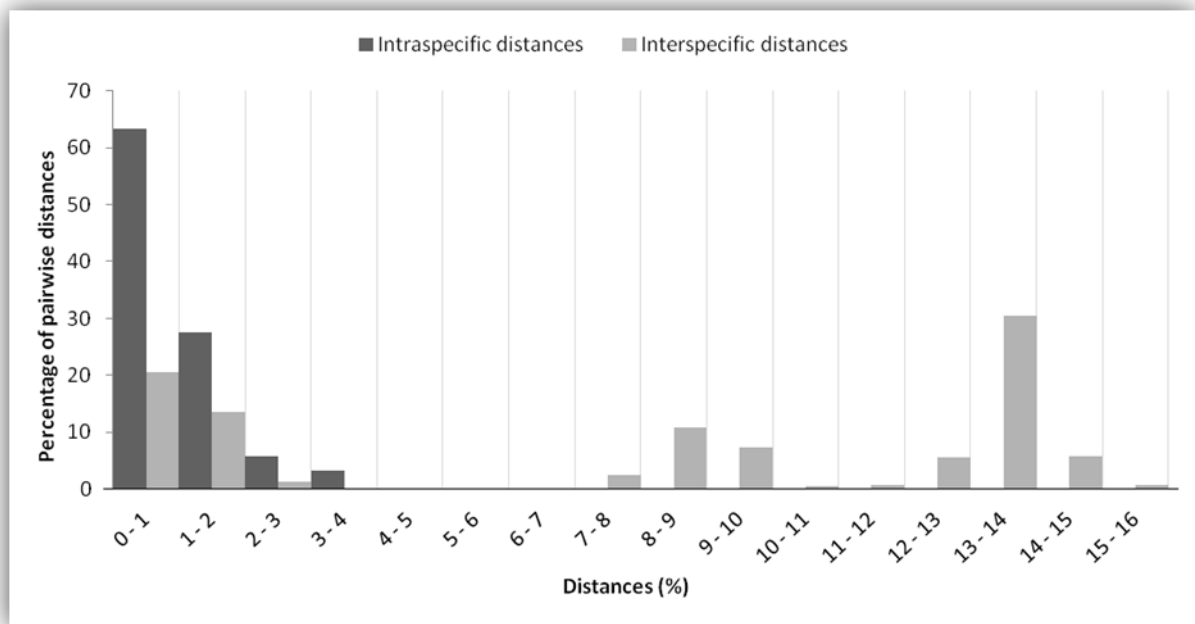


Figura 10. Distribuição de frequências das distâncias genéticas p intra- e interespecíficas ($n = 3,741$) baseadas em sequências do gene *COI* de 87 indivíduos de 10 morfoespécies do subgênero *Evandromyia* (*Aldamyia*).

Tabela 8. Distâncias genéticas p intra- e interespecíficas do gene *COI* de espécies do subgênero *Evandromyia* (*Aldamyia*). Valores em negrito correspondem às distâncias intraespecíficas. Valores marcados em vermelho representam as distâncias intra- e interespecíficas das espécies do complexo Evandroi.

Espécies	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)
(1) <i>E. carmelinoi</i>	0,003									
(2) <i>E. evandroi</i>	0,008	0,009								
(3) <i>E. lenti</i>	0,006	0,009	0,007							
(4) <i>E. piperiformis</i>	0,016	0,017	0,018	0,004						
(5) <i>E. walkeri</i>	0,088	0,087	0,087	0,095	0,021					
(6) <i>E. williansi</i>	0,089	0,087	0,087	0,091	0,072	n/a				
(7) <i>E. andersoni</i>	0,140	0,138	0,139	0,141	0,134	0,138	0,006			
(8) <i>E. sp. de Baduel</i>	0,148	0,147	0,147	0,146	0,128	0,139	0,058	n/a		
(9) <i>E. bacula</i>	0,132	0,132	0,132	0,136	0,144	0,134	0,135	0,133	0,012	
(10) <i>E. termitophila</i>	0,135	0,134	0,134	0,135	0,129	0,133	0,118	0,115	0,123	0,022

A análise filogenética das sequências de *COI*, tanto de ML quanto de BI, produziram cladogramas bem apoiados que geralmente correspondem com as morfoespécies estudadas, exceto pelos quatro membros do complexo Evandroi, que formaram um único clado bem apoiado, com pouca coerência de estruturação interna – mesmo em relação à localidade geográfica – com exceção da espécie *E. piperiformis* provenientes de Jacareacanga, Pará e algumas sequências de *E. evandroi* de Lassance, Minas Gerais (Figura 8). No mesmo sentido, todos os métodos de delimitação de espécies – GMYC, PTP, TCS e ABGD – geraram resultados similares à inferência filogenética, agrupando as quatro espécies do complexo Evandroi em uma única OTU, enquanto delimitou com eficácia as outras seis espécies do conjunto de dados (Figura 10). No entanto, houve algumas pequenas variações entre esses métodos de delimitação de espécies, uma vez que *E. bacula*, *E. termitophila* e *E. walkeri* foram alocadas em uma OTU cada, ou divididas em duas ou mais OTUs (Figura 10). Isso tem relação com o método de delimitação de espécies empregado, com alguns métodos favorecendo a divisão em duas ou mais OTUs (mGMYC e TCS), enquanto outros não (sGMYC e ABGD). No caso de *E. walkeri*, mas não de *E. bacula* e *E. termitophila*, as OTUs delimitadas pelo mGMYC e TCS foram congruentes com a localidade geográfica das amostras, sendo uma OTU compreendendo sequências de Lábrea na região sul da Amazônia brasileira, enquanto o outro grupo continha sequências de indivíduos provenientes das montanhas da região dos Andes colombianos.

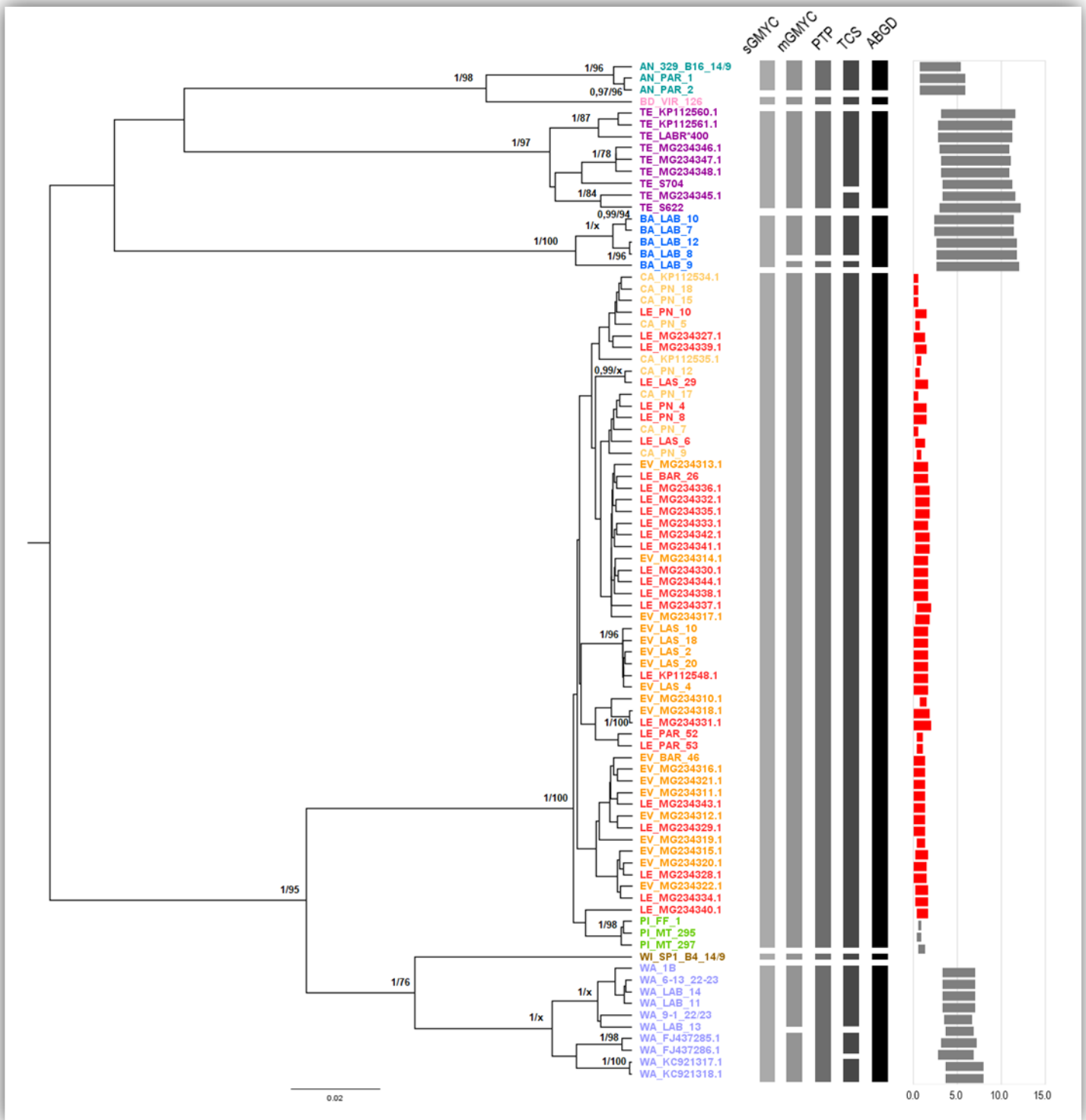


Figura 11. Árvore filogenética de sequências do gene *COI* de 10 diferentes morfoespécies do subgênero *Evandromyia* (*Aldamyia*). A topologia é referente a árvore de máxima credibilidade de clado (MCC) da BI. Valores próximos aos nós representam a probabilidade posterior (> 0.95) da BI e suporte de bootstrap (> 70) da árvore de ML. O esquema de cores das identificações segue as diferentes morfoespécies. As primeiras duas letras de cada táxon representam uma morfoespécie, como a seguir: AN = *E. andersoni*, TE = *E. termitophila*, BA = *E. bacula*, CA = *E. carmelinoi*, LE = *E. lenti*, EV = *E. evandroi*, PI = *E. piperiformis*, WI = *E. williamsi*, WA = *E. walkeri*, BD = *E. sp.* de Baduel. Barras verticais representam a delimitação

de espécies pelos algoritmos GMYC, PTP, TCS e ABGD. As barras horizontais no gráfico à direita ilustram a variação entre as distâncias genética intraespecífica máxima e a mínima interespecífica para cada indivíduo; as barras horizontais em cinza indicam aquelas que possuem o “barcode gap” (com a distância intraespecífica máxima à esquerda, e a mínima interespecífica à direita, no final das barras), enquanto as barras horizontais em vermelho demonstram a extensão da sobreposição entre as distâncias intra- e interespecíficas para sequencias sem o “barcode gap” (nesse caso, com a distância mínima interespecífica à esquerda, e a máxima intraespecífica à direita, ao final das barras).

Além disso, a rede de haplótipos gerada pelo algoritmo TCS demonstrou a presença de sete haplótipos que são compartilhados por três espécies do complexo Evandroi, sendo elas *E. lenti*/*E. evandroi* ou *E. lenti*/*E. carmelinoi* (Figura 11).

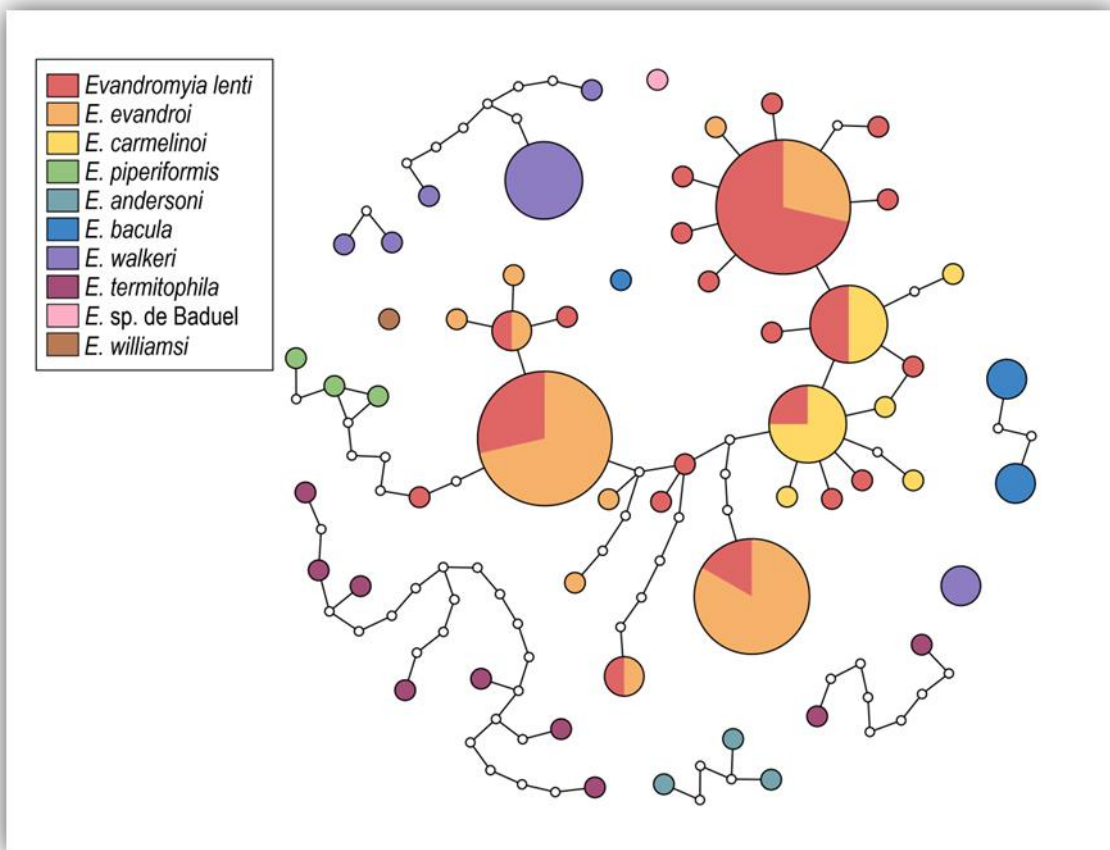


Figura 12. Rede de haplótipos TCS de sequências do gene *COI* de 10 diferentes morfoespécies do subgênero *Evandromyia* (*Aldamyia*). Redes desconectadas representam OTUs delimitadas. Cada círculo colorido representa um haplótipo, com seu tamanho proporcional ao número de indivíduos ($n = 87$) naquele haplótipo. Círculos menores em branco representam haplótipos não observados que foram inferidos pelo algoritmo.

4.2. Delimitação de espécies “multilocus” do complexo Evandroi

Tendo em vista a discordância entre taxonomia molecular e morfológica das espécies *E. carmelinoi*, *E. evandroi* e *E. carmelinoi* utilizando o gene *COI*, foram avaliados marcadores suplementares para a taxonomia desse grupo. Inicialmente os marcadores foram analisados de forma individual. Sendo assim, as sequências dos genes *CYTB*, *CAC*, *PER* e rDNA 28S foram geradas para 19, 20, 24 e 17 indivíduos, respectivamente (Tabelas 2, 3, 4 e 5), no qual corresponderam aos tamanhos de 690 bp (*CYTB*), 195 bp (*CAC*), 505 bp (*PER*) e 756 bp (rDNA 28S). As distâncias genéticas intraespecíficas para fragmentos dos genes *CYTB*, *CAC*, *PER* e rDNA 28S dessas três espécies variaram de 0 a 2.0%, 0 a 3.4%, 0 a 4.7%, e 0 a 0.7%, respectivamente, enquanto as distâncias interespecíficas tiveram variação de 0.2 a 2.3%, 0 a 3.7%, 0 a 4.7%, e 0 a 0.8%, respectivamente, demonstrando ausência de uma lacuna entre essas duas classes de distância.

No mesmo sentido, as árvores dos fragmentos analisados não apresentaram clados monofiléticos bem apoiados que correspondessem as morfoespécies amostradas (Figuras 12 e 13). Entretanto, a análise do gene mitocondrial *CYTB* demonstrou que amostras de *E. evandroi* formaram dois clados distintos, apesar de não relacionados filogeneticamente, um de sequências provenientes de Barreirinhas – Maranhão e outro de amostras pertencentes a Lassance – Minas Gerais (Figura 12), esse último corroborando os achados das análises prévias com o gene *COI* (Figura 10).

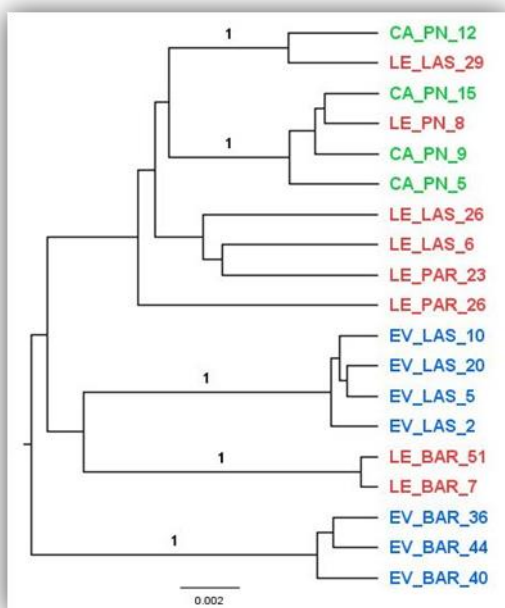


Figura 13. Árvore filogenética de máxima credibilidade de clado (MCC) do gene *CYTB* de três espécies do complexo Evandroi. Valores próximos aos nós representam a probabilidade posterior (PP>0.95). As primeiras duas letras na identificação das sequências representam as morfoespécies: CA = *E. carmelinoi*, EV = *E. evandroi*, LE = *E. lenti*, enquanto as demais letras identificam a localidade das amostras: PN = Porto Nacional – Tocantins, LAS = Lassance – Minas Gerais, BAR = Barreirinhas – Maranhão.

A análise “multilocus” pelo software BPP, de forma geral, gerou os mesmos resultados para todas as análises mesmo quando alterados os valores de θ/τ e o conjunto de dados de entrada (i.e. somente mtDNA, somente nDNA e ambos combinados) (Tabela 9). A árvore de espécies mais aceita foi aquela em que as morfoespécies *E. lenti* e *E. carmelinoi* são mais próximas filogeneticamente em relação a *E. evandroi* (*(carmelinoi, lenti) evandroi*) (Figura 14). Em relação à delimitação de espécies, o modelo que melhor explica os dados amostrados é aquele em que *E. lenti* e *E. carmelinoi* são pertencentes a mesma espécie, enquanto *E. evandroi* é uma entidade biológica estruturada separada dessas duas (*(CL) E*) (Tabela 9). Além disso, pode-se observar que não houve influência dos “priors” quando analisados os conjuntos de dados com “loci” somente do nDNA e nDNA+mtDNA, mas sim quando analisado somente o “loci” do mtDNA, no qual valores baixos de θ (tamanho populacional) afetaram negativamente a probabilidade posterior do melhor modelo amostrado (Tabela 9).

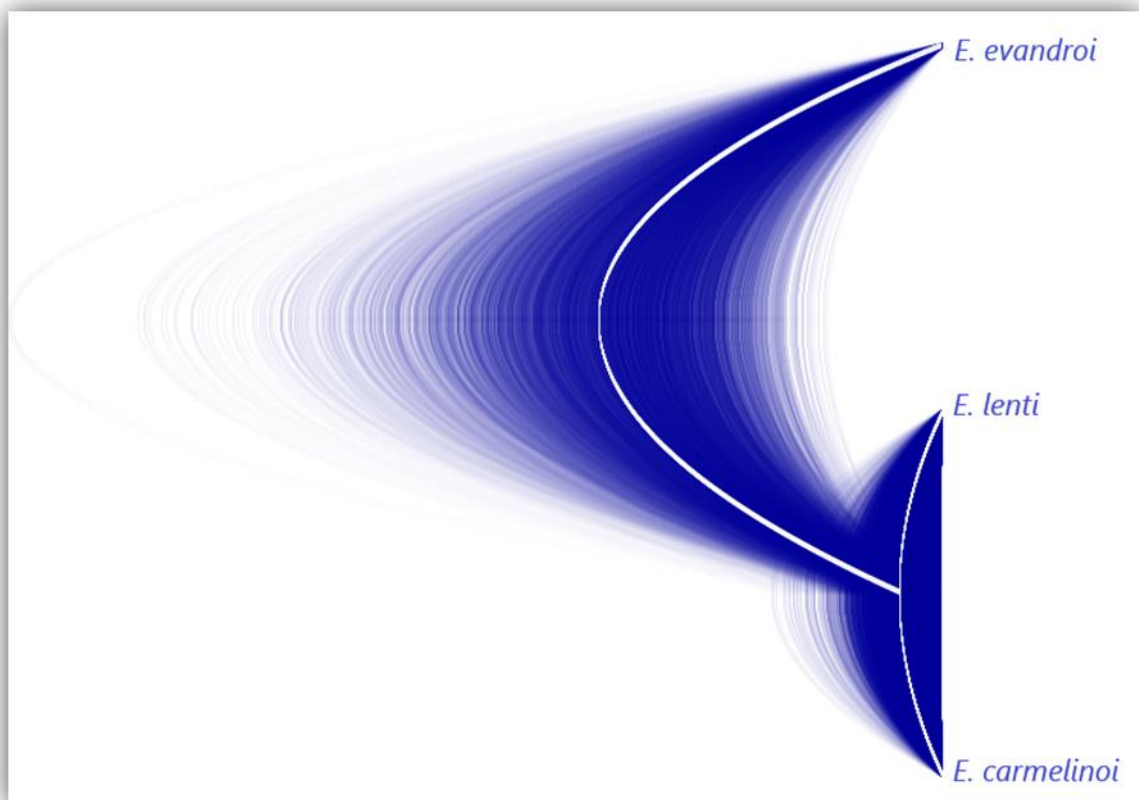


Figura 15. Árvore de espécies gerada pela análise “multilocus” no *BEAST e visualizada no DensiTree. Todas as topologias geradas na análise (18,000 árvores após burn-in) foram sobrepostas (azul), e uma árvore de consenso foi gerada (branco).

Tabela 9. Inferência conjunta da árvore e delimitação de espécies dos táxons *E. carmelinoi* (C), *E. evandroi* (E) e *E. lenti* (L). Valores em vermelho indicam cenários com baixo valor de suporte (PP < 0.95).

A11 Inferência conjunta da árvore e delimitação de espécies	τ (3, 0.004) θ (3, 0.002) Algoritmo 0	τ (3, 0.0004) θ (3, 0.0002) Algoritmo 0	τ (3, 0.04) θ (3, 0.02) Algoritmo 0	τ (3, 0.004) θ (3, 0.002) Algoritmo 1	τ (3, 0.0004) θ (3, 0.0002) Algoritmo 1	τ (3, 0.04) θ (3, 0.02) Algoritmo 1	τ (3, 0.004) θ (3, 0.02) Algoritmo 0	τ (3, 0.04) θ (3, 0.002) Algoritmo 0	τ (3, 0.004) θ (3, 0.02) Algoritmo 1	τ (3, 0.04) θ (3, 0.002) Algoritmo 1
• Árvore inicial: ((E, L), C); • Conjunto de dados: mtDNA + nDNA	(CL, E) 0.999	(CL, E) 1.0	(CL, E) 0.981	(CL, E) 0.999	(CL, E) 1.0	(CL, E) 0.977	(CL, E) 0.977	(CL, E) 0.999	(CL, E) 0.976	(CL, E) 0.999
• Árvore inicial: (E, (L, C)); • Conjunto de dados: mtDNA + nDNA	(CL, E) 0.999	(CL, E) 1.0	(CL, E) 0.977	(CL, E) 0.999	(CL, E) 1.0	(CL, E) 0.981	(CL, E) 0.979	(CL, E) 0.999	(CL, E) 0.979	(CL, E) 0.999
• Árvore inicial: ((E, L), C); • Conjunto de dados: nDNA	(CL, E) 0.999	(CL, E) 1.0	(CL, E) 0.969	(CL, E) 0.998	(CL, E) 1.0	(CL, E) 0.969	(CL, E) 0.963	(CL, E) 0.999	(CL, E) 0.967	(CL, E) 0.999
• Árvore inicial: (E, (L, C)); • Conjunto de dados: nDNA	(CL, E) 0.999	(CL, E) 1.0	(CL, E) 0.966	(CL, E) 0.999	(CL, E) 1.0	(CL, E) 0.970	(CL, E) 0.966	(CL, E) 0.999	(CL, E) 0.965	(CL, E) 0.999
• Árvore inicial: ((E, L), C); • Conjunto de dados: nDNA sem gaps.	(CL, E) 0.999	(CL, E) 1.0	(CL, E) 0.972	(CL, E) 0.998	(CL, E) 1.0	(CL, E) 0.971	(CL, E) 0.958	(CL, E) 0.999	(CL, E) 0.961	(CL, E) 0.999
• Árvore inicial: (E, (L, C)); • Conjunto de dados: nDNA sem gaps.	(CL, E) 0.998	(CL, E) 1.0	(CL, E) 0.969	(CL, E) 0.999	(CL, E) 1.0	(CL, E) 0.967	(CL, E) 0.961	(CL, E) 0.999	(CL, E) 0.958	(CL, E) 0.999
• Árvore inicial: ((E, L), C); • Conjunto de dados: mtDNA	(CL, E) 0.995	(CL, E) 0.999	(CL, E) 0.776	(CL, E) 0.996	(CL, E) 0.999	(CL, E) 0.755	(CL, E) 0.767	(CL, E) 0.998	(CL, E) 0.765	(CL, E) 0.994
• Árvore inicial: (E, (L, C)); • Conjunto de dados: mtDNA	(CL, E) 0.997	(CL, E) 0.999	(CL, E) 0.784	(CL, E) 0.996	(CL, E) 0.999	(CL, E) 0.776	(CL, E) 0.761	(CL, E) 0.998	(CL, E) 0.765	(CL, E) 0.996

5. Discussão

A taxonomia molecular do gênero *Evandromyia* é complexa e difícil de ser elucidada. A presença de espécies indistinguíveis pelo gene *COI* (PINTO et al., 2015, RODRIGUES et al., 2018) contrasta com os achados de diversidade críptica desse gênero (COHNSTAEDT et al., 2011; CONTRERAS-GUTIERREZ et al., 2014; PINTO et al., 2015; RODRIGUES et al., 2018). Nossos resultados demonstraram que métodos tradicionais de DNA Barcoding baseado na análise de um fragmento do gene *COI* são eficientes na identificação de pelo menos seis espécies do subgênero *Evandromyia* (*Aldamyia*) – *E. andersoni*, *E. bacula*, *E. piperiformis*, *E. termitophila*, *E. williamsi*, e *E. sp. de Baduel* – incluindo a identificação de diversidade críptica associada a algumas delas por diferentes métodos de delimitação de espécies “single-locus”. Apesar disso, a análise dos “barcodes” encontra dificuldades na delimitação das morfoespécies *E. carmelinoi*, *E. evandroi*, *E. lenti*, e *E. piperiformis*, sendo essa última corretamente identificada apenas por métodos de similaridade de sequências (BM e BCM). Além disso, a análise dos marcadores moleculares *CYTB*, *CAC*, *PER* e *28S* se mostrou insuficiente para a delimitação das morfoespécies indistinguíveis pelo *COI* pertencentes ao complexo *Evandroi*, mas ao serem analisados em conjunto pelo método de coalescência de múltiplas espécies (MSC), são capazes de delimitar com precisão o táxon *E. evandroi* como uma entidade biológica distinta de *E. carmelinoi* e *E. lenti*, apesar de não suportar essas duas últimas como espécies distintas.

5.1. DNA Barcoding de espécies do subgênero *Evandromyia* (*Aldamyia*)

Embora a delimitação de espécies “single-locus” tenha tido resultados congruentes em relação às espécies amostradas que não pertencem ao complexo *Evandroi* – *E. andersoni*, *E. bacula*, *E. termitophila*, *E. walkeri*, *E. williamsi*, e *E. sp. de Baduel* – houve também pequenas variações inconsistentes entre os métodos em relação a separação das morfoespécies *E. bacula*, *E. termitophila* e *E. walkeri* em duas ou mais OTUs (Figura 10). A relevância da delimitação dessas espécies em mais de uma OTU é incerta, mas podem representar variação geográfica intraespecífica, ou a presença de espécies crípticas (AVISE, 2000). Nesse sentido, é sabido que métodos moleculares geralmente tem a capacidade de inferir um número maior de unidades taxonômicas em relação à hipótese inicial de

delimitação de espécies feita por caracteres morfológicos (AVISE, 2000; ZACHOS et al., 2013), principalmente ao utilizar marcadores do mtDNA que possuem altas taxas de mutação, e que são historicamente utilizados para a detecção de populações estruturadas, identificação de espécies recentes e inferências filogeográficas (AVISE, et al., 1987; MORITZ et al., 1987). A delimitação gerada pelos algoritmos mGYMC e TCS separaram sequências da morfoespécie *E. walkeri* em duas e três OTUs, respectivamente (Figura 10), que correspondem às localidades das amostras, associando a diversidade críptica encontrada com o isolamento geográfico por distância, o que pode ser comumente visualizado em estudos de DNA Barcoding que analisam amostras de espécies provenientes de um amplo espaço geográfico (PINTO et al., 2015; RODRIGUES et al., 2018). Contudo, é notável que as duas OTUs da Colômbia identificadas pelo TCS sejam dos departamentos de Huíla e Caldas, que são geograficamente próximos, sugerindo que um processo de vicariância associado às montanhas dos Andes pode ter sido responsável pela divergência molecular alopátrica da morfoespécie *E. walkeri*. Em contraste, as OTUs inferidas para *E. bacula* e *E. termitophila* pelo mGYMC, PTP e/ou TCS (Figura 10), não foram associadas com a localidade das amostras indicando que a diversidade críptica dessas amostras pode existir em uma escala espacial menor (i.e. com distribuição simpátrica) também. Estudos posteriores avaliando a significância das OTUs inferidas para os táxons *E. bacula*, *E. termitophila* e *E. walkeri* devem ser conduzidos, incorporando métodos suplementares, como a morfometria, com o intuito de determinar se elas correspondem a táxons diferentes ou não (YOGESWARI & SRINIVASAN, 2016). As diferenças observadas entre os métodos de “single” e “multi threshold” do GMYC são esperadas já que o último é mais flexível e, conseqüentemente, mais sensível do que o primeiro por utilizar diferentes pontos de corte na delimitação de espécies (FUJISAWA & BARRACLOUGH, 2013).

A análise filogenética de sequências do gene *COI* e a comparação com as distâncias genética par-a-par nos permitiu avaliar a diferenciação e a relação evolutiva entre as morfoespécies no subgênero *Evandromyia* (*Aldamyia*). Ambas as análises de ML e BI revelaram a presença de um único clado bem apoiado contendo as quatro morfoespécies do complexo Evandroi, *E. williamsi* e *E. walkeri*, e um clado com baixo valor de suporte contendo as espécies distantemente relacionadas *E. andersoni*, *E. bacula*, *E. termitophila* e *E. sp.* de Baduel, que também não foram intimamente relacionadas entre si, com exceção do par *E. andersoni* / *E. sp.* de Baduel (Figura 10). Esse padrão observado na análise filogenética

também é refletido nas distâncias genéticas interespecíficas par-a-par, que – com exceção do complexo Evandroi – apresentou distribuição bimodal, com um grupo de distâncias variando de 5 a 10% e outro de 11 a 16% (Figura 9). Esses dois grupos de distâncias correspondem, respectivamente, as comparações interespecíficas dentro do clado bem apoiado contendo o complexo Evandroi / *E. williansi* / *E. walkeri* (incluindo também as comparações do par *E. andersoni* / *E. sp.* de Baduel) e aquelas envolvendo as espécies do clado com baixo valor de suporte contendo as espécies distantemente relacionadas (Figura 9, Tabela 8). Para flebotomíneos, distâncias genéticas interespecíficas maiores que aproximadamente 10% representam valores altos, e tipicamente visualizados entre espécies de gêneros diferentes (CONTRERAS-GUTIERREZ et al., 2014; PINTO et al., 2015; RODRIGUES et al., 2018). Sendo assim, os dois grupos de distâncias supracitados provavelmente devem corresponder a comparações intra- e intergenéricas. Logo, essas observações sugerem que as morfoespécies atualmente descritas como pertencentes ao subgênero *Evandromyia* (*Aldamyia*) provavelmente não são monofiléticas, e investigações futuras serão necessárias para elucidar qual seria o agrupamento natural mais provável dessas espécies.

Houve forte discordância entre as identificações morfológica e molecular das quatro espécies pertencentes ao complexo Evandroi. Esse grupo é nitidamente distinguível ao analisar os caracteres morfológicos, principalmente em relação ao ápice dos dutos edeagais e forma do parâmero dos machos, e do formato da espermateca das fêmeas (GALATI, 2018). *Evandromyia evandroi* é a espécie mais diferente entre essas; o ápice dos dutos edeagais é "truncado" e o parâmero é digitiforme, enquanto o ápice dos dutos é bifurcado e o parâmero é dividido em lobo ventral e dorsal em *E. lenti*, *E. carmelinoi*, e *E. piperiformis*, o ápice dos dutos edeagais pode ser diferenciado entre essas últimas três pelo formato e/ou tamanho desse caractere (Figura 5). As fêmeas de *E. lenti* e *E. carmelinoi* possuem o ducto comum da espermateca em formato de funil, e são difíceis de se diferenciar por conta da similaridade no formato da espermateca, sendo delimitadas apenas pela razão dos dutos comum/individuais (GALATI, 2018), apesar de estudos recentes demonstrarem que há uma sobreposição das medidas desse caráter entre essas espécies, tornando-as em certos casos indistinguíveis (GODOY et al., 2017). Entretanto, as fêmeas de *E. evandroi* apresentam os dutos individuais da espermateca pelo menos quatro vezes mais longos que o curto ducto comum, enquanto a espermateca de *E. piperiformis* possui o ducto comum com praticamente

o mesmo comprimento ao longo de toda sua extensão e com somente a metade apical parcialmente esclerotizada (GODOY et al., 2017; GALATI, 2018).

Em contraste, os resultados da taxonomia molecular pelos “barcodes” do gene *COI* encontram dificuldades na delimitação das quatro espécies supracitadas, sendo que três delas – *E. carmelinoi*, *E. evandroi*, *E. lenti* – são indistinguíveis pelo fragmento do gene *COI*. Apesar disso, mesmo não sendo delimitada como uma OTU distinta, sequências de *E. piperiformis* formaram um clado bem apoiado pelas inferências filogenéticas (Figura 10), que pode estar relacionado com a localidade geográfica das amostras, tendo em vista que não foi possível analisar sequências das demais espécies do complexo Evandroi provenientes de Jacareacanga, localizada no sul da Amazônia brasileira (Figura 6). Além disso, sequências de *E. piperiformis* foram corretamente identificadas pelos critérios de “Best-match” (BM e BCM), que consistem métodos de identificação de sequências por similaridade, sendo capazes de identificar táxons mesmo quando critérios baseados em árvores filogenéticas não conseguem (i.e. monofiletismo recíproco) (MEIER et al., 2006). Apesar das notáveis diferenças morfológicas, nós propomos com base na similaridade molecular que essas últimas quatro morfoespécies são fortemente relacionadas e devem ser consideradas como um complexo de espécies de divergência recente, no qual nomeamos aqui como “complexo Evandroi”, por uma questão de precedência na descrição dessa espécie. Os membros do complexo Evandroi podem estar passando por um processo incipiente de especiação simpátrica, no qual poucos “loci” associados na diferenciação dos aspectos da genitália estão envolvidos. A presença de táxons morfológicamente distintos que são agrupados em um único grupo molecular já foi previamente descrita em diversos organismos, como caracóis (STANKOWSKI & JOHNSON, 2014; VIDIGAL et al., 2018), esponjas (DEBIASSE & HELLBERG, 2015), corais (AMENT-VELAZQUEZ et al., 2016) e lagartos (JIN et al., 2014), além de outras espécies de flebotomíneos, como algumas pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* (PINTO et al., 2015) e *Nyssomyia* (MAZZONI et al., 2008; PINTO et al., 2015).

Estudos anteriores também mostraram que *E. carmelinoi*, *E. evandroi* e *E. lenti* não são distinguíveis ao utilizar métodos tradicionais de DNA Barcoding (i.e. observação dos clusters em árvores de *neighbor-joining* seguido da delimitação pelo algoritmo ABGD) aplicados ao fragmento do gene *COI* descrito por FOLMER et al. (1994) (PINTO et al., 2015; RODRIGUES et al., 2018). Nesse estudo nós utilizamos diferentes métodos de sofisticação estatística variável, incluindo pela primeira vez a aplicação de métodos derivados da teoria

da coalescência (GMYC e PTP) na delimitação de espécies de flebotomíneos. Entretanto, esses métodos também foram ineficazes na separação das espécies pertencentes ao complexo Evandroi, indicando que os resultados anteriores não foram consequência do uso de métodos de delimitação menos elaborados que se baseiam na distância genética das sequências amostradas. Em vez disso, a dificuldade de distinguir os quatro membros do complexo Evandroi utilizando sequências de *COI* é aparentemente devido à sua divergência recente (i.e. especiação incipiente e/ou recente), de modo que não houve tempo insuficiente para a separação completa das linhagens e/ou acumulação de diferenciação molecular espécie-específica (MADDISON, 1997; HUDSON & COYNE, 2002; KNOWLES & CARSTENS, 2007). A ampla distribuição geográfica de pelo menos algumas espécies do complexo Evandroi, associada a altas taxas de potencial reprodutivo em flebotomíneos, sugere que os altos valores de tamanho efetivo populacional tenham provavelmente contribuído para a falta de diferenciação molecular entre essas espécies (MADDISON, 1997; HUDSON & COYNE, 2002; ESSELSTYN et al., 2012; VAN VELZEN et al., 2012; FUJISAWA & BARRACLOUGH, 2013).

5.2. Delimitação de espécies “multilocus” do complexo Evandroi

O DNA Barcoding surgiu como uma proposta de método rápido e eficaz na identificação molecular de organismos ao nível de espécie (HEBERT et al., 2003). Porém, a delimitação de espécies baseada em apenas em um único alvo molecular como o gene *COI*, aliada a uma análise dos dados pragmática, tal como a análise de pontos de corte de distâncias genéticas, podem levar a interpretação errônea da utilidade da taxonomia molecular para identificação de diversos organismos (COLLINS & CRUICKSHANK, 2013). Em muitas situações pontos de corte arbitrários e irrealistas são utilizados para identificar a análise do *COI* como um bom marcador para os “barcodes” como, por exemplo, a “regra de 10x” que preconiza que a divergência entre espécies seja 10 vezes maior que os polimorfismos encontrados dentro da mesma espécie (HEBERT et al., 2004). Apesar disso, outros métodos baseados na distância nucleotídica utilizam limites mais refinados para a identificação de espécies; o algoritmo Barcode Index Number (BIN) presente na plataforma do Barcode of Life Data System (BOLD) utiliza um limite de 2,2% de distância *p* intraespecífica com um posterior refinamento do “markov clustering” (RATNASINGHAM & HEBERT, 2013), enquanto

o ABGD utiliza uma matriz de distâncias nucleotídica de sequências amostradas para definir a lacuna – mesmo que incipiente – das distâncias intra- e interespecíficas (PUILLANDRE et al., 2012). Mesmo assim, métodos baseados em distâncias genéticas possuem severas limitações, e apesar da rápida evolução do mtDNA, é sabido que espécies recentes possuem o acúmulo de mutações espécie-específicas muito limitado, logo, outra estratégia para a análise “single-locus” do DNA Barcoding é analisar árvores filogenéticas de genes buscando o monofiletismo recíproco de diferentes linhagens evolutivas, nesse caso podendo utilizar, também, a delimitação proposta por algoritmos que inferem OTUs a partir da análise de árvores filogenéticas de ML e BI (e.g. PTP e GMYC), e não de distâncias nucleotídicas.

Nesse estudo foi demonstrado que as estratégias supracitadas são ineficientes na delimitação dos componentes do complexo Evandroi para diversos marcadores moleculares. As análises dos marcadores *COI*, *CYTB*, *CAC*, *PER* e *28S* para as morfoespécies *E. carmelinoi*, *E. evandroi* e *E. lenti* apresentaram uma evidente sobreposição das distâncias genéticas intra- e interespecíficas. Além disso, apesar de formarem um clado único e bem apoiado pelas análises filogenéticas, não houve nenhuma estruturação congruente com as morfoespécies desse complexo, com exceção para as sequências de *COI* de *E. evandroi* de Lassance (MG) (Figura 10) e *CYTB* de amostras de *E. evandroi* de Lassance (MG) e Barreirinhas (MA) (Figura 12). Logo, o verdadeiro status dos membros do complexo Evandroi não pode ser elucidado com estratégias de análise “single-locus”, mesmo utilizando-se marcadores moleculares de diferentes origens, taxas de evolução e pressões seletivas diferenciadas. De forma geral, o mtDNA possui um padrão de evolução rápida, mas ainda é esperado que espécies muito recentes mostrem árvores de genes poli- e parafiléticas antes que o monofiletismo recíproco seja adquirido, principalmente por conta da separação incompleta de linhagens e introgressão durante o processo de especiação (FUNK & OMLAND, 2003; ROSS, 2014).

Em contraste, a análise “multilocus” pelo programa BPP assinalou, na maioria dos cenários, que *E. evandroi* é uma espécie distinta de *E. carmelinoi* e *E. lenti* com altos valores de probabilidade posterior (>0,95) (Tabela 9). Métodos baseados na teoria da coalescência – teoria matemática e probabilística que se baseia na história evolutiva dos alelos – como os que incorporam a coalescência de múltiplas espécies (multispecies coalescent, MSC) (RANNALA & YANG, 2003), podem ser utilizados para resolver conflitos entre árvore de genes e de espécies, possibilitado uma inferência mais robusta em relação a delimitação de

espécies quando há padrões poli- e parafiléticos na genealogia dos alelos estudados por conta de processos de especiação recentes (FUJITA et al., 2012). O programa aqui utilizado – BPP – assinala diferentes populações/espécies “a priori” e tenta sempre fundir essas entidades em uma só, mas nunca tenta separá-las (YANG, 2015), tornando-o assim, um “método de validação”, diferente dos métodos de “descoberta” que não utilizam essas informações (CARSTENS et al., 2013). Apesar do BPP assumir algumas prerrogativas como, por exemplo, a ausência de fluxo gênico entre as entidades analisadas (YANG & RANALA, 2010), o algoritmo delimita com precisão diferentes espécies mesmo quando há uma pequena taxa de migrantes por geração (ZHANG et al., 2011). Logo, os resultados que indicam *E. carmelinoi* e *E. lenti* como uma única entidade biológica sugere que intensos eventos de hibridização ocorram entre essas duas morfoespécies, o que pode ser validado pela distribuição simpátrica (REBÊLO et al., 1999; MARTINS et al., 2002; CORTEZ et al., 2007; JÚNIOR et al., 2009; REBÊLO et al., 2010; SANGUINETTE et al., 2015) e grande similaridade morfológica (GODOY et al., 2017; GALATI, 2018), principalmente das fêmeas, desses dois táxons.

A utilização de diferentes “priors” de tamanho populacional (θ) e tempo de divergência (τ) nas análises do BPP, forneceram os mesmos resultados apesar de pequena variação nos valores de probabilidade posterior (Tabela 9). De forma geral, valores altos de tamanho populacional (θ : 3, 0.02) reproduziram menor suporte estatístico do melhor modelo proposto, enquanto a variação de τ não teve influência com tempos de divergência recentes (τ : 3, 0.0004) ou antigos (τ : 3, 0.04), corroborando simulações anteriores em que valores discrepantes de θ tiveram grande efeito na delimitação de espécies, desfavorecendo cenários reais ao utilizar valores que destoam da história das espécies amostradas (YANG & RANNALA, 2014; YANG, 2015; RANNALA & YANG, 2017; GALEN et al., 2018; DEVITT et al., 2019). O BPP não possui valores “default” para esses “priors”, e a melhor estratégia é avaliar a influência desses nos dados amostrados (YANG, 2015). O valores para θ assumem uma distribuição gamma inversa $IG(\alpha, \beta)$, com a média sendo calculada pela equação $\beta/(\alpha - 1)$, sendo assim, a média para valores altos de tamanho populacional (θ : 3, 0.02) é $0.02/(3 - 1) = 0.01$. Em perspectiva das análises do BPP, uma média 0.01 para θ corresponde que duas sequencias aleatórias das populações amostradas possuem uma divergência genética de 10%, valor que não corresponde com a realidade do conjunto de dados analisados tendo em vista que as espécies do complexo Evandroi não ultrapassam a distância genética de 3%.

As morfoespécies pertencentes ao complexo Evandroi – *E. carmelinoi* e *E. lenti* – não podem ser delimitadas por nenhuma das linhas de evidência da biologia molecular apresentadas nesse estudo. Tendo em vista o conceito unificado de que espécies representam “linhagens de metapopulações evoluindo separadamente” (de QUEIROZ, 2005), essas duas morfoespécies supracitadas podem ser consideradas como uma única entidade biológica. De forma geral, a análise de cerca de cinco “loci” em análises do programa BPP é suficiente para delimitar com eficácia os táxons amostrados, entretanto é sabido que o aumento do número de marcadores afeta positivamente a precisão estatística do método (YANG & RANNALA, 2014), o que pode ou não ter ocasionado na delimitação incorreta de *E. carmelinoi* e *E. lenti* como uma única espécie. Uma vez que o processo de especiação é gradual, incongruências entre diversos métodos de delimitação são obviamente esperados. Logo, nesse estudo a morfologia foi utilizada como principal critério operacional de delimitação de espécies (i.e., linha de evidência), portanto ausência de evidências moleculares de que esses táxons são espécies diferentes não constitui evidência que contradiga a hipótese de que pertençam a linhagens evolutivas diferentes (de QUEIROZ, 2007), e podem, conseqüentemente, manter o status de espécies distintas.

Entretanto, o ponto de vista pragmático do DNA Barcoding que é a identificação de espécimes sem a necessidade da análise de caracteres morfológicos, não pode ser ignorado, e essas espécies devem ser identificadas como pertencentes ao complexo Evandroi em estudos que utilizem somente linhas de evidência da biologia molecular – ambos “single” e “multilocus” – para a separação de espécies.

6. Conclusão

Nós demonstramos a utilidade da taxonomia molecular por meio de “barcodes” de DNA para identificação e caracterização de espécies do subgênero *Evandromyia* (*Aldamyia*). Esse método “single-locus” permitiu a identificação de algumas espécies desse grupo, incluindo a detecção de diversidade críptica no qual pode indicar a presença de táxons distintos (espécies crípticas). Apesar disso, algumas espécies – *E. carmelinoi*, *E. evandroi*, *E. lenti* e *E. piperiformis* – apresentaram grande dificuldade de serem separadas pelas análises com o gene *COI*, sendo essa última corretamente delimitada apenas por métodos que não

requerem o monofiletismo recíproco das linhagens. Também foi demonstrado que a utilização de ferramentas “multilocus”, com o auxílio da amplificação dos marcadores *CYTB*, *CAC*, *PER* e *28S*, permitiu a identificação de *E. evandroi* como uma entidade biológica distinta de *E. lenti* e *E. carmelinoi*. Logo, os resultados indicam que a taxonomia molecular de *Evandromyia* (*Aldamyia*) é de grande complexidade, e deve ser utilizada, quando possível, com o auxílio de diferentes métodos e marcadores moleculares, e apenas de forma integrada à taxonomia morfológica dessas espécies.

7. Referências

- ADENIRAN, A.A. et al. Identification of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from leishmaniasis endemic areas in southeastern Mexico using DNA barcoding. *Ecology and Evolution*, v. 9, n. 23, p. 13543-13554, 2019.
- AGUIAR, G.M; VIEIRA, V.R. Regional distribution and habitats of Brazilian phlebotomine species. *Brazilian Sand Flies* (ed. by E. F. Rangel and J. J. Shaw) pp. 251-298. Springer, Cham. 2018.
- AMENT-VELÁSQUEZ, S.L et al. Homoplasious colony morphology and mito-nuclear phylogenetic discordance among Eastern Pacific octocorals. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 98, 373-381. 2016.
- AVISE, J.C. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts. 2000.
- AVISE, J.C et al. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual review of ecology and systematics*, v. 18, n. 1, p.489-522, 1987.
- AZPURUA, J et al. *Lutzomyia* sand fly diversity and rates of infection by *Wolbachia* and an exotic *Leishmania* species on Barro Colorado Island, Panama. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 4, n. 3, e627, 2010.
- BARRETTO, M. P. New subgenera of *Lutzomyia* Franca, 1924 (Diptera, Psychodidae, subfamily Phlebotominae). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 4, p. 91, 1962.
- BATES, P. A et al. Recent advances in phlebotomine sand fly research related to leishmaniasis control. *Parasites & vectors*, v. 8, n. 1, p. 131, 2015.
- BAUZER, L. G. S. R et al. The period gene and genetic differentiation between three Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis*. *Insect molecular biology*, v. 11, n. 4, p. 315-323, 2002.

- BEATI, L. et al. Systematic relationships among *Lutzomyia* sand flies (Diptera: Psychodidae) of Peru and Colombia based on the analysis of 12S and 28S ribosomal DNA sequences. *International journal for parasitology*, v. 34, n.2, p. 225-234, 2004.
- BARLEY, A.J; THOMSON, R.C. Assessing the performance of DNA barcoding using posterior predictive simulations. *Molecular Ecology*, v. 25, n. 9, p. 1944-1957. 2016.
- BENSON, D. A. et al. GenBank. *Nucleic acids research*, v.41, n. D1, D36-D42, 2012.
- BLAXTER, M et al. Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 360, n. 1462, p. 1935-1943, 2005.
- BOTTECCHIA, M. et al. Genetic Divergence in the cacophony IVS6 Intron Among Five Brazilian Populations of *Lutzomyia longipalpis*. *Journal of molecular evolution*, v. 58, n. 6, p. 754-761, 2004.
- BOUCKAERT, R. et al. An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS computational biology*, v. 15, n.4, e1006650, 2019.
- BOUCKAERT, R.R. DensiTree: making sense of sets of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, v. 26, n. 10, p.1372-1373, 2010.
- BRAZIL, R. P et al. Sand fly vectors of *Leishmania* in the Americas-a mini review. *Entomology, Ornithology & Herpetology*, v. 4, n.2, p. 1, 2015.
- BRAZIL, R. P et al. Biology of *Lutzomyia lenti* (Mangabeira) (Diptera: Psychodidae). *Anais Da Sociedade Entomológica Do Brasil*, v. 26, n. 1, p. 191–193, 1997.
- BROWN, S.D et al. Spider: an R package for the analysis of species identity and evolution, with particular reference to DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources*, 12(3): 562-565, 2012.
- CARRERO-SARMIENTO, D., ; HOYOS-LÓPEZ, R. Molecular identification and genetic diversity of *Lutzomyia gomezi* (Diptera: Psychodidae) using DNA-barcodes in Cordoba, Colombia. *Tropical Biomedicine*, v. 35, n. 1, p. 100-110, 2018.
- CARSTENS, B.C et al. How to fail at species delimitation. *Molecular ecology*, v. 22, n. 17, p. 4369-4383, 2013.
- CHASKOPOULOU, A et al. Species composition, activity patterns and blood meal analysis of sand fly populations (Diptera: Psychodidae) in the metropolitan region of Thessaloniki, an endemic focus of canine leishmaniasis. *Acta tropica*, v. 158, p. 170-176, 2016.
- CLEMENT, M et al. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular ecology*, v. 9, n. 10, p. 1657-1659, 2000.
- COHNSTAEDT, L. W et al. The population structure of *Lutzomyia verrucarum* (Diptera: Psychodidae), a *Bartonella bacilliformis* and *Leishmania peruviana* vector in Peru. *Journal of medical entomology*, v. 49, n. 1, p. 77-84, 2012.

- COLLINS, R.A; CRUICKSHANK, R.H. The seven deadly sins of DNA barcoding. *Molecular ecology resources*, v. 13, n.6, p. 969-975, 2013
- COLLINS, R.A et al. Barcoding's next top model: an evaluation of nucleotide substitution models for specimen identification. *Methods in Ecology & Evolution*, v. 3, n. 3, p. 457-465, 2012.
- CORTEZ, A. M. Vertical Stratification and Development Aspects of Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) in an Area of Atlantic Forest Tree Species in a Metropolitan Region in Northeastern Brazil. *Journal of Vector Ecology: Journal of the Society for Vector Ecology* v. 32, n. 2, p. 336–341, 2007.
- COSTA-LIMA, A.; ANTUNES, P.C.A. Sobre um novo phlebotomo encontrado no norte do Brasil. *O Brazil-Medico*, v. 50, n. 20, p. 419-422, 1936.
- DE QUEIROZ, K. A unified concept of species and its consequences for the future of taxonomy. *Proc. Calif. Acad. Sci*, v. 56, p. 196–215, 2005.
- COSTA, C. R. L et al. Genetic structuring and fixed polymorphisms in the gene period among natural populations of *Lutzomyia longipalpis* in Brazil. *Parasites & vectors*, v. 8, n. 1, p. 193, 2015.
- DAMASCENO, R.G.; CAUSEY, O.R.; AROUCK, R. Estudos sobre *Flebotomus* no Vale Amazônico: Parte V-Descrição de *F. williamsi*, *F. deanei*, *F. carvalhoi*, *F. lopesi*, *F. castanheirai*, *F. fariasi*, *F. baityi* e *F. campbelli*:(Diptera-Psychodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 43, n. 1, p. 1-30, 1945.
- DEBIASSE, M.B.; HELLBERG, M.E. Discordance between morphological and molecular species boundaries among Caribbean species of the reef sponge *Callyspongia*. *Ecology and Evolution*, v. 5, n. 3, p. 663-675, 2015.
- DEPAQUIT, J. Molecular systematics applied to Phlebotomine sandflies: Review and perspectives. *Infection, Genetics and Evolution*, v.28, p. 744-756, 2014.
- DEVITT, T.J et al. Species delimitation in endangered groundwater salamanders: Implications for aquifer management and biodiversity conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 116, n. 7, p. 2624-2633, 2019.
- DMITRIEV, D. A.; RAKITOV, R. A. Decoding of superimposed traces produced by direct sequencing of heterozygous indels. *PLoS computational biology*, v. 4, n. 7, e1000113, 2008.
- DOKIANAKIS, E et al. Identification of wild-caught phlebotomine sand flies from Crete and Cyprus using DNA barcoding. *Parasites & vectors*, v. 11, n. 1, p. 94, 2018.
- DOKIANAKIS, E et al. sequencing confirms PCR-RFLP identification of wild caught *Larrousius* sand flies from Crete and Cyprus. *Acta tropica*, v. 164, p. 314-320, 2016.
- DRUMMOND, A. J. et al. Estimating mutation parameters, population history and genealogy simultaneously from temporally spaced sequence data. *Genetics*, v. 161, n. 3, p. 1307-1320, 2002.

- EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, v. 32, n. 5, p. 1792-1797, 2004.
- ESSELSTYN, J.A et al. Single-locus species delimitation: a test of the mixed Yule–coalescent model, with an empirical application to Philippine round-leaf bats. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 279, n. 1743, p. 3678-3686, 2012.
- FLOCH, H. & ABONNENC E. Phlébotomes do Guyana Française. (XIII). Description do deux nouvelles femelles. *Inst. Pasteur Guyane*, v. 98, n. 4, 1945.
- FLORIN, D. A; REBOLLAR-TÉLLEZ, E. A. Divergence of *Lutzomyia* (*Psathyromyia*) *shannoni* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) is indicated by morphometric and molecular analyses when examined between taxa from the southeastern United States and Southern Mexico. *Journal of medical entomology*, v. 50, n. 6, p. 1324-1329, 2013.
- FLOT, J. F. Champuru 1.0: a computer software for unraveling mixtures of two DNA sequences of unequal lengths. *Molecular Ecology Notes*, v. 7, n. 6, p. 974-977, 2007.
- FOLMER, O et al. DNA primers for amplification of mitochondrial Cytochrome C Oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol*, v. 3, p. 294–299, 1994.
- FONTELES, R. S. et al. Detection of *Leishmania* DNA and Blood Meal Identification in Sand Flies (Diptera: Psychodidae) From Lençóis Maranhenses National Park Region, Brazil. *Journal of medical entomology*, v. 55, n. 2, p. 445-451, 2018.
- FUJISAWA, T; BARRACLOUGH, T. G. Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent approach: a revised method and evaluation on simulated data sets. *Systematic biology*, v. 62, n. 5, p. 707-724, 2013.
- FUJITA, M.K et al. Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 27, n. 9, p. 480-488, 2012.
- FUNK, D.J; OMLAND, K.E. Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, v. 34, n. 1, p. 397-423, 2003.
- GAJAPATHY, K et al. DNA barcoding of Sri Lankan phlebotomine sandflies using cytochrome c oxidase subunit I reveals the presence of cryptic species. *Acta. Trop*, v. 161, p. 1–7, 2016.
- GALATI, E. A. B. Phylogenetic systematics of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) with emphasis on American groups. *Bol Dir Malariol San Amb*, v. 35, Supl 1, p. 133-142, 1995.
- GALATI, E.A.B. Morphology and Terminology of Adults and Identification of the American Taxa. In: Rangel, E.F., Shaw, J.J., editors. *Brazilian Sand Flies* (pp. 9-212). Springer, Cham. 2018.
- GALATI, E.A.B. Morfologia, terminologia de adultos e identificação dos táxons da América. In: Rangel, E.F., Lainson, R., editors. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Fiocruz; pp. 53–175. 2003.

- GALEN, S.C et al. Integrating coalescent species delimitation with analysis of host specificity reveals extensive cryptic diversity despite minimal mitochondrial divergence in the malaria parasite genus *Leucocytozoon*. *BMC evolutionary biology*, v. 18, n. 1, p.128, 2018.
- GALTIER, N et al. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular ecology*, v. 18, n. 22, p. 4541-4550, 2009.
- GLEZ-PEÑA, D et al. ALTER: program-oriented conversion of DNA and protein alignments. *Nucleic acids research*, v. 38, suppl 2, W14-W18, 2010.
- GODOY, R. E.; CUNHA, A. E. F. L.; GALATI, E. A. B. Description of *Evandromyia piperiformis* sp. nov. (Diptera: Psychodidae). *Journal of medical entomology*, v. 55, n. 1, p. 128-136, 2017.
- GODOY, R. E et al. Comparative study of the phlebotomine sand fly species (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the genera *Nyssomyia* Barretto, 1962, *Bichromomyia* Artemiev, 1991, and *Migonemyia* Galati, 1995, vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Zootaxa*, v. 3838, n. 5, p. 501, 2014.
- GODOY, R. E et al. Geometric morphometry of the head in sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), an alternative approach to taxonomy studies. *Zootaxa*, v. 4504, n. 4, p. 566-576, 2018.
- GODOY, R.E; CUNHA, A.E; GALATI, E.A. Description of *Evandromyia piperiformis* sp. nov. (Diptera: Psychodidae). *Journal of medical entomology*, v. 55, n. 1, p. 128-36, 2017.
- GRACE-LEMA, D. M et al. A phylogeny of sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), using recent Ethiopian collections and a broad selection of publicly available DNA sequence data. *Syst Entomol*, v. 40, p. 733-744, 2015.
- GUTIÉRREZ, M. A. C., et al. DNA barcoding for the identification of sandfly species (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in Colombia. *PLoS One*, v. 9, e85496, 2014.
- HAMARSHEH, O et al. Genetic structure of Mediterranean populations of the sandfly *Phlebotomus papatasi* by mitochondrial cytochrome b haplotype analysis. *Medical and veterinary entomology*, v. 21, 3, p. 270-277, 2007.
- HART, M. W; SUNDAY, J. Things fall apart: Biological species form unconnected parsimony networks. *Biology Letters*, v. 3, n. 5, p. 509–512, 2007.
- HEBERT, P. D; CYWINSKA, A., BALL, S. L; DEWAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, v 270, n. 1512, p. 313-321, 2003.
- HEBERT, P.D et al. Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS biology*, v. 2, n. 10, p.e312, 2004.
- HILLIS, D. M; DIXON, M. T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly review of biology*, v. 66, n. 4, p. 411-453, 1991.
- HUDSON, R.R; COYNE, J.A. Mathematical consequences of the genealogical species concept. *Evolution*, v. 56, n. 8, p. 1557-1565, 2002.

INTERNATIONAL COMMISSION ON ZOOLOGICAL NOMENCLATURE (ICZN). “Flebotomus” Rondani, 1840: (Class Insecta, Order Diptera). Emendation of name to “Phlebotomus”. *Bull ZoolNomencl*, v. 4, p. 358–359, 1950.

JIN, Y et al. Intraspecific lineages of the lizard *Phrynocephalus putjata* from the Qinghai-Tibetan Plateau: Impact of physical events on divergence and discordance between morphology and molecular markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 71, p. 288-297, 2014.

JÚNIOR, A. N. et al. Emerging focus of tegumentary leishmaniasis around “Parque Nacional Dos Lençóis Maranhenses”, Northeast Brazil. *Gazeta Medica da Bahia*, v. 79, p. 103-109. 2009.

KASAP, O.E et al. Revision of the species composition and distribution of Turkish sand flies using DNA barcodes. *Parasites & vectors*, v. 12, n. 1, p.410, 2019.

KEKKONEN, M et al. Delineating species with DNA barcodes: a case of taxon dependent method performance in moths. *PLoS One*, v. 10, n. 4, e0122481, 2015.

KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clinics in dermatology*, v. 17, n. 3, p. 279-289, 1999.

KNOWLES, L.L; CARSTENS, B.C. Delimiting species without monophyletic gene trees. *Systematic Biology*, v. 56, n. 6, p. 887-895, 2007.

KODANDARAMAIAH, U et al. Deceptive single-locus taxonomy and phylogeography: Wolbachia-associated divergence in mitochondrial DNA is not reflected in morphology and nuclear markers in a butterfly species. *Ecology and Evolution*, v. 3, n. 16, p. 5167-5176, 2013.

KONOPKA, R. J; BENZER, S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 68, n. 9, p. 2112-2116, 1971.

KRÜGER, A et al. The Sandflies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) in military camps in northern Afghanistan (2007–2009), as identified by morphology and DNA ‘barcoding’. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, v. 105, n. 2, p. 163-176, 2011.

KUMAR, N. P; SRINIVASAN, R; JAMBULINGAM, P. DNA barcoding for identification of sand flies (Diptera: Psychodidae) in India. *Molecular Ecology Resources*, v. 12, n. 3, p. 414-420, 2012.

KUMAR, S; STECHER, G; TAMURA, K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.

LAINSON R et al. Leishmaniasis in Brazil: XIII. Isolation of *Leishmania* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*), and observations on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in north Para State. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 73, n. 2, 1979.

LAINSON, R; J. J. SHAW. "Leishmania (Viannia) Naiffi Sp. N., a Parasite of the Armadillo, *Dasyus Novemcinctus* (L.) in Amazonian Brazil." *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*, v. 64, p. 3–9, 1989.

LAINSON, R et al. "Leishmaniasis in Brazil: Xvi. Isolation and Identification of Leishmania Species from Sandflies, Wild Mammals and Man in North Para State, with Particular Reference to *L. Braziliensis Guyanensis* Causative Agent of "pian-Bois." *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 75, n. 4, p. 530–36, 1981.

LAURITO, M; ONTIVERO, I.M; ALMIRÓN, W.R. Increasing the digital repository of DNA barcoding sequences of sand flies (Psychodidae: Phlebotominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 114, 2019.

LE PONT, F; DESEJUX, P. Phlebotomes de Bolivie - iii. Description de *Lutzomyia andersoni* n. sp. (Diptera, Psychodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 83, n. 4, p. 421-425, 1988.

LEON, R et al. Ecuadorian sand-flies: two new species of the genus *Evandromyia* (Diptera, Psychodidae). *Bulletin de la Société Entomologique de France*, v. 114, n. 2, p. 143-148, 2009.

LIBRADO, P; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, v. 25, n. 11, p. 1451-1452, 2009.

LINS, R. M. M. A et al. Molecular evolution of the cacophony IVS6 region in sandflies. *Insect molecular biology*, v. 11, n. 2, p. 117-122, 2002.

LOPES, J.V et al. Entomological Studies in Itaúna, Brazil, an Area with Visceral Leishmaniasis Transmission: Fauna Survey, Natural Leishmania Infection, and Molecular Characterization of the Species Circulating in Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*, v. 56, n. 5, p. 1368-1376, 2019.

LOZANO-SARDANETA, Y.N et al. DNA barcoding and fauna of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from Los Tuxtlas, Veracruz, Mexico. *Acta Tropica*, v. 201, p.105220,2020.

MADDISON, W.P. Gene trees in species trees. *Systematic Biology*, v. 46, n. 3, p. 523-536, 1997.

KNOWLES, L.L; CARSTENS, B.C. Delimiting species without monophyletic gene trees. *Systematic Biology*, v. 56, n. 6, p. 887-895, 2007.

MAINGON, R. D et al. The *Lutzomyia longipalpis* species complex: does population sub-structure matter to Leishmania transmission?. *Trends in parasitology*, v. 24, n.1, p.12-17, 2008.

MANGABEIRA, O. 3ª Contribuição ao estudo dos Flebotomus: *Evandromyia* n. subg.:(Diptera: Psychodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 36, n. 2, p. 215-223, 1941.

MANGABEIRA, O. Sobre duas novas especies de Flebotomus (Diptera: Psychodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 33, n. 3, p. 349-356, 1938.

- MAROLI, M et al. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and veterinary entomology*, v. 27, n. 2, p. 123-147, 2013.
- MARTINS, A.V; FALCÃO, A.L; DA SILVA, J.S. Studies on phlebotomus of the state of Minas Gerais. vi: description of *Lutzomyia termitophila* sp. n. and *Lutzomyia cipoensis* sp. n. (Diptera, Psychodidae). *Revista Brasileira de Biologia*, v. 24, p. 309-315, 1964.
- MARTINS, A.V; FALCÃO, A.L; SILVA, J.D. Notas sobre os flebotomos do território de Rondônia, com a descrição de seis espécies novas (Diptera, Psychodidae). *Rev Bras Biol.* V. 35, p. 1-20, 1965.
- MARTINS, F et al. Diversidade e frequência da fauna flebotomínea (Diptera: Psychodidae) em áreas com transmissão de leishmaniose, no Estado de Goiás. *Revista de Patologia Tropical*, v. 31, n. 2, p. 221–224, 2002.
- MAZZONI, C. J et al. Multilocus analysis of introgression between two sand fly vectors of leishmaniasis. *BMC evolutionary biology*, v. 8, n. 1, p. 141, 2008.
- MAZZONI, C. J et al. Molecular evolution of the period gene in sandflies. *Journal of molecular evolution*, v. 55, n. 5, p. 553-562, 2002.
- MAZZONI, C. J et al. Molecular polymorphism, differentiation and introgression in the period gene between *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia whitmani*. *BMC evolutionary biology*, v. 6, n. 1, p. 85, 2006.
- MEIER, R. et al. DNA barcoding and taxonomy in Diptera: a tale of high intraspecific variability and low identification success. *Systematic Biology*, v. 55, n. 5, p. 715-728, 2006.
- MEJÍA, Á et al. Bionomic aspects of *Lutzomyia evansi* and *Lutzomyia longipalpis*, proven vectors of *Leishmania infantum* in an endemic area of non-ulcerative cutaneous leishmaniasis in Honduras. *Parasites & vectors*, v. 11, n. 1, p. 15, 2018.
- MORITZ, C.T.E.D; DOWLING, T.E; BROWN, W.M. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and systematics*, v. 18, n. 1, p.269-292, 1987.
- NEWSTEAD, R. Notes on Phlebotomus, with descriptions of new species. *Bulletin of Entomological Research*, v. 5, n. 2, p. 179-192, 1914.
- NICHOLS R. Gene trees and species trees are not the same. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 16, n. 7, p. 358-364, 2001.
- NORDBORG, M. Coalescent theory. *Handbook of statistical genetics*, 2, 843-877. 2001.
- NZELU, C. O; CÁCERES, A. G; M. J. ARRUNÁTEGUI-JIMÉNEZ. DNA barcoding for identification of sandfly species (Diptera: Psychodidae) from leishmaniasis-endemic areas of Peru. *Acta Trop*; v. 145, p. 45–51, 2015.
- PARADIS, E; SCHLIEP, K. ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. *Bioinformatics*, v. 35, n. 3, p. 526-528, 2018.

- PECH-MAY, A et al. Genetic structure and divergence in populations of *Lutzomyia cruciata*, a phlebotomine sand fly (Diptera: Psychodidae) vector of *Leishmania mexicana* in southeastern Mexico. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 16, p. 254-262, 2013.
- PEIXOTO, A.A et al. New molecular markers for phlebotomine sand flies. *International journal for parasitology*, v. 31, n. 5-6, p. 635-639, 2001.
- PEIXOTO, A. A; HALL, J. C. Analysis of temperature-sensitive mutants reveals new genes involved in the courtship song of *Drosophila*. *Genetics*, v. 148, n. 2, p. 827-838, 1998.
- PESSON, B et al. Sandflies of the *Phlebotomus perniciosus* complex: mitochondrial introgression and a new sibling species of *p. Longicuspis* in the moroccan rif. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 18, n. 1, p. 25-37, 2004.
- PINTO, I. S et al. DNA barcoding of Neotropical sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): species identification and discovery within Brazil. *PLoS One*, v. 10, n. 10, 2015.
- DARRIBA, D et al. ModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, v. 9, n. 8, p. 772, 2012.
- POLSEELA, R et al. Towards monitoring the sandflies (Diptera: Psychodidae) of Thailand: DNA barcoding the sandflies of Wihan Cave, Uttaradit. *Mitochondrial DNA Part A*, v. 27, n. 5, p. 3795-3801, 2016.
- PONS J et al. Sequencebased species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Syst. Biol*, v. 55, p. 595–609, 2006.
- PUILLANDRE, N et al. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*, v. 21, p. 1864–1877, 2012.
- QUEIROZ, K. Species concepts and species delimitation. *Systematic biology*, v. 56, n. 6, p. 879-886, 2007.
- RANNALA, B; YANG, Z. Efficient Bayesian species tree inference under the multispecies coalescent. *Syst Biol*, v. 66, p. 823–842, 2017.
- RANNALA, B; YANG, Z. Bayes estimation of species divergence times and ancestral population sizes using DNA sequences from multiple loci. *Genetics*, v. 164, n. 4, p. 1645-1656, 2003.
- RATNASINGHAM, S; HEBERT, P. D. BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular ecology notes*, v. 7, n. 3, p. 355-364, 2007.
- READY, P. D. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annual Review of Entomology*, 58, 227-250. 2013.
- READY, P. D et al. The ecology of *Lutzomyia umbratilis* Ward & Fraiha (Diptera: Psychodidae), the major vector to man of *Leishmania braziliensis guyanensis* in north-eastern Amazonian Brazil. *Bulletin of Entomological Research*, v. 76, n. 1, p. 21, 1986.

- REBÊLO, J. M. M et al. Ocorrência de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em focos de leishmanioses, em área de ecoturismo do entorno do Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 26, p. 195-198, 2010.
- REBÊLO, J. M. M et al. Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) de área endêmica de leishmaniose na região dos cerrados, Estado do Maranhão, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 15, n. 3, p. 623-630, 1999.
- RÊGO, F. D et al. Molecular detection of *Leishmania* in phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from a cutaneous leishmaniasis focus at Xakriabá Indigenous Reserve, Brazil. *PLoS One*, v. 10, n. 4, 2015.
- RODRIGUES, B. L et al. DNA Barcoding Reveals Hidden Diversity of Sand Flies (Diptera: Psychodidae) at Fine and Broad Spatial Scales in Brazilian Endemic Regions for Leishmaniasis. *Journal of medical entomology*, v. 55, n. 4, p. 893-901, 2018.
- ROMERO-RICARDO, L. et al. DNA barcoding to identify species of phlebotomine sandfly (Diptera: Psychodidae) in the mixed leishmaniasis focus of the Colombian Caribbean. *Acta Trop*, v. 159, p. 125–131, 2016.
- ROSS, H.A. The incidence of species-level paraphyly in animals: a re-assessment. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 76, p. 10-17, 2014.
- RYAN, L et al. New Phlebotomine Sandflies of the Walkeri group (Diptera: Psychodidae) from Pará State, Brazil, with a pictorial key 1. *Mem. Int. Oswaldo Cruz*, v 81, n. 3, p. 323-331, 1986.
- SANGUINETTE, CRISTIANI DE CASTILHO et al. “Comparison of the Phlebotomine (Diptera: Psychodidae) Fauna of Urban, Transitional, and Wild Areas in Northern Minas Gerais, Brazil.” *Parasites and Vectors*, v. 8, n. 1, p. 1–8, 2015.
- SANTOS, M. A et al. tcsBU: a tool to extend TCS network layout and visualization. *Bioinformatics*, v. 32, n. 4, p. 627-628, 2015.
- SCARPASSA, V. M; ALENCAR, R. B. Molecular taxonomy of the two *Leishmania* vectors *Lutzomyia umbratilis* and *Lutzomyia anduzei* (Diptera: Psychodidae) from the Brazilian Amazon. *Parasites & vectors*, v. 6, n. 1, p. 258, 2013.
- SHAW, J. J; LAINSON, R. Leishmaniasis in Brazil: II. Observations on enzootic rodent leishmaniasis in the lower amazon region—the feeding habits of the vector, *Lutzomyia flaviscutellata* in reference to man, rodents and other animals. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 62, n. 3, p. 396–405, 1968.
- SHERLOCK, I.A. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 91, n. 6, p. 671-683, 1996.
- SHIMABUKURO, P. H. F; DE ANDRADE, A. J; GALATI, E. A. B. Checklist of American sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): genera, species, and their distribution. *ZooKeys*, v. 660, 67, 2017.
- SILVESTRO, D; MICHALAK, I. raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. *Organisms Diversity & Evolution*, v. 12, n. 4, p. 335-337, 2012.

- SOUZA, N. A; BRAZIL, R. P; ARAKI, A. S. The current status of the *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) species complex. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 112, n. 3, p. 161-174, 2017.
- SRIVATHSAN, A; MEIER, R. On the inappropriate use of Kimura-2-parameter (K2P) divergences in the DNA-barcoding literature. *Cladistic*, v. 27, n. 2, p. 190-194, 2012.
- SRINIVASAN, R; JAMBULINGAM, P; KUMAR, N. P. *Sergentomyia* (*Neophlebotomus*) *monticola*, a new species of sand fly (Diptera: Psychodidae) from the Western Ghats, Thiruvananthapuram District, Kerala, India. *Acta tropica*, v. 137, p. 74-79, 2014.
- STAMATAKIS, A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, v. 30, n. 9, p. 1312-1313, 2014.
- STANKOWSKI, S; JOHNSON, M.S. Biogeographic discordance of molecular phylogenetic and phenotypic variation in a continental archipelago radiation of land snails. *BMC Evolutionary Biology*, v. 14, n. 1, p. 2, 2014.
- STOECKLE, M. Taxonomy, DNA, and the bar code of life. *BioScience*, v. 53, n. 9, p. 796-797, 2003.
- STUCKY, B. J. SeqTrace: a graphical tool for rapidly processing DNA sequencing chromatograms. *Journal of biomolecular techniques*, v. 23, n. 3, p. 90, 2012.
- SUKANTAMALA, J et al. Unexpected diversity of sandflies (Diptera: Psychodidae) in tourist caves in Northern Thailand. *Mitochondrial DNA Part A*, v. 0, p. 1–6, 2016.
- TEMPLETON, A. R; CRANDALL, K. A; SING, C. F. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics*, v. 132, n. 2, p. 619-633, 1992.
- THEODOR, O. On the classification of American Phlebotominae. *Journal of Medical Entomology*, v. 2, n. 2, p. 171-197, 1965.
- THOMPSON, J. D; HIGGINS, D. G; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.
- VAN VELZEN, R., et al. DNA barcoding of recently diverged species: relative performance of matching methods. *PLoS one*, v. 7, n. 1, p.e30490, 2012.
- VIDIGAL, T.H et al. Integrative taxonomy of the neotropical genus *Omalonyx* (Elasmognatha: Succineidae). *Zoologica Scripta*, v. 47, n. 2, p. 174-186, 2018.
- VIVERO, R. J et al. DNA barcode for identification of immature stages of sand flies (Diptera: Psychodidae) collected from natural breeding sites. *Zootaxa*, v. 4277, n. 2, p. 228-236, 2017.
- WARD, R. D et al. "Leishmaniasis in Brazil .8. Observations on Phlebotomine-Fauna of an Area Highly Endemic for Cutaneous Leishmaniasis, in Serra-Dos-Carajas, Para-State." *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 67, n. 2, p. 174–83, 1973.

- WHITWORTH, T. L et al. "DNA Barcoding Cannot Reliably Identify Species of the Blowfly Genus *Protophthora* (Diptera: Calliphoridae)." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 274, n. 1619, p. 1731–39, 2007.
- YANG, Z. The BPP program for species tree estimation and species delimitation. *Curr. Zool.* V. 61, p. 854-865, 2015.
- YANG, Z; RANNALA, B. Bayesian species delimitation using multilocus sequence data. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, n. 20, p. 9264-9269, 2010.
- YANG, Z; RANNALA, B. Unguided species delimitation using DNA sequence data from multiple loci. *Mol. Biol. Evol.* v. 31, p. 3125-3135, 2014.
- YOGESWARI, S; SRINIVASAN, R. A Note on Variations in Morphological Features of the Phlebotomine Sand Fly *Sergentomyia bailyi* (Diptera: Psychodidae) in a Population From Pondicherry UT, India. *Journal of medical entomology*, v. 53, n. 3, p. 712-716, 2016.
- YOUNG, D. G; N. A. DUNCAN. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem. Am. Entomol. Inst.* v. 54, p. 1–881, 1994.
- ZACHOS, F.E et al. Species inflation and taxonomic artefacts—A critical comment on recent trends in mammalian classification. *Mammalian Biology-Zeitschrift für Säugetierkunde*, v. 78, n. 1, p. 1-6, 2013.
- ZHANG, C et al. Evaluation of a Bayesian coalescent method of species delimitation. *Systematic biology*, v. 60, n. 6, p.747-761, 2011.
- ZHANG, J et al. A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics*, v. 29, n. 22, p. 2869-2876, 2013.