

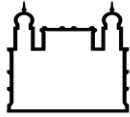
**MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Tese de doutorado no Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e  
Saúde– Convênio no Programa de Doutorado em Ciências**

**EMANUELLE DE SOUSA FARIAS**

**Diversidade de maruins (Diptera: Ceratopogonidae) na Amazônia  
Brasileira e o uso da Taxonomia Integrada**

**MANAUS  
Agosto de 2021**



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
Fundação Oswaldo Cruz



**ILMD** INSTITUTO LEÔNIDAS  
& MARIA DEANE  
Fiocruz Amazônia

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ-IOC/INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA  
DEANE-ILMD**

**Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde– Convênio no  
Programa de Doutorado em Ciências**

**EMANUELLE DE SOUSA FARIAS**

matriculada sob o nº 16.02.48.008

**DIVERSIDADE DE MARUINS (DIPTERA:  
CERATOPOGONIDAE) NA AMAZÔNIA BRASILEIRA E O USO  
DA TAXONOMIA INTEGRADA**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde–Convênio no Programa de Doutorado em Ciências como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biodiversidade e Saúde.**

**Orientador: Dr. Felipe Arley Costa Pessoa**

**MANAUS**

**Agosto, 2021**

de Sousa Farias, Emanuelle.

Diversidade de maruins (Diptera: Ceratopogonidae) na Amazônia Brasileira e o uso da Taxonomia Integrada / Emanuelle de Sousa Farias. - Rio de Janeiro, 2021.

273 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde, 2021.

Orientador: Felipe Arley Costa Pessoa.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Culicomorpha. 2. Culicoides. 3. Leptoconops. 4. Atrichopogon. I. Título.

**Dedico a Deus, seu fôlego de vida em mim foi meu sustento nessa jornada. A minha mãe que incansavelmente segura a minha mão; ao meu pai pelo seu carinho e amor; e ao meu orientador Felipe Pessoa que sempre esteve presente em toda minha jornada científica.**

**O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço as minhas filhas Ana Sarah Farias e Giovana Gabriele Farias pelo apoio, amor e compreensão e ao meu namorado Samuel Nascimento, pelo companheirismo, amor, incentivo, orações e por ter acreditado em mim, mesmo quando eu já não acreditava. Sem o apoio e incentivo deles, não teria conseguido.

Ao Dr. Moisés Thiago de Souza Freitas e ao Dr. James Lee Crainey, pela ajuda nas análises moleculares, foi de grande importância para o desenvolvimento da tese.

A Dra. e professora Ana Carolina Vicente-IOC pela ajuda no sequenciamento junto à plataforma do IOC, mas principalmente por suas aulas e discussões na disciplina, muitíssimo importante para minha formação.

A Dra. Fernanda Freitas, laboratório de Genética Molecular de Microrganismos-IOC, por me ensinar a preparar placas para o sequenciamento e por ter realizado essa parte tão importante do estudo.

A Dra. Jacenir Mallete e ao Ricardo, por terem me recebido no Laboratório de Transmissores de Leishmanioses, onde pude acompanhar a técnica de microscopia de varredura e pelas imagens de microscopia de varredura.

A Dra. Yara Maria Traub-Cseko e a todos do Laboratório de Biologia Molecular de Parasitos e Vetores-IOC, que me receberam no programa de mobilidade acadêmica, e por ter participado das reuniões científicas de seu grupo de pesquisa.

Ao Dr. Antonio Jorge Tempone, pela atenção e ajuda no aprendizado das técnicas de biologia Molecular.

Ao Dr. Sérgio Luiz Bessa Luz, pela oportunidade de fazer parte do Programa CPQLMD-002-FIO-16.

A Dra. Claudia María Ríos-Velásquez, pela ajuda nos pedidos e compras dos reagentes, bem como, nas análises de Morfometria Geométrica.

A Dra. Ruth Keppler a Dra. Neusa Hamada, por ajudar-me a participar das aulas de morfometria geométrica oferecida em seu laboratório no INPA.

A Jokebede Melynda e a Sanmya Silva dos Santos, pela ajuda na técnica que considero mais difícil e trabalhosa que é a dissecação dos maruins com até 2 mm; montagem das lâminas; e pela amizade e incentivo.

Ao Luiz de Souza Coelho, pela ajuda nas coletas de maruins no município de Oriximiná-PA, pela ajuda nas análises de morfometria geométrica, e principalmente pelo incentivo durante o doutorado.

Ao Jordam William Pereira-Silva, pelas coletas de maruins nos municípios de Itaituba-PA e Presidente Figueiredo-AM, ser o primeiro a me ensinar extração de DNA, e principalmente incentivo e apoio.

Ao Eric Fabrício Marialva, pelas coletas de maruins no município de Óbidos-PA. Ao Luís Paulo de Carvalho pelas coletas de maruins em Porto Velho-RO e a Amanda Picelli, pela ajuda nas coletas do município de Marapanim-PA.

Ao Jhonata Andrade, pela ajuda na confecção dos mapas e principalmente pelo apoio e amizade.

Ao Francisco Augusto da Silva Ferreira e a Juciane Conceição da Silva, pelo apoio, conversas e parceria no curso de morfometria geométrica na UFAM.

A Valdinete Alves, Marla Alves, Josy Caldas e Tullio Romão pela parceria nos trabalhos das disciplinas, agradeço pelo apoio, força e por todos os momentos e conversas compartilhadas.

A todos os colegas do laboratório EDTA, do Instituto Leônidas e Maria Deane-ILMD.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde, especialmente à secretária Luciana Mara e ao coordenador Dr. Cleber Galvão.

Ao Programa CPQLMD-002-FIO-16 (Programa de fomento ao ensino e à pesquisa do ILMD-PFEP), coordenado pelo Dr. Sérgio Luiz Bessa Luz, pela bolsa recebida nos quatro anos do doutorado.

A Pós-Graduação do ILMD, pela bolsa recebida nesse último ano de doutorado.

Ao Programa de Mobilidade Acadêmica, que custeou minha ida ao IOC-FIOCRUZ, para aprendizado de parte das técnicas usadas nesse estudo.

Ao Alojamento Hélio Fraga da FIOCRUZ, pela hospedagem durante programa de mobilidade acadêmica.

Aos membros da banca por terem aceitado o convite de participar na avaliação deste trabalho.



**“Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa ignorância” (John F. Kennedy).**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ-IOC/INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE-ILMD**

**DIVERSIDADE DE MARUINS (DIPTERA: CERATOPOGONIDAE) NA AMAZÔNIA  
BRASILEIRA E O USO DA TAXONOMIA INTEGRADA**

**RESUMO**

**TESE DE DOUTORADO EM BIODIVERSIDADE E SAÚDE**

Emanuelle de Sousa Farias

A família Ceratopogonidae pertencem aos clados Diptera, Culicomorpha e /Chironomoidea, é grupo irmão de Chironomidae. Espécies dessa família ocorrem em praticamente todas as áreas terrestres do planeta. Os adultos de ceratopogonídeos neotropicais podem ser encontrados desde áreas litorâneas, até em altitudes elevadas. Os imaturos podem ser encontrados em ambientes aquáticos, subaquáticos e algumas espécies são terrestres. Os machos e fêmeas, alimentam-se de néctar de plantas. Numerosas espécies de *Leptoconops* e *Culicoides* são pragas de humanos e animais, com maioria das espécies hematófagas, tendo picadas irritantes e transmitindo uma grande variedade de vírus, protozoários e nematoides, incluindo algumas doenças importante como: Vírus do Oropouche e Vírus da Língua Azul por *Culicoides* e mansonelose por *Culicoides* e *Leptoconops*. Os machos e as fêmeas de muitos *Atrichopogon* adultos alimentam-se de néctar, fornecendo assim, importante serviço para o ecossistema, provavelmente são polinizadores de inúmeras outra planta na América tropical, possivelmente incluindo manga (*Mangifera indica*) e várias palmeiras, além disso, a sucção de hemolinfa de grandes insetos sugere a possibilidade de que eles possam estar envolvidos na transmissão de vírus de um inseto hospedeiro para outro, principalmente entre as lagartas. A sistemática dos três gêneros identificados nesse estudo, *Atrichopogon*, *Culicoides* e *Leptoconops*, baseiam-se principalmente em caracteres morfológicos, que algumas vezes, encontram dificuldades como identificação de espécies crípticas ou em espécies que apresentam plasticidade fenotípica, dificultando a identificação destas a nível específico. Estudos de taxonomia integrada que agregam caracteres morfológicos, morfométricos e genéticos, em diversas famílias de dípteros, inclusive vetores, têm sido importantes para elucidar diversidade biológica oculta. A Morfometria Geométrica-MG é uma ferramenta que corrobora os suportes moleculares para diferenciação de espécies, bem como, espécies crípticas e estudo de população. Outro benefício da MG é que, por meio da análise de

regressão multivariada, o efeito alométrico (resíduo) pode ser facilmente removido das análises de formas, tornando possível comparar formas com interferência mínima de tamanhos diferentes. Estudos moleculares têm gerado conhecimento e tem sido uma ferramenta muito importante, aumentando a capacidade de identificar espécies e caracterizar a biodiversidade, bem como, avaliar a variabilidade genética inter e intrapopulacional de diversos organismos relacionando com a distribuição das espécies em habitats locais, ecossistemas, paisagens, continentes e outros. Ferramentas moleculares utilizadas para mostrar variação genética são algumas vezes, mais eficientes na discriminação de subdivisões populacionais intraespecíficas do que a biometria morfológica tradicional. A correta identificação de um inseto de interesse ecológico/econômico/epidemiológico é premissa básica para a solução de qualquer problema entomológico. O objetivo desse estudo foi ampliar o conhecimento sobre a biodiversidade de gêneros representativos das três subfamílias de maruins, coletadas em regiões distintas na Amazônia, por meios de taxonomia tradicional e integrada. Os espécimes foram montados entre lâmina/lamínula em método fenol-bálsamo, identificados a nível de espécie, através de observações por microscopia óptica, seguindo as chaves de identificação, artigos com descrição de espécies e comparação com espécies depositadas na coleção de Ceratopogonidae do Instituto Oswaldo Cruz. Na taxonomia integrada, feita para os gêneros *Leptoconops* e *Culicoides*, usou-se a MG e também a ferramenta molecular DNA Barcode. O estudo faunístico realizado em 12 municípios em cinco estados da Amazônia brasileira registrou espécie anteriormente desconhecido no estado do Amazonas (*C. amazonicus*, *C. forattinii*, *C. jurutiensis*, *C. lyrinotatus*), no estado do Pará (*C. rhombus* e *C. kuripako*) e Maranhão (*L. brasiliensis*). A diversidade do grupo de espécies com asas manchadas do gênero *Atrichopogon*, aumentou para 15 espécies, com o achado de três novas espécies: *A. janseni* sp nov.; *A. riopardensis* sp nov.; e *A. sergioluzi* sp nov. Foi achado um novo registro de espécie do gênero *Culicoides* para o Brasil (*C. macrostigma*) e descrito os machos das espécies *C. jurutiensis* e *C. plaumanni*. Em *Leptoconops*, os machos não descritos de *L. brasiliensis* foi coletado no Município de Marapanim e descrito neste trabalho, assim como, a fêmea redescrita. Os vetores, *C. paraensis* foi encontrado principalmente em peridomicílios, área urbana e rural e *C. insignis* em peridomicílios próximos a currais, área rural. Aqui, revisamos a distribuição das 40 espécies de ceratopogonídeos para a Amazônia brasileira. Na taxonomia integrativa comparando populações de *Leptoconops*: a MG comparada as três populações de *L. brasiliensis* apontou que as populações Humaitá e Itaituba como as mais semelhantes e a população de Marapanim como as

mais divergentes em relação as outras duas, sendo que as análises de componente principal mostram que populações de *L. brasiliensis* de Humaitá e Itaituba se sobrepõem, em parte, no morfoespaço; na análise de distância genética feitas com DNA Barcode foram congruentes com os resultados de MG, de asa, para as populações de *Leptoconops brasiliensis* de Itaituba e Marapanim, onde a AVC formou um claro agrupamento, e a distância genética entre as duas populações foi de aproximadamente 6%. As populações de Itaituba e Marapanim estão distantes geneticamente da amostra do Acre (aproximadamente 18%). Um número maior de amostras sequenciadas e uso de outros marcadores moleculares poderão contribuir e esclarecer a existência de espécies crípticas nas populações estudadas, e confirmar a presença de novas espécies, como consequência de processos como dispersão e/ou vicariância, surgidos pelas distâncias geográficas. Os *L. brasiliensis* de Humaitá e Itaituba foram coletados próximos a grandes rios como rio Madeira e rio Tapajós, respectivamente. Esses rios, entre vários outros, contribuíram para a formação do eixo Solimões-Amazonas, tornando-o o maior rio em extensão e volume de água do planeta. A única sequência de *L. brasiliensis* do Acre, é proveniente do rio Acre. A população *L. brasiliensis* de Marapanim foi coletado em área costeira, banhada pelo oceano atlântico. Em *Culicoides*: as análises filogenéticas por Neighbor-Joining e Máxima Verossimilhança mostraram-se igualmente eficazes para a diferenciação das 12 espécies de maruins amazônicos, revelando valores de bootstrap para os clados entre 80-100%; a árvore filogenética baseada em Neighbor-Joining obteve 100% de suporte para todos os clados, demonstrando uma maior eficácia deste método perante as espécies analisadas. O resultado obtido a partir da reconstrução filogenética por Neighbor-Joining e Máxima Verossimilhança foi reforçado pela morfometria geométrica de asas realizada nessas espécies, sugerindo divergência entre estes grupos de maruins amazônicos avaliados neste estudo.

**Palavras-chave:** Culicomorpha; *Atrichopogon*; *Culicoides*; e *Leptoconops*.

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ-IOC/INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE-ILMD**  
**THE INTEGRATED TAXONOMY TO ELUCIDATE THE DIVERSITY OF MARUINS**  
**(DIPTERA: CERATOPOGONIDAE) IN THE BRAZILIAN AMAZON**

**ABSTRACT**

**PHD THESIS IN BIODIVERSIDADE E SAÚDE**

Emanuelle de Sousa Farias

The Ceratopogonidae family belongs to the Diptera, Culicomorpha and /Chironomoidea clades, it is a sister group of Chironomidae. Species of this family occur in practically all terrestrial areas of the planet. Adults of neotropical Ceratopogonidae can be found from coastal areas to high altitudes. Immatures can be found in aquatic environments, underwater and some species are terrestrial. Both males and females feed on plant nectar. Numerous species of *Leptoconops* Skuse and *Culicoides* Latreille are pests of humans and animals, with most species hematophagous, having irritating bites and transmitting a wide variety of viruses, protozoa and nematodes, including some important diseases such as: Oropouche Virus and Bluetongue Virus by *Culicoides* and mansonellosis by *Culicoides* and *Leptoconops*. The males and females of many adult *Atrichopogon* feed on nectar, thus providing an important ecosystem service. They are likely to be pollinators of numerous other plants in tropical America, possibly including mango (*Mangifera indica*) and several palms, in addition to the hemolymph suction from large insects suggests the possibility that they may be involved in the transmission of viruses from one host insect to another, particularly among caterpillars. The systematics of the three genera identified in this study, *Atrichopogon*, *Culicoides* and *Leptoconops*, are based mainly on morphological characters, which sometimes encounter difficulties such as identifying cryptic species or species that present phenotypic plasticity, making it difficult to identify them at a specific level. Integrated taxonomy studies that

aggregate morphological, morphometric and genetic characters in several Diptera families, including vectors, have been important to elucidate hidden biological diversity. Geometrical Morphometry-MG is a tool that supports the molecular supports for differentiating species, as well as cryptic species and population studies. Another benefit of MG is that, through multivariate regression analysis, the allometric effect (residue) can be easily removed from shape analyses, making it possible to compare minimally interfering shapes of different sizes. Molecular studies have generated knowledge and have been a very important tool, increasing the ability to identify species and characterize biodiversity, as well as to assess the inter and intrapopulation genetic variability of various organisms relating to the distribution of species in local habitats, ecosystems, landscapes, continents and others. Molecular techniques used to show genetic variation are sometimes more efficient in discriminating intraspecific population subdivisions than traditional morphological biometrics. The correct identification of an insect of ecological/economic/epidemiological interest is a basic premise for the solution of any entomological problem. The aim of this study was to increase knowledge about the biodiversity of genera representative of the three subfamilies of maruins, collected in different regions of the Amazon, through traditional and integrated taxonomy. The specimens were mounted between slide/coverslip in a phenol-balsam method, identified at the species level, through optical microscopy observations, following the identification keys, articles with species description and comparison with species deposited in the Ceratopogonidae collection of the Instituto Oswaldo Cross. In the integrated taxonomy, made for the *Leptoconops* and *Culicoides* genera, MG and the DNA Barcode molecular tool were used. The faunal study carried out in 12 municipalities in five states of the Brazilian Amazon recorded a previously unknown species in the state of Amazonas (*C. amazonicus*, *C. forattinii*, *C. jurutiensis* and *C. lyrinotatus*), in the state of Pará (*C. rhombus* and *C. kuripako*) and Maranhão (*L. brasiliensis*). The diversities of the group of spotted wing

species of the genus *Atrichopogon* increased to 15 species, with the finding of three new species: *A. janseni* sp nov.; *A. riopardensis* sp nov.; and *A. sergioluzi* sp nov. A new species record of the genus *Cuicoides* for Brazil (*C. macrostigma*) was found and males of the species *C. jurutiensis* and *C. plaumanni* were described. In *Leptoconops*, the undescribed males of *L. brasiliensis* were collected in the municipality of Marapanim and described in this work, as well as the redescribed female. The vectors, *C. paraensis* was found mainly in peridomiciles, urban and rural areas and *C. insignis* in peridomiciles close to corrals, rural areas. Here, we review the distribution of 40 species of ceratopogonids for the Brazilian Amazon. In the integrative taxonomy comparing *Leptoconops* populations: the MG compared the three *L. brasiliensis* populations pointed out that the Humaitá and Itaituba populations as the most similar and the Marapanim population as the most divergent compared to the other two. main show that *L. brasiliensis* populations from Humaitá and Itaituba overlap, in part, in morphospace; in the genetic distance analysis performed with DNA Barcode were congruent with the results of MG, wing, for the populations of *Leptoconops brasiliensis* from Itaituba and Marapanim, where the CVA formed a clear cluster, and the genetic distance between the two populations was approximately 6%. The populations of Itaituba and Marapanim are genetically distant from the Acre sample (approximately 18%). A larger number of sequenced samples and the use of other molecular markers may contribute and clarify the existence of cryptic species in the populations studied, and confirm the presence of new species, as a consequence of processes such as dispersion and/or vicariance, arising from geographical distances. The *L. brasiliensis* from Humaitá and Itaituba were collected near large rivers such as rio Madeira and rio Tapajós, respectively. These rivers, among many others, contributed to the formation of the Solimões-Amazonas axis, making it the largest river in terms of extension and volume of water on the planet. The only sequence of *L. brasiliensis* from Acre comes from the Acre river. The *L. brasiliensis* population of Marapanim was collected in a coastal area, bathed by the Atlantic Ocean.

In *Culicoides*: phylogenetic analyzes by Neighbor-Joining and Maximum Likelihood proved to be equally effective for differentiating the 12 species of Amazonian maruins, revealing bootstrap values for clades between 80-100%; the phylogenetic tree based on Neighbor-Joining obtained 100% support for all clades, demonstrating a greater effectiveness of this method against the analyzed species. The result obtained from the phylogenetic reconstruction by Neighbor-Joining and Maximum Likelihood was reinforced by the geometric morphometry of wings performed in these species, suggesting divergence between these groups of Amazonian maruins evaluated in this study.

**Keywords:** Culicomorpha; *Atrichopogon*; *Culicoides*; and *Leptoconops*.



## ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO .....	16
1.1.1 Família Ceratopogonidae .....	16
1.2 Sistemática .....	20
1.3 O gênero <i>Atrichopogon</i> .....	21
1.4 O gênero <i>Culicoides</i> .....	22
1.5 O gênero <i>Leptoconops</i> .....	24
1.6 Taxonomia Integrada .....	25
1.7 Morfometria Geométrica – MG .....	25
1.8 Biologia molecular.....	26
1.9 Barcode .....	26
1.10 Plasticidade fenotípica .....	28
1.11 Hipóteses sugeridas para explicar a diversificação das espécies na Amazônia.....	28
2. JUSTIFICATIVA.....	30
3. OBJETIVOS.....	32
3.1 Objetivo Geral.....	32
3.2 Objetivos específicos .....	32
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	33
4.1 Coletas de campo.....	33
4.2 Preparação de lâminas para microscopia .....	36
4.3 Identificação morfoanatômica dos maruins .....	37
4.4 Morfometria Geométrica-MG.....	48
4.5 Extração do DNA.....	50
4.6 Quantificação do DNA extraído dos maruins .....	51

4.7 Amplificação do alvo I (COI) do DNA mitocondrial.....	51
4.8 Eletroforese em gel de agarose .....	52
4.9 Purificação .....	52
4.10 Sequenciamento dos produtos da PCR .....	53
4.11 Análises filogenéticas .....	53
4.12 Diversidade genética.....	53
4. REFERÊNCIAS .....	55
CAPÍTULO I.....	67
ESTUDO FAUNÍSTICO DE TRÊS GÊNEROS DE CERATOPOGONIDAE NA AMAZÔNIA BRASILEIRA: <i>Atrichopogon</i> , <i>Culicoides</i> e <i>Leptoconops</i> .....	67
RESUMO .....	68
1. INTRODUÇÃO .....	69
2. METODOLOGIA .....	71
2.1 Dados de coleta.....	71
2.2 Preparação de lâminas para microscopia .....	72
2.3 Identificação morfoanatômica dos maruins .....	74
3. RESULTADO E DISCUSSÃO .....	74
4. CONCLUSÃO .....	124
5. REFERÊNCIAS .....	124
CAPÍTULO II.....	130
<i>Leptoconops brasiliensis</i> (DIPTERA: CERATOPOGONIDAE): TAXONOMIA INTEGRADA DE POPULAÇÕES DA REGIÃO AMAZÔNICA BRASILEIRA, E DESCRIÇÃO DO MACHO E REDESCRIBÇÃO DA FÊMEA.....	130
RESUMO .....	131
1. INTRODUÇÃO .....	132
2. METODOLOGIA .....	135

2.1 Dados de coletas .....	135
2.2 Preparação de lâminas para identificação morfoanatômica e para MG .....	137
2.3 Morfometria geométrica das asas .....	138
2.4 Extração de DNA, PCR e Sequenciamento .....	140
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	142
3.1 Identificação Morfológica.....	142
3.2 Redescrição da fêmea de <i>Leptoconops brasiliensis</i> e descrição do macho .....	147
3.3 Morfometria Geométrica de asa de fêmeas de três populações de <i>Leptoconops brasiliensis</i> da Região Amazônica brasileira .....	157
3.4 Análise genética para três populações de <i>Leptoconops brasiliensis</i> da Região Amazônica brasileira.....	166
4. CONCLUSÃO .....	171
5. REFERÊNCIAS .....	171
CAPÍTULO III .....	180
TAXONOMIA INTEGRATIVA PARA DISCRIMINAÇÃO DE ALGUMAS ESPÉCIES DE <i>Culicoides</i> (DIPTERA: CERATOPOGONIDADE) NA AMAZÔNIA.....	180
RESUMO .....	181
1. INTRODUÇÃO .....	182
2. METODOLOGIA .....	186
2.1 Coletas de campo e triagem .....	186
2.2 Preparação de lâminas para microscopia .....	187
2.3 Morfometria geométrica das asas .....	188
2.4 Extração de DNA, PCR e Sequenciamento .....	190
2.5 Análises filogenéticas .....	191
2.6 Diversidade genética.....	192
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	192

3.1 Morfometria Geométrica de asa de fêmeas de *Culicoides* da Região Amazônica brasileira  
193

3.2 Análise genética para 12 espécies de *Culicoides* da Região Amazônica brasileira.. 215

4. CONCLUSÃO ..... 226

5. REFERÊNCIA ..... 227

DESCRIPTION OF THREE NEW SPECIES OF BITING MIDGE OF THE GENUS  
*Atrichopogon* KIEFFER (DIPTERA: CERATOPOGONIDAE) FROM THE BRAZILIAN  
AMAZON..... 240

Introduction ..... 241

Methodology..... 243

*Atrichopogon janseni* Pessoa & Farias sp. nov..... 245

*Atrichopogon riopardensis* Farias, Pessoa & Paulino-Rosa sp. nov. .... 253

*Atrichopogon sergioluzi* Farias, Santos & Pessoa sp. nov..... 261

Taxonomic remarks ..... 269

References ..... 270

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fêmeas adultas de ceratopogonídeos hematófagas A-B. A. <i>Culicoides</i> sp, B. <i>Leptoconops brasiliensis</i> (Lutz). .....	17
Figura 2. Ciclo de vida de maruim A-D. A. Ovos; B. Larva; C. Pupa; D. Fêmea adulta de <i>Culicoides insignis</i> . .....	18
Figura 3. Ambientes de procriação e habitat de imaturos de <i>Culicoides</i> . A-B, D Esterco de animais domésticos de zonas rurais (curral, chiqueiros e galinheiros); C. Plantações de banana; E. Buraco de caranguejo; F. Solo encharcado; G. Praia litorânea; H. Mangue; I. Praia fluvial.	19
Figura 4. Fêmeas adultas de ceratopogonídeos A-C. A. <i>Leptoconops brasiliensis</i> , B. <i>Culicoides insignis</i> , C. <i>Atrichopogon riopardensis</i> . .....	21
Figura 5. Armadilhas usadas na coleta de ceratopogonídeos. A. Armadilha luminosa tipo CDC; B. Armadilha Malaise; C. Puçá entomológico.....	34
Figura 6. Mapa dos municípios onde foram feitas as coletas de <i>Atrichopogon</i> , <i>Culicoides</i> e <i>Leptoconops</i> , nos estados do Acre, Amazonas, Maranhão, Pará e Rondônia, no Brasil (modificado após SimpleMappr, <a href="http://www.simplemappr.net">http://www.simplemappr.net</a> ).....	35
Figura 7. Esquema mostrando a disposição das estruturas morfológicas (montada entre lâmina/lamínula, método fenol/balsamo), utilizadas na identificação de maruins. A. Cabeça; B. Abdome; C. Tórax/Mesonoto; D. Pernas; E. Asa.....	37
Figura 8. Asas de fêmea de ceratopogonídeos A-D. A. <i>Atrichopogon</i> , B. <i>Leptoconops</i> . C-D. <i>Culicoides</i> .....	39
Figura 9. Cabeça de fêmeas de ceratopogonídeos A-D. A. <i>Atrichopogon</i> ; B. <i>Culicoides</i> ; C-D. <i>Leptoconops</i> . .....	40
Figura 10. Probóscide de fêmeas de ceratopogonídeos A-E. A. <i>Culicoides</i> ; B. <i>Leptoconops</i> ; C. <i>Atrichopogon</i> , D. Imagens feitas com auxílio de um microscópio óptico mostrando diferentes formas do 3º segmento do palpo e fossa sensorial; E. Imagens feitas com microscopia de varredura mostrando diferentes formas do 3º segmento do palpo e fossa sensorial. ....	41
Figura 11. Antena de fêmeas de ceratopogonídeos A-D. A. Cabeça de fêmea e macho de <i>Leptoconops</i> mostrando dimorfismo sexual; B. Antena de <i>Culicoides</i> ; C. Antena de <i>Leptoconops</i> ; D. Antena de <i>Atrichopogon</i> . .....	42

Figura 12. Olhos de fêmeas de ceratopogonídeos A-C. A. Olhos de <i>Atrichopogon</i> ; B. Olhos de <i>Leptoconops</i> ; C-F. Olhos de <i>Culicoides</i> .....	43
Figura 13. Tórax de fêmeas de ceratopogonídeos A-E. A. Tórax de <i>Leptoconops</i> , vista lateral; B. Tórax de <i>Leptoconops</i> , vista dorsal; C-E. Tórax de <i>Culicoides</i> , vista dorsal. ....	44
Figura 14. Pernas de fêmeas de ceratopogonídeos A-C. A. <i>Culicoides</i> ; B. <i>Atrichopogon</i> ; C. <i>Leptoconops</i> . ....	45
Figura 15. Abdome e espermatecas de fêmea de ceratopogonídeos A-E. A-C. <i>Culicoides</i> ; D. <i>Atrichopogon</i> ; E. <i>Leptoconops</i> .....	46
Figura 16. Abdome de macho ceratopogonídeos A-D. A. Abdome, vista ventral; B, D. Genitálias, vista ventral; C. Parâmeros/edeago complexos, vista ventral. ....	47
Figura 1 (17 ). Mapa mostra os municípios onde foram feitas as coletas de <i>Atrichopogon</i> , <i>Culicoides</i> e <i>Leptoconops</i> , nos estados do Acre, Amazonas, Maranhão, Pará e Rondônia, no Brasil (modificado após SimpleMappr, <a href="http://www.simplemappr.net">http://www.simplemappr.net</a> ). ....	73
Figura 2 (18). Fêmea adulta de <i>Culicoides macrostigma</i> . A. Cabeça, vista anterior; B. Asa; C. Antena; D. Palpo; E. Abdome; F. Tórax, vista ventral; G. Pernas; H. Espinho tibial .....	77
Figura 3 (19). Macho adulto <i>Culicoides jurutiensis</i> . A. Cabeça, vista anterior; B. Asa; C. Tórax, vista dorsal; D. Pernas; E. Parâmeros; F. Edeago, vista ventral; G. Genitália; H. Abdome. .	88
Figura 4 (20). Mapa da distribuição das espécies dos gêneros <i>Atrichopogon</i> e <i>Culicoides</i> na Amazônia brasileira (modificado após SimpleMappr, <a href="http://www.simplemappr.net">http://www.simplemappr.net</a> ). ....	89
Figura 5 (21). Mapa da distribuição das espécies do gênero <i>Culicoides</i> na Amazônia brasileira (modificado após SimpleMappr, <a href="http://www.simplemappr.net">http://www.simplemappr.net</a> ).....	95
Figura 6 (22). Macho adulto <i>Culicoides plaumanni</i> . A. Cabeça, vista anterior; B. Asa; C. Tórax, vista dorsal; D. Abdome; E. Pernas; F. Parâmeros/edeago, vista ventral; G. Parâmeros; H. Edeago; I. Genetália, vista dorsal.....	99
Figura 7 (23). Mapa da distribuição das espécies do gênero <i>Culicoides</i> na Amazônia brasileira (modificado após SimpleMappr, <a href="http://www.simplemappr.net">http://www.simplemappr.net</a> ).....	101
Figura 8 (24). Mapa da distribuição das espécies do gênero <i>Culicoides</i> na Amazônia brasileira (modificado após SimpleMappr, <a href="http://www.simplemappr.net">http://www.simplemappr.net</a> ).....	104
Figura 9 (25). Mapa da distribuição das espécies do gênero <i>Culicoides</i> na Amazônia brasileira (modificado após SimpleMappr, <a href="http://www.simplemappr.net">http://www.simplemappr.net</a> ).....	109

Figura 10 (26). Mapa da distribuição das espécies do gênero <i>Culicoides</i> na Amazônia brasileira (modificado após SimpleMappr, <a href="http://www.simplemappr.net">http://www.simplemappr.net</a> ).....	114
Figura 11 (27). Mapa da distribuição das espécies dos gêneros <i>Culicoides</i> e <i>Leptoconops</i> na Amazônia brasileira (modificado após SimpleMappr, <a href="http://www.simplemappr.net">http://www.simplemappr.net</a> ). .....	118
Figura 12 (28). Asa de fêmeas adultas de Ceratopogonidae. Gênero <i>Atrichopogon</i> - Subgênero <i>Atrichopogon</i> – A. <i>A. janseni</i> sp.nov; B. <i>A. riopardensis</i> sp.nov; C. <i>A. sergioluzi</i> sp.nov. Gênero <i>Culicoides</i> – Subgênero <i>Haematomyidium</i> - D. <i>C. debilipalpis</i> , E. <i>C. glabrior</i> ; F. <i>C. jurutiensis</i> ; G. <i>C. paraensis</i> ; H. <i>C. quasiparaensis</i> . Gênero <i>Hoffmania</i> - I. <i>C. coutinhoi</i> ; J. <i>C. foxi</i> ; K. <i>C. fusipalpis</i> ; L. <i>C. ignacioi</i> ; M. <i>C. insignis</i> ; N. <i>C. ocumarensis</i> ; O. <i>C. paraignacioi</i> . .....	119
Figura 13 (29). Asa de fêmeas adultas de Ceratopogonidae. Gênero <i>Culicoides</i> – Gênero <i>Hoffmania</i> - A. <i>C. plaumanni</i> ; B. <i>C. pseudodiabolicus</i> ; C. <i>C. ruizi</i> ; D. <i>C. aitkeni</i> ; E. <i>C. contubernalis</i> ; F. <i>C. hylas</i> . Subgênero <i>Macfiella</i> – G. <i>C. phlebotomus</i> . Subgênero <i>Mataemyia</i> – H. <i>C. aldomari</i> ; I. <i>C. bricenoi</i> . Grupo <i>fluvial</i> – J. <i>C. fluvialis</i> ; K. <i>C. leopoldoi</i> ; L. <i>C. tetrathyris</i> . Grupo <i>leoni</i> – M. <i>C. glabellus</i> . Grupo <i>limai</i> – N. <i>C. limai</i> . Grupo <i>pachymerus</i> – O. <i>C. caprilesi</i> .....	120
Figura 14 (30). Asa de fêmeas adultas de Ceratopogonidae. Gênero <i>Culicoides</i> – Grupo <i>reticulatus</i> – A. <i>C. amazonicus</i> ; B. <i>C. forattinii</i> ; C. <i>C. hidelbrandoi</i> ; D. <i>C. kuripako</i> ; E. <i>C. lyrinotatus</i> ; F. <i>C. macrostigma</i> ; G. <i>C. paucienfuscatus</i> ; H. <i>C. profundus</i> ; I. <i>C. rhombus</i> . Gênero <i>Leptoconops</i> – Subgênero <i>Leptoconops</i> – J. <i>Leptoconops brasiliensis</i> .....	121
Figura 15 (31). A-D. Variações morfológicas em asas de fêmeas adultas de <i>Culicoides leopoldoi</i> . Setas e círculo em vermelho mostram onde ocorre as principais variações no padrão de mancha das asas.....	122
Figura 16 (32). Variações morfológicas em asas de fêmeas adultas de <i>Culicoides ruizi</i> . A-B. <i>C. ruizi</i> , população do Pará; C-D. <i>C. ruizi</i> , população do Amazonas. Setas vermelhas apontam onde ocorre as principais variações no padrão de mancha das asas.....	122
Figura 17 (33). Locais de registro das 40 espécies de maruins, na Amazônia brasileira: Acre –1 Rio das Minas, 2 Rio Azul, 3 Igarapé Romon, 4 Rio Juruá, 5 Assis Brasil, 6 Rio Branco, 7 Bela Vista; Amazonas – 0 Rio Içana, 1 Rio Xiê, 2 Río Içana, 3 São Gabriel da Cachoeira, 4 Br-307 perimetral, 5 Santa Isabel do Rio Negro, 6 Barcelos, 7 Demini, 8 Rio Toototobi, 9 Ilha de Juçara, 10 11 Coari, Tefé, 12 Rio Cuieiras, 13 Manacapuru, 14 Novo Airão, 15 Manaus, 16 Presidente Figueiredo, 17 Parintins, 18 Novo Aripuanã, 19 Rio Madeira, 20 Tabatinga, 21	

Santo Antônio; Pará – 1 UHE - Cachoeira Porteira, 2 Oriximiná, 3 Óbidos, 4 Juriti, 5 Itaituba, 6 Mission Tiriyo, 7 Rio Parú do Oeste, 8 Projeto Alcoa, 9 Floresta nacional Caxiuanã, 10 Melgaço, 11 UHE - Cachoeira dos Espelhos, 12 Currálinho, 13 Outeiro, 14 Bélem, 15 Ourém, 16 Paragominas, 17 São Geraldo do Araguaia, 18 Rio Maruaru, 19 Rio Xingú, 20 Gurupá, 21 Rio Cururu; Amapá – 1 Macapá/IEPA; Tocantins – 1 Tocantinópolis; Rondônia – 1 Porto Velho, 2 Guajará-Mirim 3 Rio Pacaás, 4 Ji-Paraná; Mato Grosso – 1 Serra de Cachimbo, 2 Cuiabá, 3 Xavantina, 4 Barra das garças; Roraima – 1 Maloca Uiramutã, 2 Ilha Maracá, 3 Alto Alegre, 4 Maloca Ericó, 5 Maloca Wacuxi, 6 Maloca Socó, 7 Rorainópolis, 8 Mucajaí, 9 Normandia, 10 São Luiz Anauá, 11 Baixo Catrimani.....	123
Figura 1 (34). Localização geográfica dos pontos de coletas de <i>Leptoconops</i> , nos estados do Amazonas e Pará, na América do Sul. As áreas verde e azul mostram os estados de coletas. ....	138
Figura 2 (35). A. Fêmea de <i>Leptoconops brasiliensis</i> ; B-C. Asa; círculos em vermelho mostram os seis pontos anatômicos de referência-PARs utilizados para Análise de Morfometria Geométrica. ....	140
Figura 4 (36). Fêmea de <i>Leptoconops brasiliensis</i> . Palpo, A-D: A. População de Itaituba, Pará; B. população de Marapanim, Pará; C-D. população de Humaitá, Amazonas. ....	145
Figura 5 (37). Fêmea de <i>Leptoconops brasiliensis</i> . Asa, A-C: A. População de Itaituba, Pará; B. População de Marapanim, Pará; C. População de Humaitá, Amazonas. ....	146
Figura 6 (38). <i>Leptoconops (L.) brasiliensis</i> , fêmea. A. Cabeça; B. Antena; C. Dentes na mandíbula; D. Separação dos olhos; E– G. Palpos, fossas sensoriais no 3º segmento. ....	151
Figura 7 (39). <i>Leptoconops (L.) brasiliensis</i> , fêmea. A. Asa; B. Mesonoto, porção dorsal; C. Pernas; D. Empodia. ....	152
Figura 8 (40). <i>Leptoconops (L.) brasiliensis</i> , fêmea. A. Abdome, porção lateral; B-D. Abdome, abertura do átrio, braços laterais da placa ventral, arcabouço genital trilobado; C. Espermatecas. E. Cercus; ....	153
Figura 9 (41). <i>Leptoconops (L.) brasiliensis</i> , macho. A. Cabeça; B. Separação dos olhos; C. Asa; D – E. Palpos, fossas sensoriais; F. Mesonoto, porção dorsal; G. Pernas. ....	154
Figura 10 (42). <i>Leptoconops (L.) brasiliensis</i> , macho. A. Abdome, vista ventral; B. Genitália, vista dorsal; C. Genitália, vista ventral. ....	155



Figura 11 (43). <i>Leptoconops (L.) brasiliensis</i> , macho. A – D. Parâmeros/edeago; E – F. Gonóstilo. .....	156
Figura 12 (44). Boxplot- inclui a informação do Intervalo de Confiança de 95% para a Mediana da variação do tamanho do centroide para as três populações de <i>Leptoconops brasiliensis</i> : grupo 1, população de Marapanim-PA; grupo 2, população de Humaitá-AM; e grupo 3, população de Itaituba-PA. ....	157
Figura 13 (45). Análise de componentes principais para o primeiro componente (CP1 – 37.53%) e segundo componente (CP2 – 29.36%), para as três populações de <i>Leptoconops brasiliensis</i> : Preto - grupo 1, população de Marapanim-PA; Vermelho - grupo 2, população de Humaitá - AM; e Verde- grupo 3, população de Itaituba-PA. ....	159
Figura14 (46). Análise de variável canônica para as três populações de <i>Leptoconops brasiliensis</i> : Preto - grupo 1, população de Marapanim-PA; Vermelho - grupo 2, população de Humaitá- AM; e Verde - grupo 3, população de Itaituba-PA. ....	160
Figura 15 (47). Função Discriminantes (FD) e de Validação Cruzada (VC) par a par de todos os espécimes examinados de <i>Leptoconops brasiliensis</i> : Vermelho - grupo 1, população de Marapanim-PA; Azul - grupo 2, população de Humaitá-AM. Áreas de sobreposição indicam erros de discriminação e de validação cruzada. As elipses representam intervalo de confiança de 95%.....	162
Figura 10 (48). Função Discriminantes (FD) e de Validação Cruzada (VC) par a par de todos os espécimes examinados de <i>Leptoconops brasiliensis</i> : Vermelho- grupo 1, população de Marapanim-PA; Azul- grupo 3, população de Itaituba-PA. Áreas de sobreposição indicam erros de discriminação e de validação cruzada. As elipses representam intervalo de confiança de 95%.....	163
Figura 17 (49). Função Discriminantes (FD) e de Validação Cruzada (VC) par a par de todos os espécimes examinados de <i>Leptoconops brasiliensis</i> : Vermelho - grupo 2, população de Humaitá-AM; e azul - grupo 3, população de Itaituba-PA. Áreas de sobreposição indicam erros de discriminação e de validação cruzada. As elipses representam intervalo de confiança de 95%.....	164
Figura 18 (50). Dendrograma UPGMA com base em distâncias euclidianas obtidas de dados morfométricos tradicionais, que descrevem divergências de forma para as três populações de <i>Leptoconops brasiliensis</i> : grupo 1, população de Marapanim-PA; grupo 2, população de	

Humaitá-AM; e grupo 3, população de Itaituba-PA. Todas as distâncias foram significativas ( $p < 0,0001$ ).	165
Figura 1 (51). Fêmeas adultas de- A- <i>Culicoides insignis</i> ; B- <i>C. paraensis</i> .	187
Figura 2 (52). Os mapas mostram a posição do estado do Amazonas, Pará e Rondônia, no Brasil, locais de coletas dos <i>Culicoides</i> utilizados nesse estudo.	188
Figura 3 (53). Asas de fêmeas de a de <i>Culicoides paraensis</i> ; modificada. Círculos em vermelho mostram os oito pontos anatômicos de referência-PARs.	189
Figura 4 (54). Posições dos pontos de referência- PARs e a dispersão deles, de fêmeas das 12 espécies de <i>Culicoides</i> (17 grupos). Axis 1 vs 2.	195
Figura 5 (55). Grades de deformação da forma da asa de <i>Culicoides</i> em relação a eixos cartesianos estabelecidos pelo componente principal.	196
Figura 6 (56). Diagrama Boxplot para o TC das asas de fêmeas dos 17 grupos de 12 espécies de <i>Culicoides</i> , subgênero <i>Hoffmania</i> (Grupos 1 a 9) - 1 <i>C. foxi</i> , 2 <i>C. fusipalpis</i> , 3 <i>C. hylas</i> , 4 <i>C. insignis</i> NHA, 5 <i>C. insignis</i> SAP, 6 <i>C. insignis</i> RP, 7 <i>C. plaumanni</i> , 8 <i>C. pseudodiabolicus</i> , 9 <i>C. ruizi</i> . Subgênero <i>Haematomyidium</i> (Grupos 10 a 16) - 10 <i>C. debilipalpis</i> , 11 <i>C. glabrior</i> , 12 <i>C. jurutiensis</i> , 13 <i>C. paraensis</i> ITA, 14 <i>C. paraensis</i> ORIX, 15 <i>C. paraensis</i> PV, 16 <i>C. paraensis</i> RP; e uma espécie não agrupada em subgênero, do grupo <i>reticulatus</i> (Grupos 17) - 17 <i>C. paucienfuscatus</i> . As linhas horizontais representam as medianas, os retângulos representam o intervalo interquartil, enquanto as linhas verticais informam os intervalos de variação.	197
Figura 7 (57). Grades de deformação da forma da asa de <i>Culicoides</i> em relação a eixos cartesianos estabelecidos pelas variáveis canônicas.	199
Figura 8 (58). Análise de componentes principais para o primeiro componente (CP1 – 61%) e segundo componente (CP2 – 15%) dos 17 grupos de 12 espécies de <i>Culicoides</i> , subgênero <i>Hoffmania</i> (Grupos 1 a 9) - 1 <i>C. foxi</i> , 2 <i>C. fusipalpis</i> , 3 <i>C. hylas</i> , 4 <i>C. insignis</i> NHA, 5 <i>C. insignis</i> SAP, 6 <i>C. insignis</i> RP, 7 <i>C. plaumanni</i> , 8 <i>C. pseudodiabolicus</i> , 9 <i>C. ruizi</i> . Subgênero <i>Haematomyidium</i> (Grupos 10 a 16) - 10 <i>C. debilipalpis</i> , 11 <i>C. glabrior</i> , 12 <i>C. jurutiensis</i> , 13 <i>C. paraensis</i> ITA, <i>C. paraensis</i> ORIX, <i>C. paraensis</i> PV, <i>C. paraensis</i> RP; e uma espécie não agrupada em subgênero, do grupo <i>reticulatus</i> (Grupos 17) - <i>C. paucienfuscatus</i> . NHA- população do Nhamundá, Oriximiná-PA; OBD- população de Óbidos -PA; SAP- população do Sapucaá, Oriximiná-PA; ITA- população do Itaituba-PA; ORIX- população de Oriximiná-	

PA, sede do município; PV- população de Porto Velho-RO; RP- população do Rio Pardo, Presidente Figueiredo-AM. ....	200
Figura 9 (59). Mapas fatoriais baseados nos dois fatores discriminantes da variação de forma de asas (CV1 e V2), mostrando os agrupamentos formado dos 17 grupos de 12 espécies de Culicoides, subgênero <i>Hoffmania</i> (Grupos 1 a 9) - 1 <i>C. foxi</i> , 2 <i>C. fusipalpis</i> , 3 <i>C. hylas</i> , 4 <i>C. insignis</i> NHA, 5 <i>C. insignis</i> SAP, 6 <i>C. insignis</i> RP, 7 <i>C. plaumanni</i> , 8 <i>C. pseudodiabolicus</i> , 9 <i>C. ruizi</i> . Subgênero <i>Haematomyidium</i> (Grupos 10 a 16) - 10 <i>C. debilipalpis</i> , 11 <i>C. glabrior</i> , 12 <i>C. jurutiensis</i> , 13 <i>C. paraensis</i> ITA, <i>C. paraensis</i> ORIX, <i>C. paraensis</i> PV, <i>C. paraensis</i> RP; e uma espécie não agrupada em subgênero, do grupo <i>reticulatus</i> (Grupos 17) - <i>C. paucienfuscatus</i> . NHA- população do Nhamundá, Oriximiná-PA; OBD- população de Óbidos -PA; SAP- população do Sapucaá, Oriximiná-PA; ITA- população do Itaituba-PA; ORIX- população de Oriximiná-PA, sede do município; PV- população de Porto Velho-RO; RP- população do Rio Pardo, Presidente Figueiredo-AM. ....	203
Figura 10 (60). Mapas fatoriais baseados nos dois fatores discriminantes da variação de forma de asas (CV1 e CV2), mostrando os agrupamentos formado pelos subgêneros/grupo. ....	204
Figura 11 (61). Mapas fatoriais baseados nos dois fatores discriminantes da variação de forma de asas (CV1 e CV2), mostrando os agrupamentos formado por sete espécies do subgênero <i>Hoffmania</i> . ....	205
Figura 12 (62). Mapas fatoriais baseados nos dois fatores discriminantes da variação de forma de asas (CV1 e CV2), mostrando os agrupamentos formado por quatro espécies do subgênero <i>Haematomyidium</i> . ....	206
Figura 13 (63). Mapas fatoriais baseados nos dois fatores discriminantes da variação de forma de asas (CV1 e CV2), mostrando os agrupamentos formado por três populações de <i>Culicoides insignis</i> NHA - comunidade Nhamundá, município de Oriximiná; OBD - município de Óbidos; SAP - comunidade Sapucaá, município de Oriximiná. ....	207
Figura 14 (64). Mapas fatoriais baseados nos dois fatores discriminantes da variação de forma de asas (CV1 e CV2), mostrando os agrupamentos formado por quatro populações de <i>Culicoides paraensis</i> ITA- município de Itaituba; ORIX- município de Oriximiná; PV- município de Porto Velho; RP- comunidade do Rio Pardo, município de Presidente Figueiredo. ....	208
Figura 15 (65). Dendrograma gerado da dM entre os 17 grupos de <i>Culicoides</i> . Em vermelho, estão as espécies do subgênero <i>Haematomyidium</i> ; preto, subgênero <i>Hoffmania</i> ; azul, espécie não	

agrupada em subgênero, grupo <i>reticulatus</i> . NHA- população do Nhamundá, Oriximiná-PA; OBD- população de Óbidos -PA; SAP- população do Sapucaá, Oriximiná-PA; ITA- população do Itaituba-PA; ORIX- população de Oriximiná-PA, sede do município; PV- população de Porto Velho-RO; RP- população do Rio Pardo, Presidente Figueiredo-AM. 214	
Figura 16 (66). Árvores obtidas a partir da análise de nucleotídeos para o COI 1 (com método NJ) para 12 espécies de <i>Culicoides</i> . Com valor de “bootstrap” de 1000 réplicas. ....	224
Figura 17 (67). Árvores obtidas a partir da análise de nucleotídeos para o COI 1 (com método Máxima verossimilhança) para 12 espécies de <i>Culicoides</i> . Com valor de “bootstrap” de 1000 réplicas. ....	225
Figure 1 (68). Location of the study area where <i>Atrichopogon</i> were captured. A. Brazil, Amazonas state in bold area; B. Location of Presidente Figueiredo and Manaus Municipalities in the Amazonas State. (modified after SimpleMappr, <a href="http://www.simplemappr.net">http://www.simplemappr.net</a> ).....	244
Figure 2 (69). <i>Atrichopogon janseni</i> sp. nov. Male. A. Head, anterior view; B. Antenna; C. Maxillary palpus; D. Eyes separation, anterior view; E. Third palpal segment.....	248
Figure 3 (70). <i>Atrichopogon janseni</i> sp. nov. Male. A. Wing with patch of pigmentation, showing venations and cells; B. Thorax, lateral view; C. Fore, mid- and hind legs (left to right), lateral view. ....	249
Figure 4 (71). <i>Atrichopogon janseni</i> sp. nov. Male. A. Abdomen, ventral view; B-C. Terminalia, ventral view; D. Gonostylus; E-G. Aedeagal-parameral complex, ventral view.....	250
Figure 5 (72). <i>Atrichopogon janseni</i> sp. nov. Female. A. Head, anterior view; B. Antenna; C. Eyes separation, anterior view; D. Maxillary palpus E. Third palpal segment.....	251
Figure 6 (73). <i>Atrichopogon janseni</i> sp. nov. Female. A. Wing; B. Thorax, lateral view; C. Fore, mid- and hind legs (left to right), lateral view; D. Abdomen, ventral view; E. Spermatheca. ....	252
Figure 8 (74). <i>Atrichopogon riopardensis</i> sp. nov. Male. A. Wing; B. Thorax, lateral view; C. Fore, mid- and hind legs (right to left), lateral view; D. Scutum, scutellum and postscutellum, dorsal view. ....	257
Figure 9 (75). <i>Atrichopogon riopardensis</i> sp. nov. Male. A. Abdomen, ventral view; B. Terminalia, lateral view; C. Terminalia, ventral view; D-E. Aedeagal-parameral complex, ventral view; F. Gonostylus.....	258

Figure 10 (76). <i>Atrichopogon riopardensis</i> sp. nov. Female. A. Antenna; B. Head, anterior view; C. Adult, lateral view; D. Eyes separation, anterior view; E. Mandibular teeth; F. Third palpal segment.....	259
Figure 11 (77). <i>Atrichopogon riopardensis</i> sp. nov. Female. A. Wing; B. Scutum, scutellum dorsal view; C. Spermatheca; D. Abdomen, ventral view; E. Fore, mid- and hind legs (left to right), lateral view. ....	260
Figure 12 (78). <i>Atrichopogon sergioluzi</i> sp. nov. Male. A. Head, anterior view; B. Antenna; C. Eyes separation, anterior view; D. Adult, lateral view; E. Maxillary palpus.....	264
Figure 13 (79). <i>Atrichopogon sergioluzi</i> sp. nov. Male. A. Wing; B. Thorax, lateral view; C. Scutum, scutellum and postscutellum, dorsal view; D. Mid, fore and hind legs (left to right), lateral view. ....	265
Figure 14 (80). <i>Atrichopogon sergioluzi</i> sp. nov. Male. A. Abdomen, ventral view; B. Aedeagal-parameral complex, ventral view; C-D. Terminalia, ventral view; E. Gonostylus. ....	266
Figure 15 (81). <i>Atrichopogon sergioluzi</i> sp. nov. Female. A. Head, anterior view; B. Adult, lateral view; C. Antenna; D. Maxillary palpus; E. Eyes separation, anterior view.....	267
Figure 16 (82). <i>Atrichopogon sergioluzi</i> sp. nov. Female. A. Wing; B. Thorax posterolateral view; C. Hind, mid- and fore legs (left to right), lateral view; D. Spermatheca; E. Abdomen, ventral view. ....	268

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Reagentes utilizados para a reação de amplificação do alvo I (COI) do DNA mitocondrial. .....	52
Tabela 1 (2). Relação de espécies de maruins dos Gêneros <i>Atrichopogon</i> , <i>Culicoides</i> e <i>Leptoconops</i> (Diptera: Ceratopogonidae) identificadas no estudo. ....	78
Tabela 2 (3). Relação das espécies de ceratopogonídeos por município, em cinco estados na Amazônia brasileira.....	79
Tabela 1 (4). Resultados da Função Discriminantes (FD) e de Validação Cruzada (VaC). As linhas indicam a espécie à qual pertenciam os espécimes de <i>Leptoconops brasiliensis</i> analisados coletados em Marapanim e Itaituba, Pará e Humaitá, Amazonas e as colunas indicam os grupos aos quais os espécimes foram atribuídos.....	161
Tabela 2 (5). Medidas de diversidade genética intrapopulacional das duas populações de <i>Leptoconops brasiliensis</i> , coletadas nos municípios de Itaituba e Marapanim, ambas no estado do Pará.....	167
Tabela 3 (6). Variação genética entre as duas populações de <i>Leptoconops brasiliensis</i> , coletadas nos municípios de Itaituba e Marapanim, ambas no estado do Pará.....	168
Tabela 4 (7). Distância genética para duas populações de <i>Leptoconops brasiliensis</i> , coletadas nos municípios de Itaituba e Marapanim, ambas no estado do Pará. ....	170
Tabela 1 (8). Espécies de <i>Culicoides</i> , coletados em diferentes municípios na região Amazônica, distribuídos em 17 grupos para análise de morfometria geométrica - MG.....	194
Tabela 2 (9). Teste de Turkey para o tamanho do centroide de 17 grupos de 12 espécies de <i>Culicoides</i> .....	198
Tabela 3 (10). Função Discriminante (FD) e Validação Cruzada (VaC) feita par a par, para classificar os indivíduos dentro das espécies do gênero <i>Culicoides</i> . ....	209
Tabela 4 (11). Relação das espécies de <i>Culicoides</i> , utilizadas na análise genética, coletadas nos municípios: de Itaituba, Oriximiná e Óbidos, no estado do Pará; Presidente Figueiredo e Tefé, no estado do Amazonas; Porto Velho, Amazonas. ....	215
Tabela 5 (12). Medidas de diversidade genética intrapopulacional das 12 espécies de <i>Culicoides</i> . coletadas nos municípios: de Itaituba, Oriximiná e Óbidos, no estado do Pará; Presidente Figueiredo e Tefé, no estado do Amazonas; Porto Velho, Amazonas.....	219

Tabela 6 (13). Diferenciação genética entre as amostras das 12 espécies de <i>Culicoides</i> . coletadas nos municípios: de Itaituba, Oriximiná e Óbidos, no estado do Pará; Presidente Figueiredo e Tefé, no estado do Amazonas; Porto Velho, Amazonas. ....	220
Tabela 7 (14). Distância genética entre as 12 espécies de <i>Culicoides</i> . coletadas nos municípios: de Itaituba, Oriximiná e Óbidos, no estado do Pará; Presidente Figueiredo e Tefé, no estado do Amazonas; Porto Velho, Amazonas.....	223

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1.1 Família Ceratopogonidae

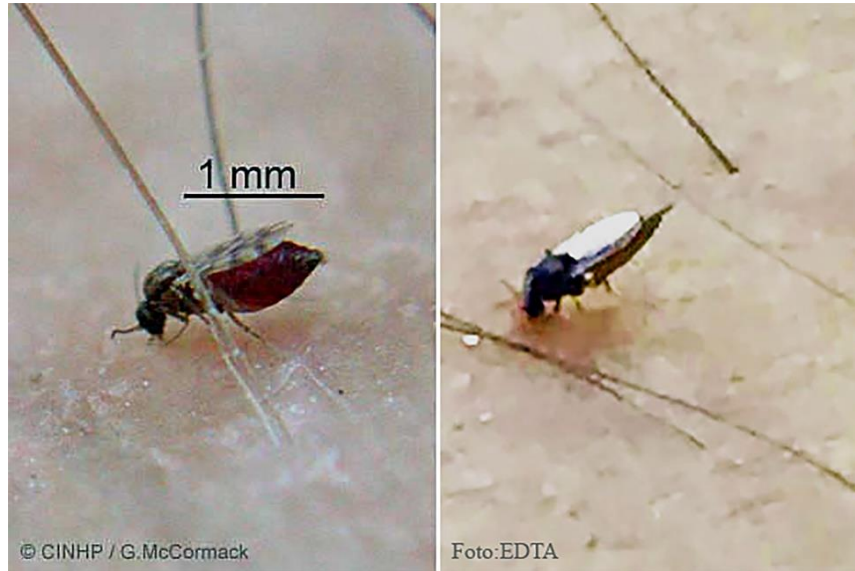
A família Ceratopogonidae pertencem aos clados Diptera, Culicomorpha e /Chironomoidea, é grupo irmão de Chironomidae <sup>(1)</sup>, mas diferem dessa família pelas peças bucais mais desenvolvidas, pela sobreposição das asas sobre o dorso (alguns Ceratopogonidae – *Stilobezzia* Kieffer – não têm asas sobrepostas) e bifurcação da veia alar M. Os ceratopogonídeos tem um registro fóssil notável que remonta a 142 milhões de anos <sup>(2)</sup>.

A família Ceratopogonidae está dividida em cinco subfamílias: Atriculicoidinae Szadziewski, Lebanoculicoidinae Borkent (ambas extintas), Leptoconopinae Noè, e Ceratopogoninae Newman, distribuídos em 112 gêneros vivos e 21 gêneros extintos <sup>(3)</sup>, sendo 51 gêneros na região Neotropical e 30 gêneros para o Brasil <sup>(4)</sup>. Leptoconopinae inclui *Austroconops* Wirth & Lee e *Leptoconops* Skuse; Forcipomyiinae inclui *Atrichopogon* Kieffer, *Forcipomyia* Meigen e *Dasyhelea* Kieffer; e Ceratopogoninae representa o grupo mais diversos em gêneros e espécies, composto por oito tribos e gêneros não agrupados: Culicoidini Kieffer (três gêneros), tribo onde está contido o gênero mais estudado, os *Culicoides* Latreille; Ceratopogonini Newman (59 gêneros, sendo 9 extintos); Heteromyiini Wirth (7 gêneros); Hebetulini Borkent (1 gênero); Johannsenomyiini Crampton (17 gêneros); Sphaeromiini Newman (11 gêneros); Palpomyiini Enderlein (6 gêneros); Stenoxenini Coquillett (2 gêneros) e gêneros não agrupados (7 gêneros, sendo 6 extintos) <sup>(3)</sup>.

No Brasil, os hematófagos (Figura 1 A-B) são conhecidos como: maruim, meruim que em nhengatu significa mosca pequena; mosquito pólvora; polvinha; e mosquito do mangue. Em outros



países de língua espanhola são conhecidos como: polvorin; jejen; e mbarigui-mini; manta blanca. Em língua inglesa: biting midge; no-see-um; punky; e sandfly <sup>(5)</sup>.

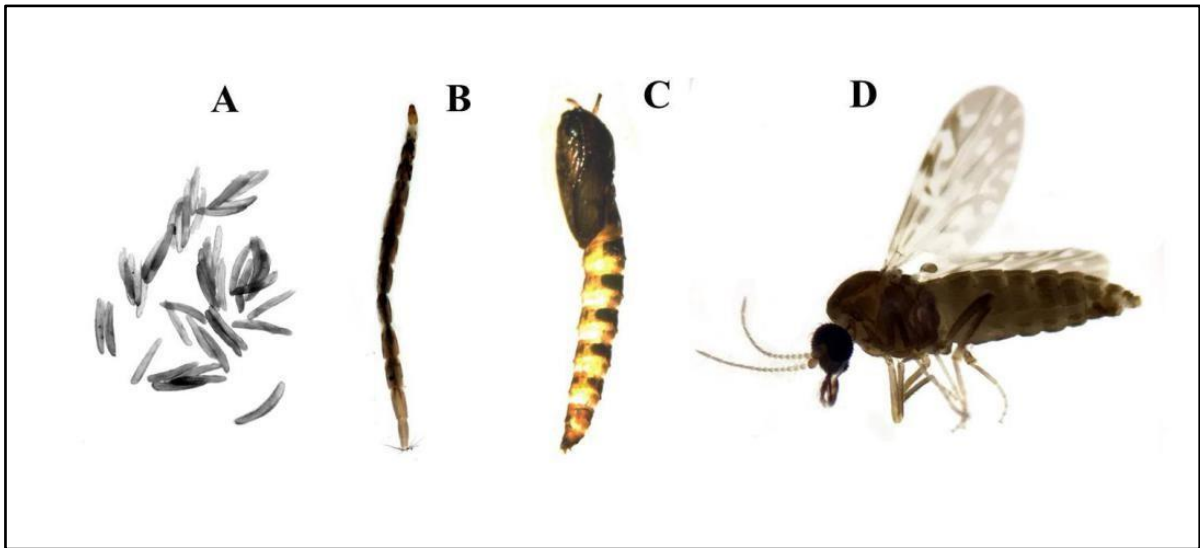


**Figura 1.** Fêmeas adultas de ceratopogonídeos hematófagas A-B. **A.** *Culicoides* sp, **B.** *Leptoconops brasiliensis* (Lutz).

Os ceratopogonídeos são insetos holometábolos (Figura 2). Estão presentes durante todo o ano em áreas tropicais, e muitas espécies têm diferentes gerações em curtos períodos <sup>(6)</sup>. Em algumas áreas tropicais, adultos podem ser mais diversos durante a estação chuvosa. O ciclo de vida em zona temperada no sul da América do Sul é inteiramente desconhecido, mas a presença de adultos no final da primavera, nesta área, indica que muitas espécies hibernam no último estágio larval <sup>(6)</sup>.

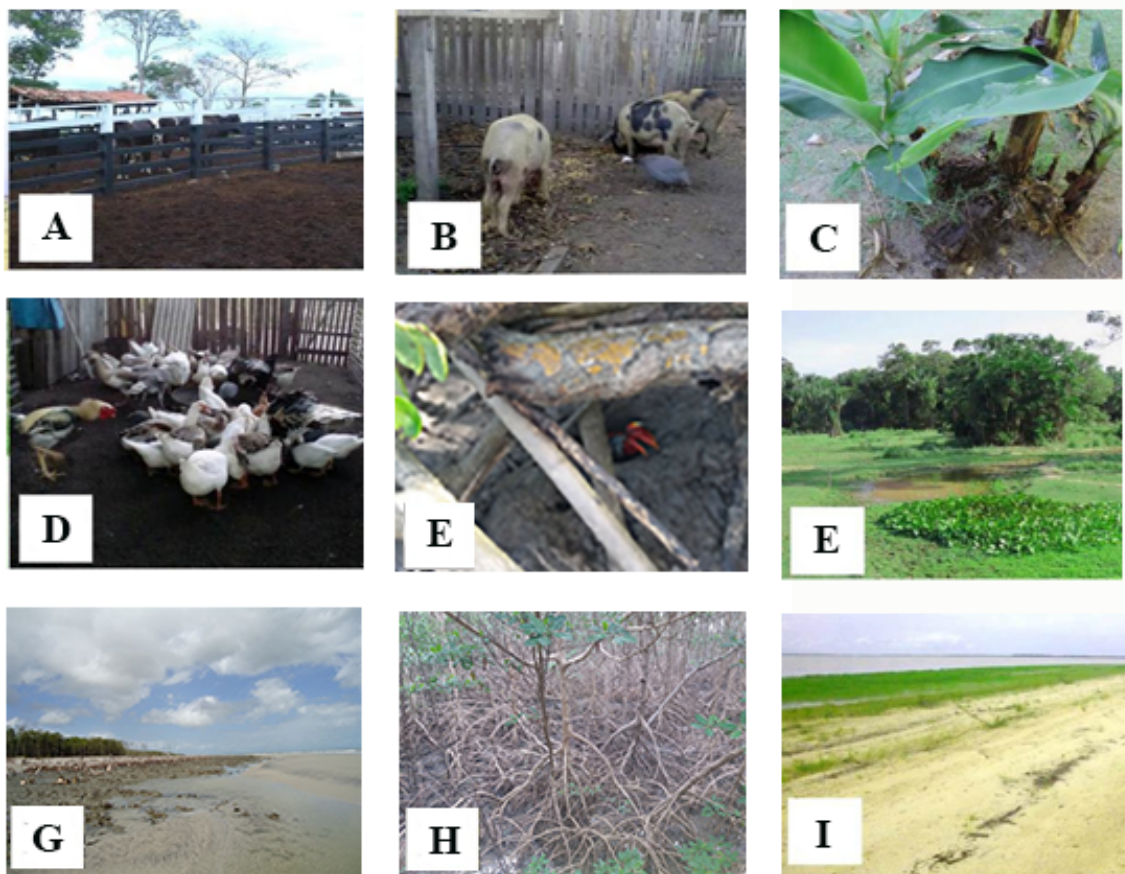
Espécies da família Ceratopogonidae ocorrem em praticamente todas as áreas terrestres do planeta. Os adultos de ceratopogonídeos neotropicais podem ser encontrados desde áreas litorâneas, até em altitudes elevadas. Algumas espécies de *Forcipomyia* e *Dasyhelea* Kieffer são encontradas em 3.700 até 4.000 metros de altitude no Nordeste da Argentina, *Forcipomyia* e *Atrichopogon* a mais de 3.800 metros de altitude na Costa Rica <sup>(6)</sup>. Os *Culicoides* têm ampla

distribuição geográfica, presentes nas tundras e trópicos e no nível do mar até 4.000 m de altitude, com exceção da Antártica e Nova Zelândia <sup>(7,8)</sup>.



**Figura 2.** Ciclo de vida de maruim A-D. **A.** Ovos; **B.** Larva; **C.** Pupa; **D.** Fêmea adulta de *Culicoides insignis*.

Os imaturos podem ser encontrados em ambientes aquáticos, subaquáticos e algumas espécies são terrestres (Figura 3). Provavelmente, atuam como controladores biológicos ou ainda como fonte de alimento para diversos invertebrados e peixes. Possuem grande diversidade de habitat, sendo encontrados nas cascas dos troncos, em musgos úmidos, fungos, fitotelmas, florestas úmidas, praias, montanhas, piscinas naturais, infiltrações, córregos, rios, lagoas, pântanos, lagos, substratos úmidos (como lama, material vegetativo em decomposição), mangues, abrigos de animais domésticos (de zonas rurais, periurbanas e urbanas) <sup>(8-11)</sup>.



**Figura 3.** Ambientes de procriação e habitat de imaturos de *Culicoides*. **A-B, D** Esterco de animais domésticos de zonas rurais (curral, chiqueiros e galinheiros); **C.** Plantações de banana; **E.** Buraco de caranguejo; **F.** Solo encharcado; **G.** Praia litorânea; **H.** Mangue; **I.** Praia fluvial.

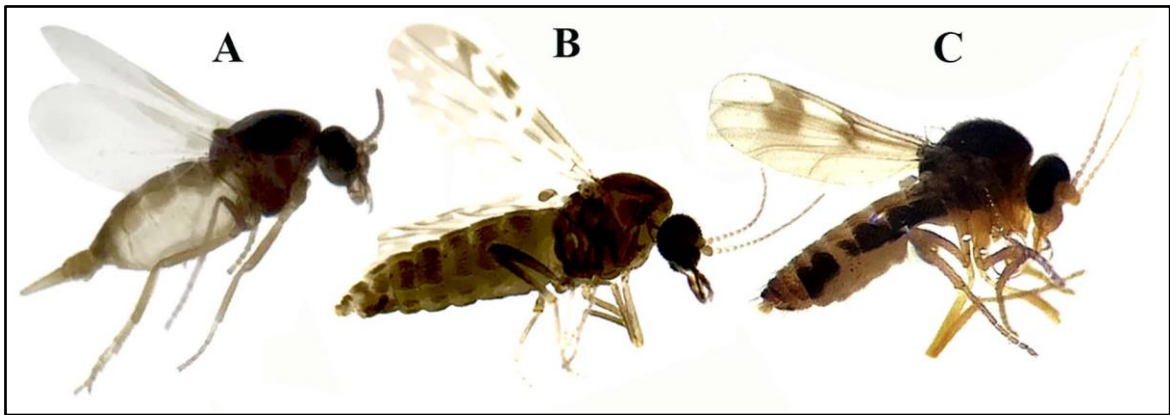
Os machos e fêmeas dessa família alimentam-se de néctar de plantas <sup>(6,12)</sup>, mas as fêmeas também precisam de uma fonte de proteína para desenvolver seus folículos ovarianos. Os hospedeiros vertebrados incluem tartarugas, lagartos, mamíferos, pássaros e peixes <sup>(13)</sup>. Hospedeiros invertebrados, incluem principalmente pequenos insetos, geralmente outros dípteros do antigo clado Nematocera, também invertebrados maiores, como centopéias, aranhas, fasmídeos, catidídeos, uma variedade de coleópteros e lagartas, crisálidas, libélulas e Lepidoptera <sup>(6,9,12,14)</sup>.

As larvas de maruins predadoras podem regular as populações de larvas de mosquitos, como em *Culicoides guttipennis* Boheman, *Forcipomyia* spp. e *Bezzia* sp. que predam larvas de *Aedes aegypti* Linnaeus, vetor do vírus da febre amarela e dengue <sup>(15)</sup>. Além disso, podem até mesmo ser importantes vetores de vírus que ajudam a controlar lagartas <sup>(6)</sup>.

## 1.2 Sistemática

A sistemática dos três gêneros (Figura 4) identificados nesse estudo, *Atrichopogon*, *Culicoides* e *Leptoconops*, baseiam-se principalmente em caracteres morfológicos, que algumas vezes, encontram dificuldades como identificação de espécies crípticas ou em espécies que apresentam plasticidade fenotípica, dificultando a identificação destas a nível específico. Exame de uma dada amostra revela vários ou mais morfótipos que diferem de maneiras pequenas, mas consistentes, fortemente sugerindo a presença de várias espécies; ainda assim, a compilação de todo o material de muitas localidades resulta em uma confusão cada vez maior de recursos diagnósticos <sup>(16)</sup>.

Embora o Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN) forneça diretrizes para o uso e formato dos termos da nomenclatura formal, incluindo o nome da espécie e subgênero <sup>(17)</sup>, as categorias infra-subgenéricas “complexos de espécies” e “grupo de espécies” não têm status formal sob o ICZN, mas o seu uso é prevalente na literatura *Culicoides* <sup>(18)</sup>.



**Figura 4.** Fêmeas adultas de ceratopogonídeos A-C. **A.** *Leptoconops brasiliensis*, **B.** *Culicoides insignis*, **C.** *Atrichopogon riopardensis*.

### 1.3 O gênero *Atrichopogon*

As espécies do gênero *Atrichopogon* (Figura 4C) são da subfamília Forcipomyiinae, um dos gêneros mais abundantes da família, contém 516 espécies, sendo três espécies fósseis extintas<sup>(3)</sup>. Na região Neotropical existem 116 espécies, 31 para o Brasil e sete para região Amazônica, sendo de três subgêneros<sup>(4)</sup>. Eles são comuns em todos os habitats terrestres úmidos (higropétricos) ou higrométricos-higropétricos<sup>(19,20)</sup>. Os adultos alimentam-se de pólenes<sup>(21)</sup>, enquanto alguns são ectoparasitas em grandes insetos<sup>(22,23)</sup>. Borkent e Rocha-Filho<sup>(22)</sup> registraram fêmeas de *Atrichopogon* sugando hemolinfa das asas de um besouro no Brasil.

Os fósseis mais antigos de *Atrichopogon* foram relatados em âmbar, Eoceno do Báltico, como um grupo recente<sup>(19,24)</sup>. O *Atrichopogon* é um gênero que apresenta dificuldades inerentes à sua sistemática, devido à falta de características conspícuas nos adultos, às vezes é necessário usar caracteres imaturos<sup>(25-28)</sup>. Os adultos de *Atrichopogon* são separados da *Forcipomyia* Meigen pelo paratergito torácico com pelo menos uma cerda<sup>(6-29)</sup>. O gênero também possui a apomorfia das cerdas da margem posterior da asa, composta por uma única fileira de cerdas longas e curtas alternadas, e pelo tamanho e distribuição das macrotríquias da asa<sup>(19)</sup>.

Atualmente são reconhecidos sete subgêneros, mas geralmente é difícil ou impossível designar muitas espécies a esses subgêneros na Região Neotropical <sup>(16)</sup>. Os estados de caracteres adultos que atualmente distinguem os subgêneros são quase todos homoplásticos em outros gêneros de Ceratopogonidae e variam incongruentemente dentro do gênero (ou seja, padrões de pigmentação, presença ou ausência de pubescência interfacetada, comprimento da parte bucal, posição da cavidade sensorial no terceiro segmento palpal, número de cerdas paratergais, presença ou ausência de macrotríquias das asas, número de espermatecas). A única sinapomorfia aparentemente boa usada para agrupar *Atrichopogon* adulto no nível subgenérico é a presença de extensões cuticulares originando-se dos esternitos abdominais 8 e 9 das fêmeas do subgênero *Psilokempia* Enderlein <sup>(16)</sup>.

As espécies de *Atrichopogon* apresentadas nesse estudo pertencem a um pequeno grupo de espécies informais de asas manchadas com 12 espécies (*A. casali* Cavalieri & Chiossone, *A. dactilus* Felipe-Bauer, *A. pictipennis* Clastrier, *A. nukini* Felipe-Bauer, *A. shawadaua* Felipe-Bauer, *A. clastrieri* Spinelli & Marino, *A. bicuspis* Borkent & Picado, *A. ornatipennis* Clastrier, *A. cavus* Felipe-Bauer, *A. maculipennis* Clastrier, *A. nebulosus* Macfie e *A. nubeculosus* Macfie, as duas últimas conhecidas apenas as fêmeas). As espécies de *Atrichopogon* com asas manchadas podem apresentar manchas escuras no 1/3 distal da asa com ou sem manchas claras, como em *A. cavus* e em *A. maculipennis* ou duas manchas escuras distintas, uma sobre r-m e a segunda na célula r<sub>3</sub> posterior ao ápice da veia R<sub>3</sub>. Este último tipo de pigmentação de asa é observado em outras espécies de *Atrichopogon* com asas manchadas, incluindo as três espécies descritas neste estudo, capítulo 4.

#### 1.4 O gênero *Culicoides*

As espécies do gênero *Culicoides* (Figura 4B) são da subfamília Ceratopogoninae, sendo o gênero mais diversos da família, contém 1.399 espécies, sendo 52 espécies extintas <sup>(3)</sup>. Na região

Neotropical existem 299 espécies, 151 para o Brasil e 123 para região Amazônica <sup>(4)</sup>. Sua classificação inclui 32 subgêneros e 38 grupos, com 13% das espécies não agrupadas <sup>(30)</sup>.

A maioria das espécies de *Culicoides* são hematófagas, podendo transmitir uma variedade de agentes patogênicos como vírus, protozoários e nematoides <sup>(8)</sup>. Geralmente, fêmeas adultas requerem uma refeição de sangue, para amadurecer seus folículos ovarianos e podem ser encontrados em ambientes florestais úmidos, praias, montanhas e mangues, abrigos de animais domésticos de zonas rurais, periurbanas e urbanas (chiqueiros, galinheiros, currais) <sup>(8,11)</sup>. O ciclo de vida pode durar de três semanas em climas tropicais até um ano em climas temperados <sup>(6)</sup>.

Os adultos desse gênero são caracterizados por olhos compostos, contíguos ou não; antenas com escapo, pedicelo e 13 flagelômeros; palpos maxilares com cinco segmentos, o terceiro é robusto, podendo possuir fossa sensorial com sensilas, ou sem fossa, com sensilas distribuídas no palpo; aparelho bucal das fêmeas é tipo picador sugador. O tórax na região dorsal apresenta desenho de áreas longitudinais mais escuras; pernas com anéis claros e escuros variáveis; tíbia posterior com pente tibial; asas apresentam manchas claras e escuras, algumas exceções, hialinas (caractere com grande variabilidade interespecífica de referência na identificação), veia M bifurcada em M<sub>1</sub> e M<sub>2</sub> e transversal, r-m cruzada <sup>(31-33)</sup>. O Abdome nas fêmeas é robusto com terminália curta e um par de cercos pequenos, arredondados; possuem internamente uma a três espermatecas esclerotizadas, arredondadas, ovais ou piriformes e um anel esclerotizado (a forma, a quantidade de espermatecas e o formato do anel esclerotizado são importantes caracteres taxonômicos) <sup>(33)</sup>. O abdome do macho possui o 9º tergito extenso com bordas laterais convexas; 9º esternito é curto e sua margem posterodistal se encontra escavada; gonocoxito, alongado com dois processos internos basais; gonóstilo levemente largo na base com o ápice pontiagudo; parâmeros geralmente possuem um par de escleritos internos retos, com as bases na forma de nó,

e os ápices recurvados ventralmente, com grandes modificações na forma, direção do nó basal, tronco médio e do ápice; em alguns subgêneros ou grupos de espécies, os parâmeros podem ser fusionados ou fundidos no plano médio, dando lugar a uma estrutura laminar, o edeago, cuja base articula com os bordos laterais da escavação posteriomediana no nono esternito, geralmente em formato de Y <sup>(33)</sup>.

### 1.5 O gênero *Leptoconops*

As espécies do gênero *Leptoconops* (Figura 4A) são da subfamília Leptoconopinae. possuem 173 espécies, sendo 19 extintas <sup>(3)</sup>, os registros fósseis do âmbar Libanês, de cerca de 121 milhões de anos atrás <sup>(34)</sup>. As larvas de *Leptoconops* vivem em solo úmido e geralmente salino de áreas desérticas e praias costeiras e interiores. Eles se enterram no solo ou na areia, alimentando-se dos microrganismos ali encontrados. Os adultos são diurnos e as fêmeas se alimentam do sangue de mamíferos, pássaros e répteis <sup>(35)</sup>. As espécies *Leptoconops bequaerti* (Kieff.) e *L. laurae* (Weiss) são vetores das filárias *Mansonella ozzardi* (Manson) e de outras espécies de filárias <sup>(32,36)</sup>.

Os *Leptoconops* são caracterizados por possuir coloração escura; olhos amplamente separados, fronte desenvolvida, antena com 13 flagelômeros no macho e 11-12 nas fêmeas, flagelômero apical alongado, palpos com segmentos 4 e 5 fundidos. Asas claras; veia costal prolongada ou não além do final de R<sub>3</sub>. Cercos femininos longos ou curtos, sem cerdas longas, alongado e em forma de cone nas fêmeas <sup>(37)</sup>. A maioria das espécies do gênero estão distribuídas em regiões tropicais e subtropicais ao longo do mundo. No entanto, existem espécies descritas em Moscou, Rússia e no Território Yukon no Canadá <sup>(35)</sup>.

A taxonomia de *Leptoconops*, devido ao seu tamanho diminuto, similaridades entre as fêmeas, pode causar algumas dúvidas, e por vezes, a identificação a nível específico só é possível com os machos, gerando complexos de espécies <sup>(38)</sup>.



## 1.6 Taxonomia Integrada

A seleção de espécimes em estudos taxonômicos integrativos quase sempre é baseada inicialmente no exame morfológico. A identificação abrangente com base na morfologia deve, portanto, ser o primeiro passo para iniciar nesses estudos <sup>(18)</sup>. Estudos de taxonomia integrada que agregam caracteres morfológicos, morfométricos e genéticos, em diversas famílias de dípteros vetores, têm sido importantes para elucidar diversidade biológica oculta, ex. em Simulídeos <sup>(39)</sup>, flebotomíneos <sup>(42,43)</sup> e *Aedes* <sup>(44)</sup>.

## 1.7 Morfometria Geométrica – MG

Em estudos com insetos, a asa é amplamente utilizada para comparações morfométricas por causa de sua forma bidimensional e por conter veias que abrangem os Marcos anatômicos (PARs ou Landmarks) naturais que são ideais para marcar os PARs. Além disso, a maioria das nervuras apresentam pontos de referência conspícuos e são homólogas, podendo ser encontradas em todos os representantes do grupo estudado. Usando MG é possível observar onde ocorre a maior fonte de variação da forma. Além disso, essa variação pode ser quantificada para comparações filogenéticas ou biogeográficas <sup>(45)</sup>.

A morfometria geométrica é uma ferramenta que permite analisar a variação da forma das estruturas, retirando o efeito do tamanho, orientação e posição. A análise se baseia no uso de coordenadas cartesianas de PARs e métodos de superposição (Análise Generalizada de Procrustes-AGP) <sup>(45)</sup>: os PARs de diferentes espécimes são sobrepostos por AGP, permitindo extrair o tamanho centroide, e, dessa forma, analisando separadamente a forma e o tamanho <sup>(46)</sup>. É uma ferramenta que corrobora os suportes moleculares para diferenciação de diversas espécies, bem como, espécies crípticas e estudo de população. Outro benefício da MG é que, por meio da análise de regressão multivariada, o efeito alométrico (resíduo) pode ser facilmente removido das análises de formas, tornando possível comparar formas com interferência mínima de tamanhos diferentes <sup>(47)</sup>.

A definição da distância Mahalanobis (dM) é a distância euclidiana num espaço multidimensional. A distância de Procrustes (dP) é similar à distância dM, e geralmente a ordem dos valores não é alterada (ex.  $pop1 > pop3 > pop2$  tanto para dM como para o dP). O que muda é que o dP leva em consideração as diferenças intrapopulacionais e não só interpopulacionais. A dM seria a distância entre esses grupos em função das variáveis canônicas, baseada nas correlações entre variáveis com as quais distintos padrões podem ser identificados e analisados, sendo uma estatística útil para determinar a similaridade entre uma amostra desconhecida e uma conhecida. Quando trabalhamos com espécies diferentes, é importante saber quais seriam as variações entre os indivíduos de uma mesma espécie para compará-los com outra.

### 1.8 **Biologia molecular**

A biologia molecular tem gerado conhecimento e tem sido uma ferramenta muito importante, aumentando a capacidade de identificar espécies e caracterizar a biodiversidade, bem como, avaliar a variabilidade genética inter e intrapopulacional de diversos organismos relacionando com a distribuição das espécies em habitats locais, ecossistemas, paisagens, continentes e outros.

Ferramentas moleculares utilizadas para mostrar variação genética são algumas vezes, mais eficientes na discriminação de subdivisões populacionais intraespecíficas do que a biometria morfológica tradicional. Análises genéticas usando regiões do DNA mitocondrial (COI e COII), DNA ribossomal (ITS-1 e ITS-2) e DNA nuclear (CAD), dentre outras, são utilizadas para analisar as relações filogenéticas e/ou caracterização de espécies de *Culicoides*, diferenciação de espécies-crípticas e complexos de espécies <sup>(41,48-52)</sup>.

### 1.9 **Barcode**

Um projeto internacional conhecido como “DNA Barcoding of life” (<http://www.Barcoding.si.edu/DNABarCoding.htm>) foi proposto com objetivo de gerar sequências de

aproximadamente 648 pb do gene *Citocromo Oxidase subunidade I* localizado no DNA mitocondrial, como ferramenta de auxílio em filogenética e catalogar a biodiversidade. A utilização do DNAm permite que mesmo espécies próximas sejam discriminadas, pois possuem herança materna, alta taxa de mutação e ausência de recombinação<sup>(53)</sup>. A eficácia do DNA Barcode depende da seleção de um segmento adequado de DNA, pois sua taxa de mutação deve ser lenta o suficiente para que a variação intraespecífica seja minimizada, mas suficientemente rápida para destacar a variação interespecífica, deve ser relativamente fácil de coletar e deve ter o mínimo de inserções ou deleções possíveis para facilitar o alinhamento da sequência<sup>(54)</sup>.

Geralmente, o genoma do DNAm de animais é um melhor alvo para análise do que o genoma nuclear por causa de seu alto número de cópias, ausência de introns, sua exposição limitada à recombinação e seu modo haploide de herança<sup>(54)</sup>. Os introns, regiões intergênicas, estão ausentes nas sequências dos DNAm também dos invertebrados<sup>(55)</sup>. Para a identificação de espécies através do DNA Barcode é necessário que cada espécie seja como um grupo monofilético<sup>(56)</sup>. As sequências do DNA Barcode geralmente não apresentam um sinal filogenético forte que determine relações evolutivas, mesmo que esse método use construção de árvores filogenéticas, mas pode ser um ponto de partida para estudos filogenéticos, bem como para genética de população<sup>(57)</sup>. Também consideramos valores limite para as divergências nucleotídica intraespecíficas de 3% (valor estabelecido para insetos)<sup>(54)</sup> e a divergência nucleotídica entre espécies pertencentes ao mesmo gênero deve ser 10 vezes superior à média da divergência intraespecífica encontrada para as mesmas espécies<sup>(58)</sup>.

Uma sequência desconhecida de DNA Barcode de inseto pode ser comparada com uma biblioteca de sequências de referência, podendo ser possível que o espécime desconhecido pertença ao táxon já depositado ou a um grupo com espécies próximas; e se a sequência desconhecida não

corresponde a nenhuma no banco de dados, então deposita-se um novo haplótipo ou uma variante geográfica, ou pode-se supor, que seja uma nova espécie <sup>(57,59)</sup>.

### **1.10 Plasticidade fenotípica**

Em diferentes ambientes, um dado genótipo pode se expressar como uma variedade de fenótipos, um processo denominado plasticidade fenotípica. Portanto, a plasticidade fenotípica é definida como a capacidade de um determinado ser vivo apresentar diferentes características em função das condições ambientais <sup>(60)</sup>.

### **1.11 Hipóteses sugeridas para explicar a diversificação das espécies na Amazônia**

Segundo Haffer <sup>(61)</sup> as principais hipóteses propostas para explicar a formação de barreiras separando populações e causando a diferenciação de espécies na Amazônia ao longo da história geológica são baseadas em diferentes fatores, como segue: (1) Mudanças na distribuição de terra e mar ou na paisagem devido a movimentos tectônicos ou flutuações do nível do mar (Hipótese da paleogeografia); (2) o efeito de barreira dos rios amazônicos (hipótese do rio); (3) uma combinação do efeito de barreira de grandes rios e mudanças na vegetação no norte e sul da Amazônia (Hipótese de refúgios de rio); (4) o isolamento de blocos de floresta úmida perto de áreas de relevo superficial na periferia da Amazônia separados por florestas secas, savanas e outros tipos de vegetação intermediários durante os períodos climáticos secos do Terciário e Quaternário (Hipótese do Refúgio); (5) mudanças na densidade do dossel devido a reversões climáticas (hipótese da densidade do dossel); (6) o isolamento e especiação de populações animais em pequenas áreas montanhosas na Amazônia devido a flutuações climáticas sem maiores mudanças vegetacionais (Hipótese do Museu); (7) interações de espécies competitivas e isolamentos de espécies locais em regiões periféricas da Amazônia devido à invasão e contra invasão durante os períodos frios / quentes do Pleistoceno (Hipótese de perturbação-vicariância); e (8) especiação parapátrica através de gradientes ambientais íngremes sem separação das respectivas populações (Hipótese do

gradiente). Várias dessas hipóteses provavelmente são relevantes em um grau diferente para os processos de especiação em diferentes grupos faunísticos ou durante diferentes períodos geológicos.

A origem de novas espécies dentro da faixa de espécies progenitoras sem separação geográfica (especiação simpátrica) pode ocorrer como exemplo, no gênero *Paraspiculatus* (Lepidoptera: Lycaenidae), dez das 19 espécies de *Paraspiculatus* são simpátricas na bacia do alto Amazonas abaixo de 1.250 m. Cinco dessas espécies simpátricas são de um único complexo de espécies. Este exemplo de aparente diversificação in situ é responsável por grande parte da diversidade simpátrica em *Paraspiculatus* na bacia do alto Amazonas <sup>(62)</sup>.

## 2. JUSTIFICATIVA

Em estudos de *Culicoides* realizados na Amazônia Central brasileira, foram encontrados altos índices de diversidade, com 46 espécies, sendo cinco espécies novas para o grupo *reticulatus* e 39 morfótipos em sete subgêneros/grupos que não puderam ser identificados pela morfologia clássica por apresentar variações morfológicas das espécies já descritas <sup>(63-67)</sup>. Essa situação deve se repetir em diversas áreas na Amazônia, tornando-se necessário adicionar outros métodos combinados de diagnose morfológica, como análises morfométricas e genéticas, para elucidar de maneira mais precisa a diversidade de *Culicoides*.

Na Amazônia brasileira, a ocorrência de *Leptoconops brasiliensis* é provavelmente generalizada: Trindade e Gorayeb <sup>(68)</sup> corrigiram a distribuição da espécie tipo restringindo *L. brasiliensis* para o estado do Pará; Pessoa et al. <sup>(69)</sup> assinalaram *L. brasiliensis* no estado do Acre, sudeste da Amazônia; Farias et al. <sup>(70)</sup> assinalaram *L. brasiliensis* para o estado do Amazonas, município de Tefé. Esta espécie também ocorre na Argentina e no Uruguai <sup>(6)</sup>. Além dos efeitos de suas picadas, a importância médica no Brasil é desconhecida. No entanto, o fato de *L. brasiliensis* ter sido coletados em uma área endêmica de mansonelose, indica que deve ser mais estudada <sup>(70)</sup>.

O gênero *Atrichopogon* é o segundo mais abundante da família Ceratopogonidae, existem na Amazônia brasileira apenas 10 espécies, sendo duas do grupo de espécies de asas manchadas. Os machos e as fêmeas de muitos *Atrichopogon* adultos alimentam-se de néctar (obtendo energia para seu voo) e costumam ser comuns em flores, fornecendo assim, importante serviço para o ecossistema, provavelmente são polinizadores de diversas outras plantas na América tropical, possivelmente incluindo manga (*Mangifera indica*) e várias palmeiras. Além disso, a sucção de

hemolinfa de grandes insetos sugere a possibilidade de que eles possam estar envolvidos na transmissão de vírus de um inseto hospedeiro para outro, principalmente entre as lagartas <sup>(6)</sup>.

A correta identificação de um inseto de interesse ecológico/econômico/epidemiológico é premissa básica para a solução de qualquer problema entomológico que venha a ocorrer, como: pragas agrícolas, emergência e re-emergência de doenças, entre outros. A taxonomia desses dípteros com base nas características morfológicas é difícil devido seu diminuto tamanho e ocorrência de espécies crípticas e complexos de espécies e aquelas que apresentam plasticidade fenotípica, o que levam a identificações errôneas.

Espécies crípticas são espécies com discretas diferenças morfológicas que permanecem indetectáveis quando avaliadas por meio de taxonomia clássica. Segundo Mazzoni et al. <sup>(71)</sup> várias espécies de insetos são diferenciadas, avaliando os seguintes fatores: características genéticas, ecológicas e comportamentais, suscetibilidade à infecção e hábitos alimentares <sup>(71)</sup>. Espécies crípticas são uma ocorrência comum entre insetos vetores da doença como por exemplo nas subfamílias Anophelinae, Culicidae, Triatominae e Phlebotominae <sup>(72-74)</sup>. Na subfamília Phlebotominae, a baixa capacidade de voo e o isolamento geográfico contribuíram significativamente para o surgimento de espécies crípticas <sup>(75)</sup>.

O uso combinado da taxonomia integrada pode ajudar com mais segurança a identificar espécies, discriminar subespécies, discriminar subpopulações, inferir distâncias genéticas entre populações, inferir parentesco e outros. Uma identificação precisa é de grande importância na vigilância de doenças transmitidas por artrópodes, pois grandes diferenças na capacidade vetorial são encontradas mesmo entre espécies próximas <sup>(76)</sup>.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Ampliar o conhecimento sobre a biodiversidade de gêneros representativos das três subfamílias de maruins (Diptera: Ceratopogonidae), coletadas em regiões distintas na Amazônia, por meios de taxonomia tradicional e integrada.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Identificar a fauna de maruim (*Atrichopogon*, subfamília Forcipomyiinae; *Culicoides*, subfamília Ceratopogoninae; e *Leptoconops* subfamília Leptoconopinae) coletados em regiões distintas na Amazônia;
- Analisar as variações no tamanho e na forma das asas das espécies dos gêneros *Culicoides* e *Leptoconops* e avaliar se essas análises podem ser úteis na sua identificação;
- Determinar se a geometria da asa pode ser usada para distinguir populações;
- Avaliar a precisão na identificação de espécies de *Culicoides* com o gene *Citocromo Oxidase subunidade I* (COI) do DNA mitocondrial (Barcode);
- Identificar se os clusters formado por ambas as técnicas são consistentes com a classificação atual para as espécies;
- Verificar a presença de complexo espécies;
- Apresentar mapas de distribuição das espécies coletadas no estudo;
- Realizar descrição taxonômica de novas espécies encontradas nesse estudo.



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Coletas de campo

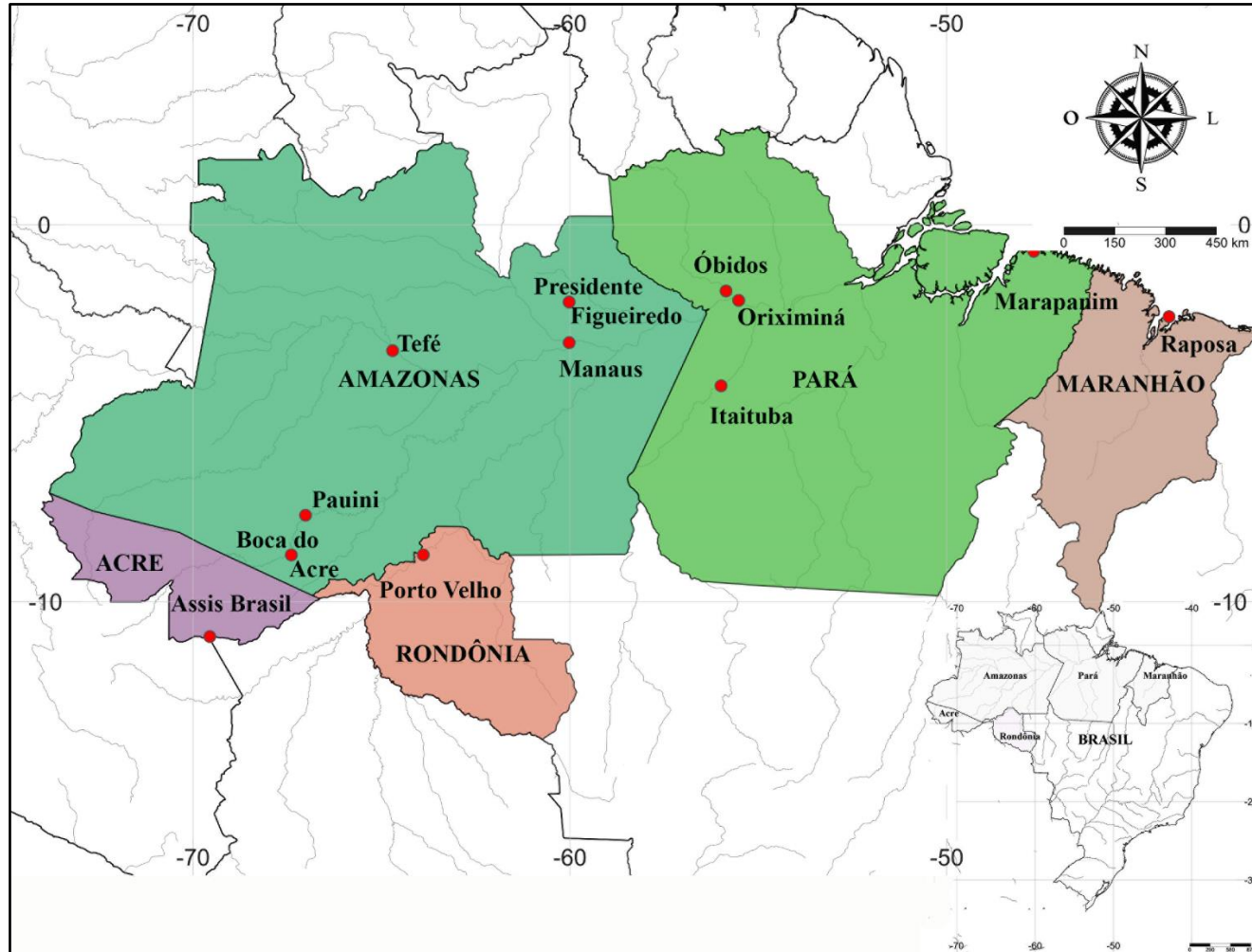
Os espécimes foram coletados em conjunto com outros grupos de insetos vetores, tais como, mosquitos e flebotomíneos. Os ceratopogonídeos não foram o grupo alvo durante a amostragem, é provável que apenas uma fração das espécies existentes, nessas áreas, tenham sido coletadas neste estudo. Os ceratopogonídeos foram amostrados com armadilha de luz CDC, armadilha malaise e puçá em enxameamentos.

**Armadilha luminosa tipo CDC** (Figura 5A), consiste de uma luz alimentada por uma bateria de 12 volts ou pilhas alcalinas tipo “D”, um pequeno ventilador, um "prato" para proteção da chuva, saco coletor de tecido e um copo coletor, sendo indicada para a captura de dípteros em geral. De forma geral, as lâmpadas isoladas, situadas longe das grandes concentrações urbanas de luz e as noites mais escuras produzem os melhores resultados; **Armadilha malaise** (Figura 5B), funciona muito bem para amostrar muitas espécies. Essa armadilha lembra uma barraca de camping, no alto da armação existe um recipiente no qual os insetos são acondicionados; **Puçá entomológico** (Figura 5C), utilizada especialmente em captura em enxameamentos. Cabo com aro de 35cm de diâmetro e cesto com profundidade de 90cm em rede de voil branca muito fina para captura de maruins.

As coletas foram realizadas em diferentes áreas na Amazônia: municípios de Itaituba, Marapanim, Óbidos e Oriximiná no estado do Pará; municípios de Boca do Acre, Manaus, Pauini, Presidente Figueiredo e Tefé no estado do Amazonas; município Porto Velho no estado de Rondônia; município de Assis Brasil no estado do Acre; município da Raposa Maranhão (Figura 6).



**Figura 5.** Armadilhas usadas na coleta de ceratopogonídeos. **A.** Armadilha luminosa tipo CDC; **B.** Armadilha Malaise; **C.** Puçá entomológico (Fotos EDTA).



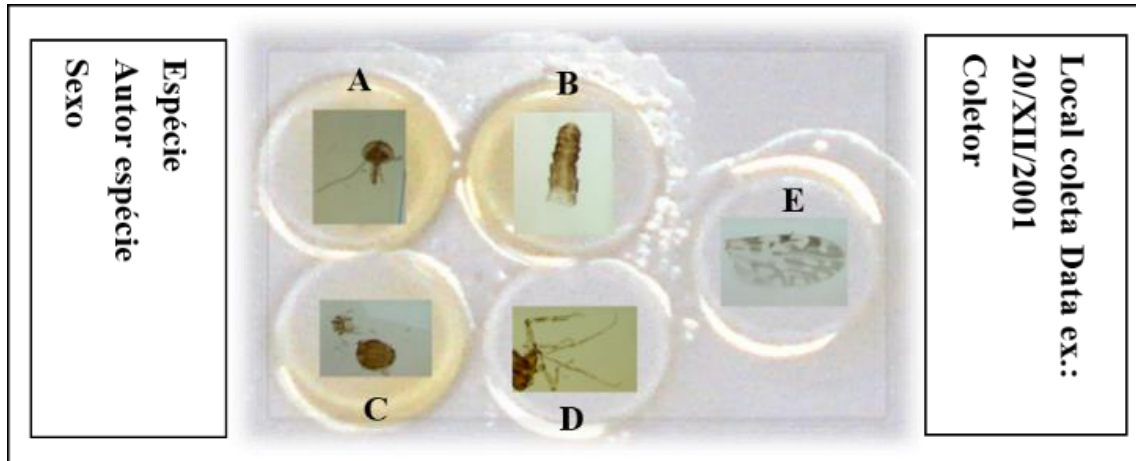
**Figura 6.** Mapa dos municípios onde foram feitas as coletas de *Atrichopogon*, *Culicoides* e *Leptoconops*, nos estados do Acre, Amazonas, Maranhão, Pará e Rondônia, no Brasil (modificado após SimpleMappr, <http://www.simplemappr.net>).

#### 4.2 Preparação de lâminas para microscopia

Os espécimes foram morfotipados com auxílio de um microscópio estereoscópico (Lupa). Alguns exemplares de cada morfótipo foram processados individualmente no procedimento de dissecação para a montagem em lâmina para análise microscópica e identificação morfológica e análise de morfometria geométrica. Estruturas geminadas do lado direito como pernas e asa, posição ventral do inseto, e também parte do abdome, foram armazenados em álcool absoluto e refrigerado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior extração de DNA. A asa esquerda, lado ventral do inseto, foi montada entre lâmina e lamínula sem tratamento com KOH, para identificação morfológica e marcação dos PARs, as demais estruturas tratadas com KOH, foram montadas entre lâmina e lamínula em método fenol-bálsamo (Figura 7), conforme metodologia descrita por Wirth e Marston<sup>(77)</sup>. O método fenol-bálsamo utilizado para montar os exemplares de maruins, consiste em:

1. Dissecar a seco o exemplar, separando as asas do resto do corpo;
2. Em seguida, as asas são montadas em fenol entre lâmina-lamínula e preenchida com fenol-balsamo (50 - 50 %);
3. O resto do corpo é colocado em KOH 10% para clarificar durante aproximadamente 20 minutos;
4. Depois transferido do KOH para água, para tirar o excesso de KOH;
5. Em seguida, é colocado em fenol onde é dissecado, separando-se a cabeça, as pernas, o abdome e o tórax/mesonoto;
6. Cada peça é montada individualmente em fenol, na mesma lâmina, onde estão as asas, sob pedaços de lamínulas na seguinte ordem: abdome, pernas, cabeça e mesonoto;

As peças são montadas no centro da lâmina de forma que as etiquetas com os dados de coleta e identificação sejam colocadas uma em cada extremidade da lâmina (Figura 7). As lâminas são secas em temperatura ambiente e preenchidas diariamente com fenol-balsamo, por no mínimo 4 dias.



**Figura 7.** Esquema mostrando a disposição das estruturas morfológicas (montada entre lâmina/lamínula, método fenol/balsamo), utilizadas na identificação de maruins. **A.** Cabeça; **B.** Abdome; **C.** Tórax/Mesonoto; **D.** Pernas; **E.** Asa.

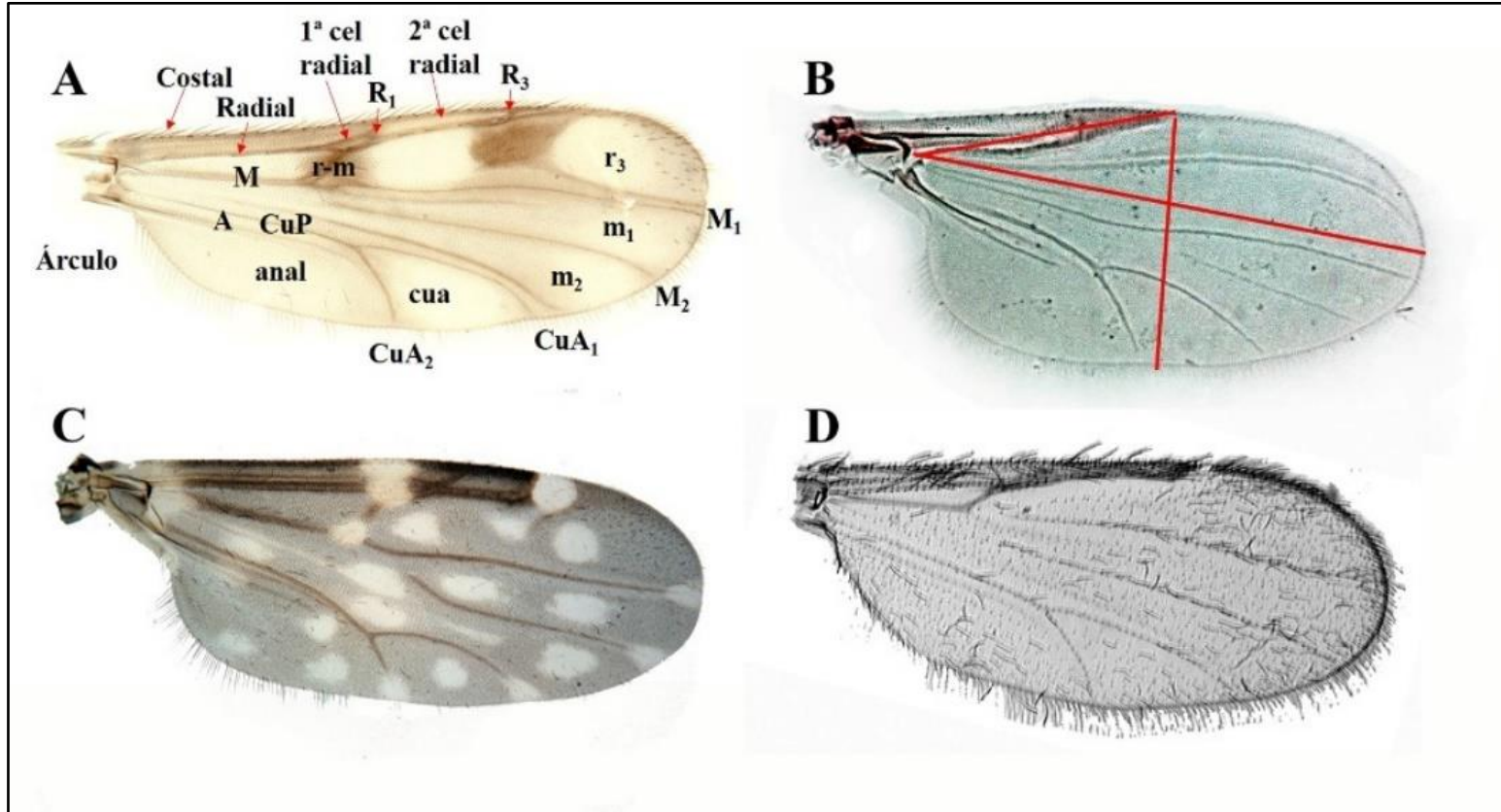
Principais estruturas de importância taxonômica como asas, palpos, genitálias, tórax e pernas foram montadas, fotografadas e apresentadas como pranchas, quando necessário, através de análise de imagem por meio de software Auto Montage 4.0 (Syncroscopy), adaptado ao microscópio óptico LEICA DMLB e uma câmera digital JVC, modelo KY-F55BE, para caracterização morfológica, redescritção de espécies e descrição de novos táxons.

#### 4.3 Identificação morfoanatômica dos maruins

Os espécimes montados foram identificados a nível de espécie, através de observações por microscopia óptica, seguindo as chaves de identificação, artigos com descrição de espécies e posteriormente comparação com espécies depositadas na coleção de Ceratopogonidae do Instituto

Oswaldo Cruz. Essa identificação morfoanatômica dos maruins foi realizada através de vários caracteres morfológicos externos (Figura 8-16), analisados microscopicamente:

1. Disposição das manchas nas asas (quando presente), comprimento e relação costal da asa (Figura 8);



**Figura 8.** Asas de fêmea de ceratopogonídeos A-D. **A.** *Atrichopogon*, **B.** *Leptoconops*. **C-D.** *Culicoides*.

2. Cabeça (Figura 9): relação do comprimento da probóscide/comprimento da cabeça (*Culicoides*) e relação do comprimento da probóscide/largura da cabeça (*Atrichopogon* e *Leptoconops*);

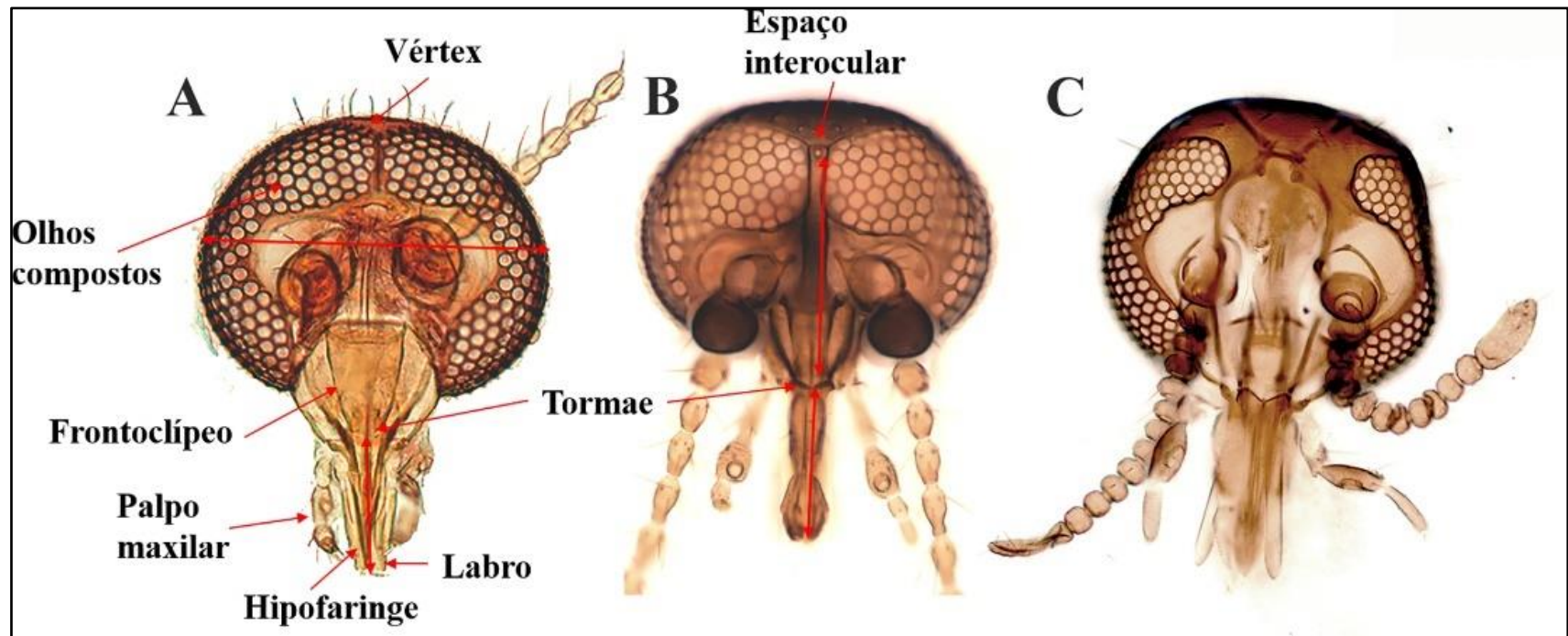
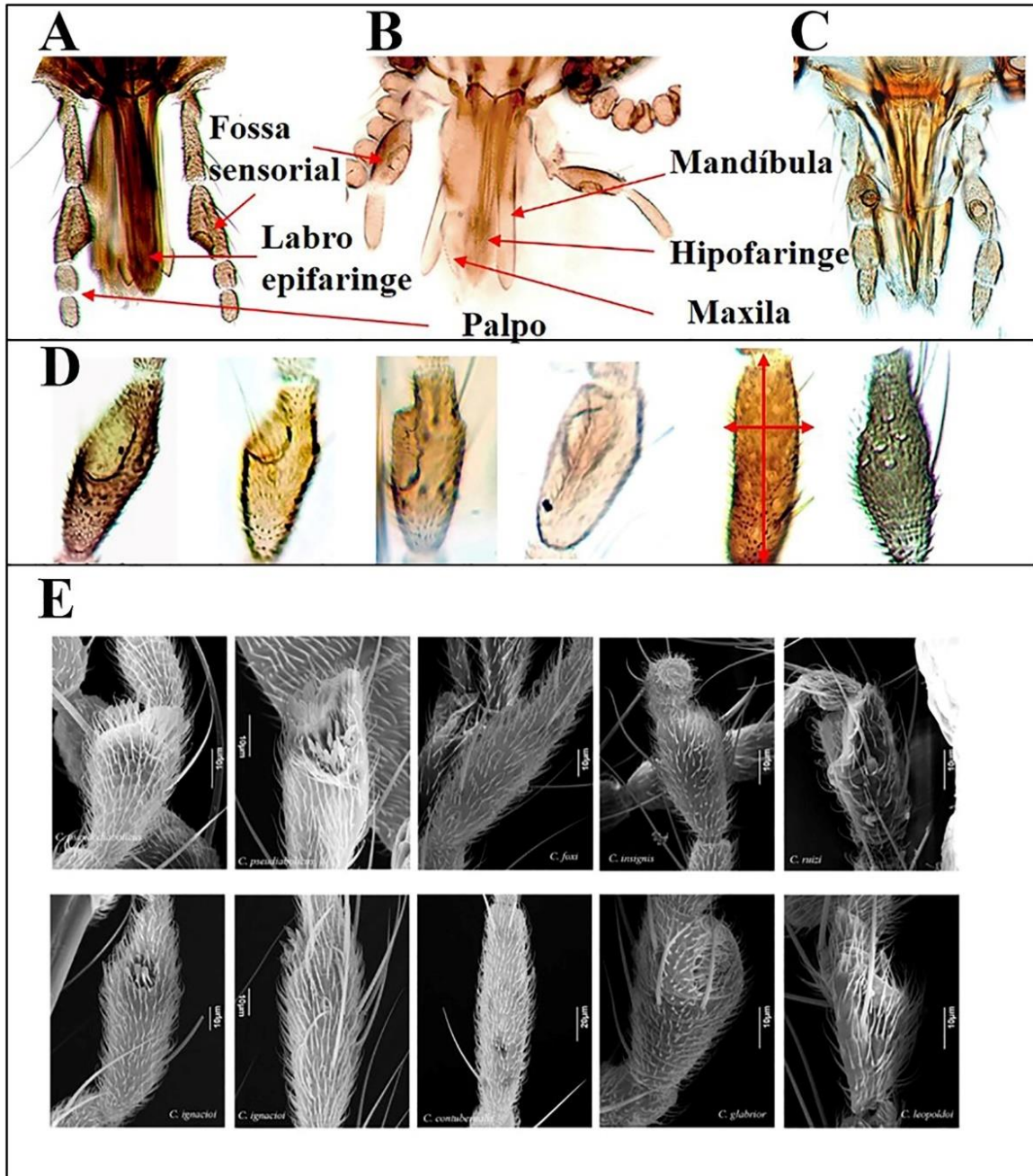


Figura 9. Cabeça de fêmeas de ceratopogonídeos A-D. A. *Atrichopogon*; B. *Culicoides*; C-D. *Leptoconops*.

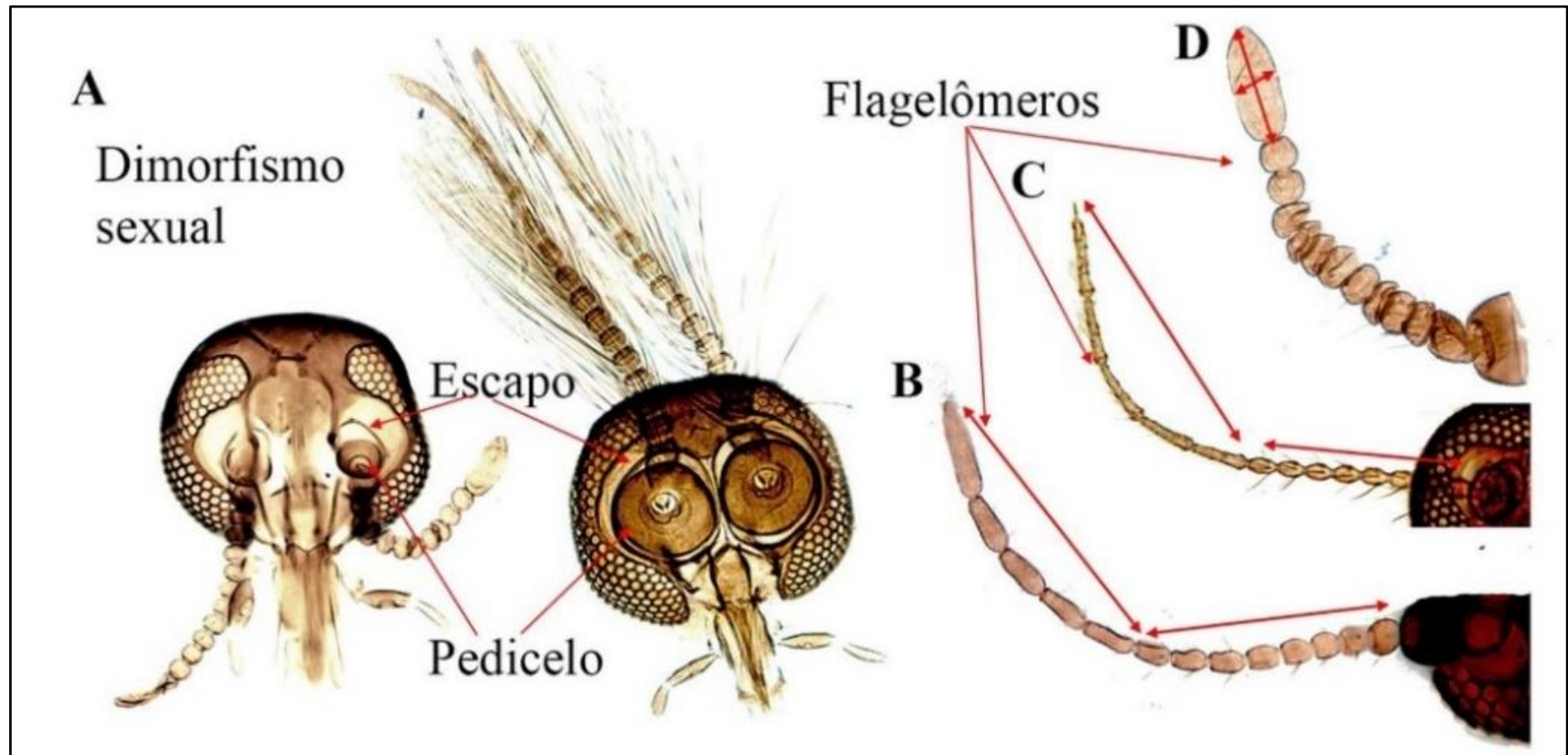


3. Probóscide (Figura 10): forma e relação palpal: comprimento/largura do 3º segmento do palpo e variabilidade morfológica do órgão sensorial do 3º segmento do palpo;



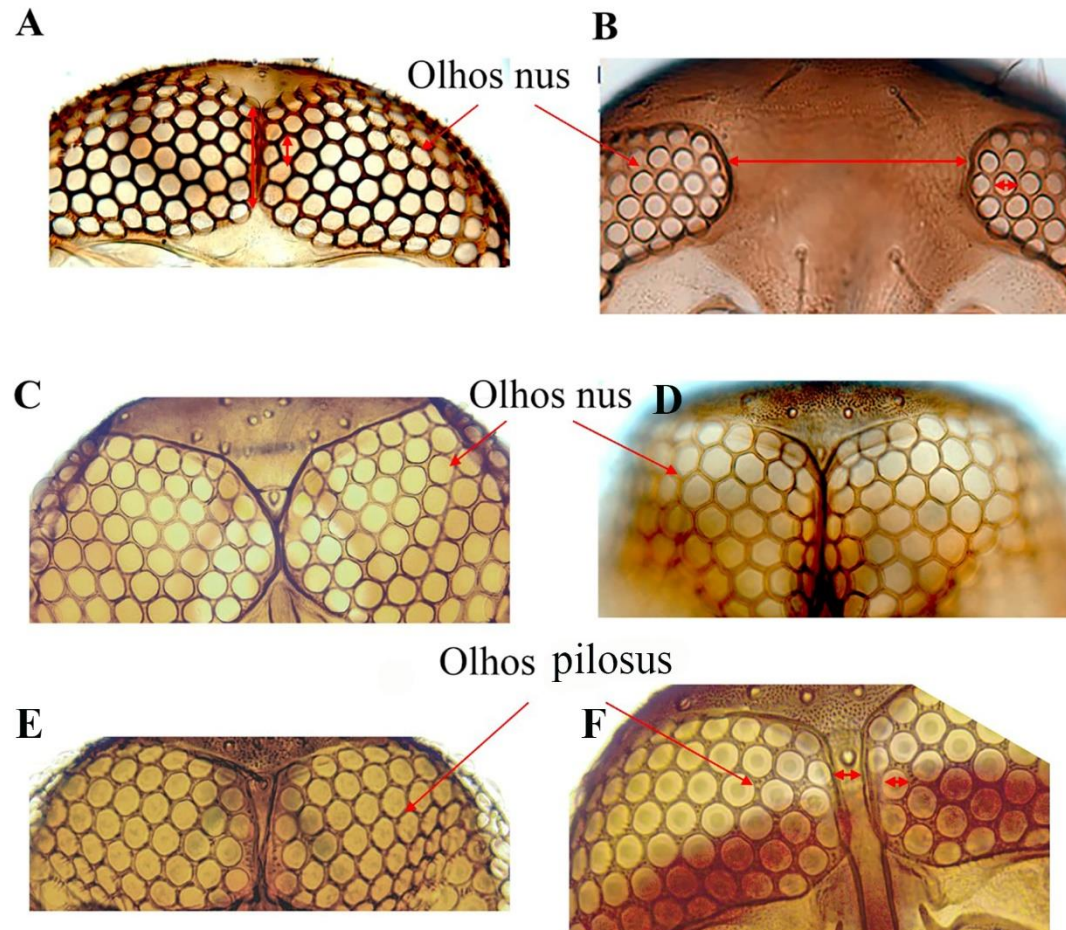
**Figura 10.** Probóscide de fêmeas de ceratopogonídeos A-E. **A.** *Culicoides*; **B.** *Leptoconops*; **C.** *Atrichopogon*, **D.** Imagens feitas com auxílio de um microscópio óptico mostrando diferentes formas do 3º segmento do palpo e fossa sensorial; **E.** Imagens feitas com microscopia de varredura mostrando diferentes formas do 3º segmento do palpo e fossa sensorial.

4. Antena (Figura 11): comprimento, relação antenal, forma e número dos segmentos flagelares;



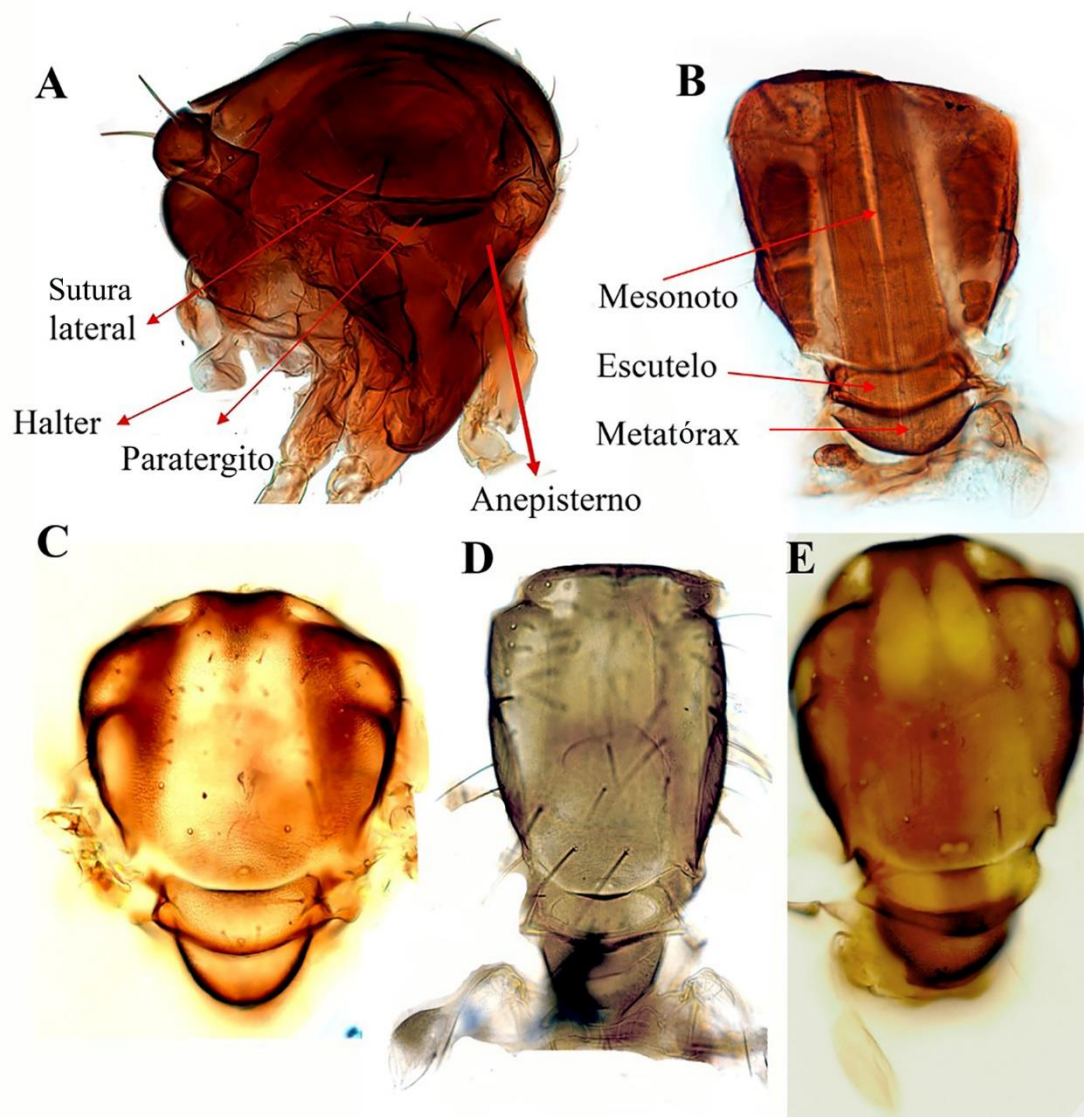
**Figura 11.** Antena de fêmeas de ceratopogonídeos A-D. **A.** Cabeça de fêmea e macho de *Leptoconops* mostrando dimorfismo sexual; **B.** Antena de *Culicoides*; **C.** Antena de *Leptoconops*; **D.** Antena de *Atrichopogon*.

5. Olhos (Figura 12): pilosos ou nus; podendo ser largamente separado, estreitamente separado; a distância é medida pelo tamanho dos omatídeos.



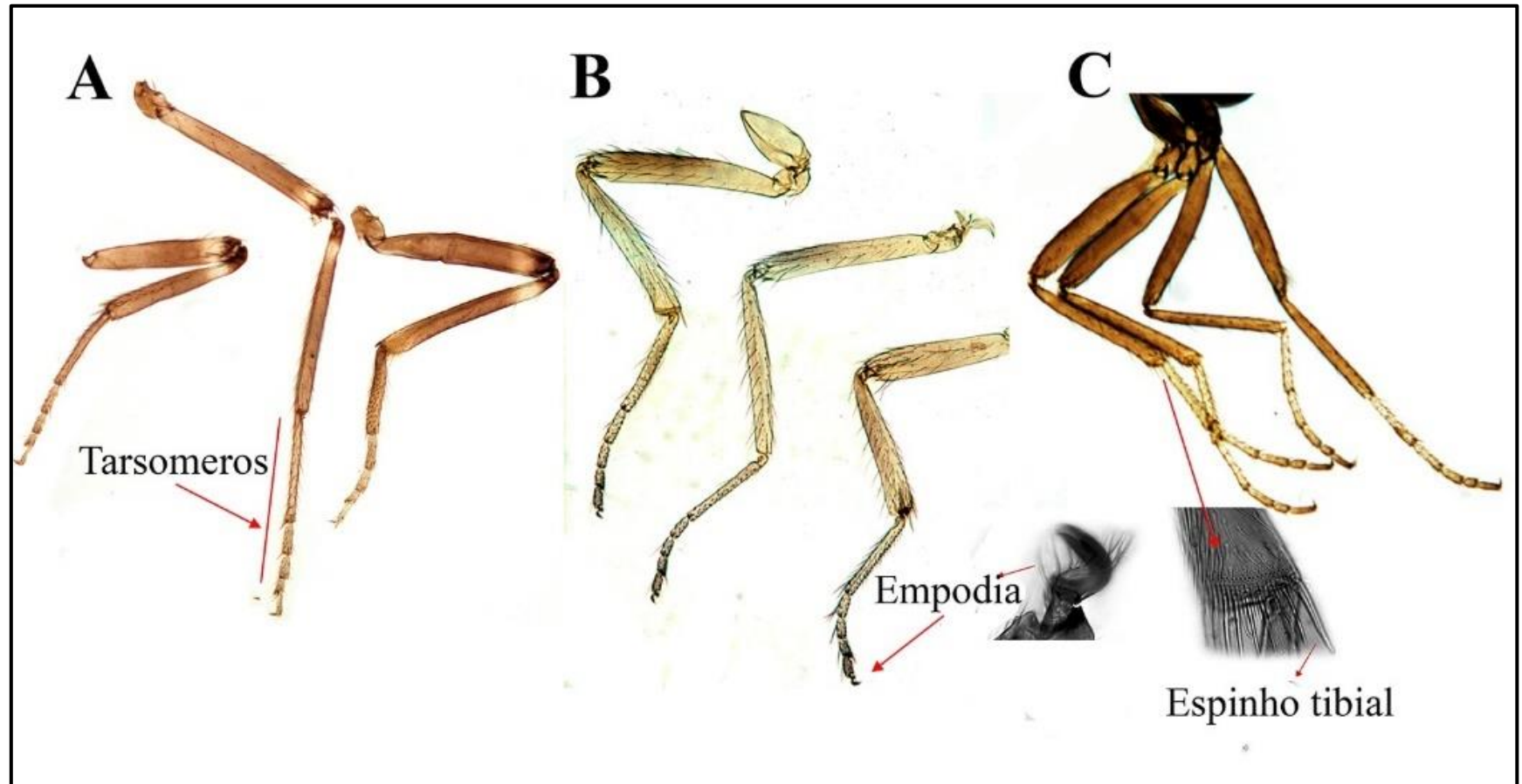
**Figura 12.** Olhos de fêmeas de ceratopogonídeos A-C. **A.** Olhos de *Atrichopogon*; **B.** Olhos de *Leptoconops*; **C-F.** Olhos de *Culicoides*.

6. Tórax (Figura 13): coloração do tórax e do halter;



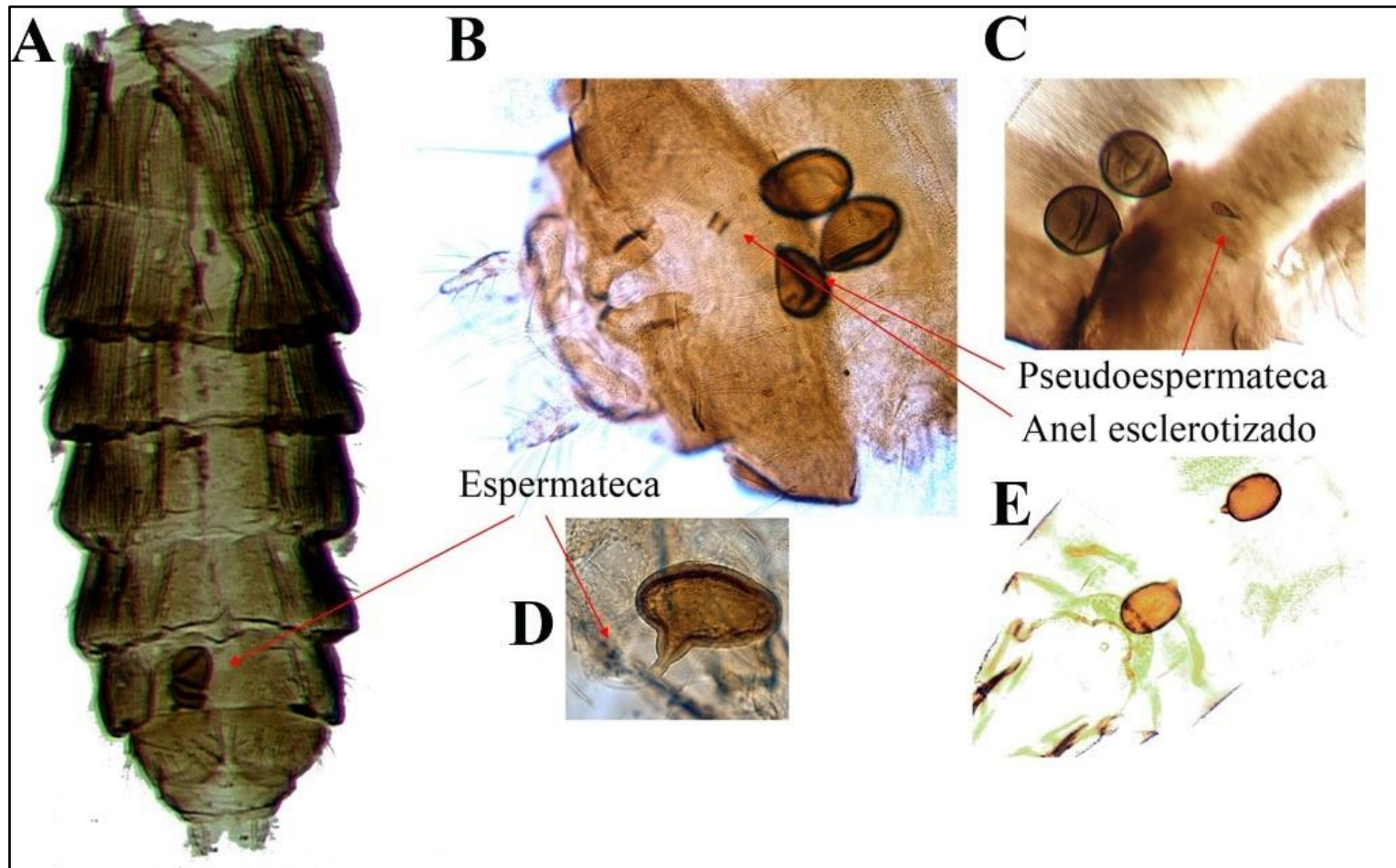
**Figura 13.** Tórax de fêmeas de ceratopogonídeos A-E. **A.** Tórax de *Leptoconops*, vista lateral; **B.** Tórax de *Leptoconops*, vista dorsal; **C-E.** Tórax de *Culicoides*, vista dorsal.

7. Pernas (Figura 14): coloração, comprimento dos segmentos tarsais e número de cerdas no pente tibial;



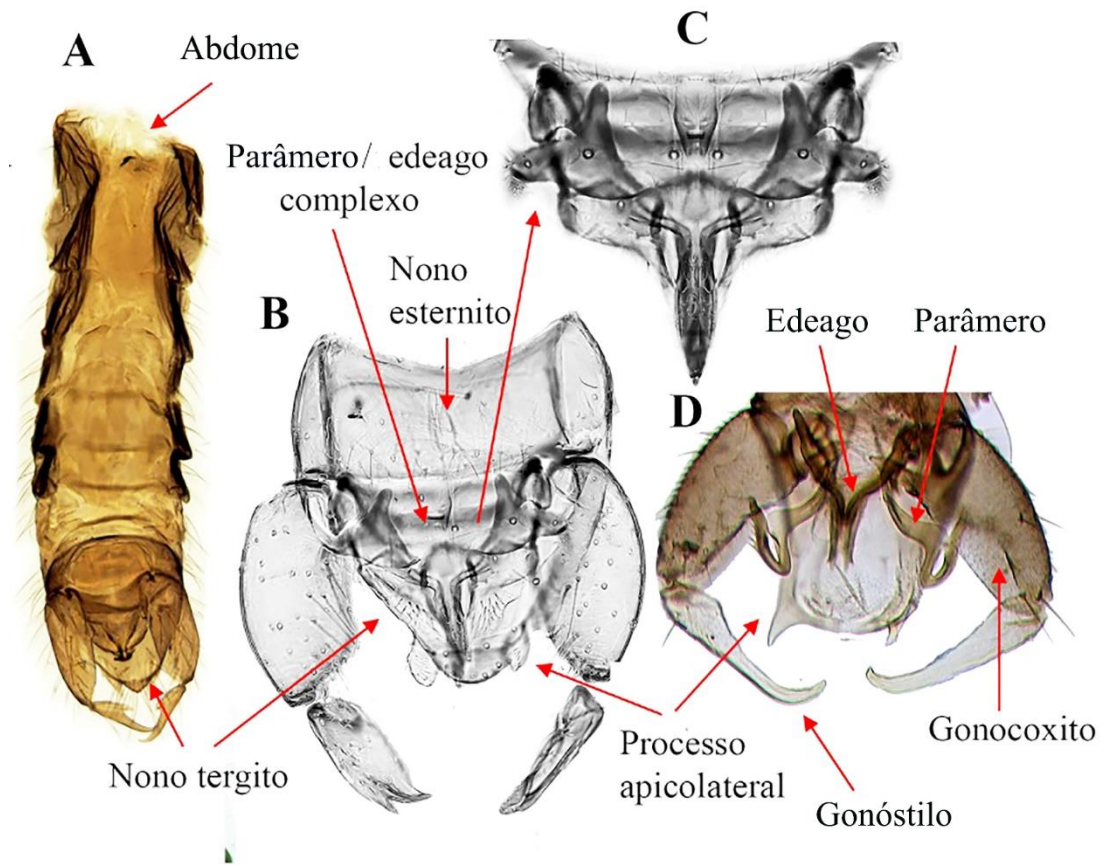
**Figura 14.** Pernas de fêmeas de ceratopogonídeos A-C. A. *Culicoides*; B. *Atrichopogon*; C. *Leptoconops*.

8. Abdome da fêmea (Figura 15): número, comprimento e forma das espermatecas da genitália feminina;



**Figura 15.** Abdome e genitália de fêmeas de ceratopogonídeos A-E. A-C. *Culicoides*; D. *Atrichopogon*; E. *Leptoconops*.

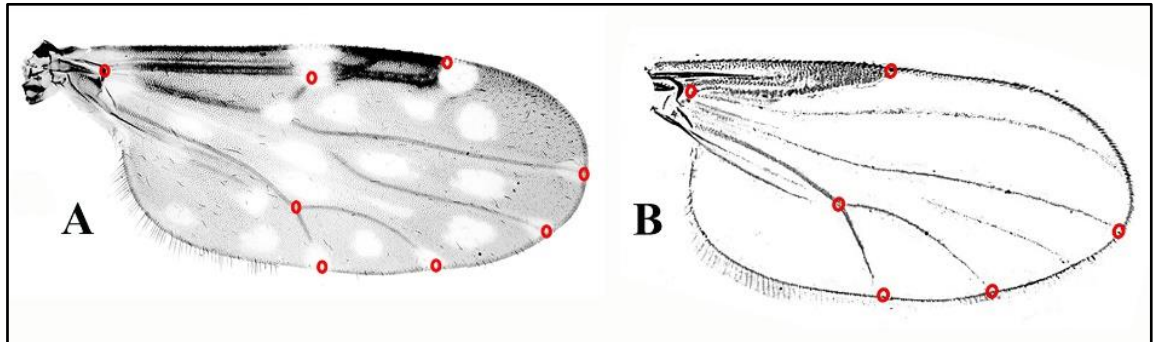
9. Abdome do macho (Figura 16): coloração e forma da genitália masculina.



**Figura 16.** Abdome de macho ceratopogonídeos A-D. **A.** Abdome, vista ventral; **B, D.** Genitálias, vista ventral; **C.** Parâmeros/edeago complexos, vista ventral.

#### 4.4 Morfometria Geométrica-MG

As imagens das asas foram obtidas através de câmera digital JVC KY-F55B acoplada microscópio ótico, em aumento 10x, sendo selecionados oito PARs nas asas das fêmeas de *Culicoides* (Figura 17A), 1, 2 e 8 do tipo I (encontro entre dois tecidos) e 3-7 do tipo II (característica pontual), nas seguintes posições da asa: (1) entre a bifurcação do árculo basal com a veia radial, (2) entre a bifurcação da r-m com R1, (3) corresponde ao ápice costal, (4) veia M1, (5) veia M2, (6) veia na CuA1, (7) veia na CuA2, (8) entre a bifurcação da CuP com a veia CuA. Para os *Leptoconops* foram selecionados seis PARs (Figura 17B), 1 e 6 do tipo I (encontro entre dois tecidos) e 2-5 do tipo II (característica pontual) (Figura 2 B-C), nas seguintes posições da asa: (1) entre a bifurcação do árculo basal com a veia radial, (2) corresponde ao ápice costal, (3) veia M1, (4) veia na CuA1, (5) veia na CuA2, (6) entre a bifurcação da CuP com a veia CuA.



**Figura.** Pontos Anatômicos de referência – PARs utilizados para Análise de Morfometria Geométrica- MG de asas de fêmeas de ceratopogonídeos. **A.** Oito PARs (pontos vermelhos) em asa de *Culicoides*. **B.** Seis PARs (pontos vermelhos) utilizados em asa de *Leptoconops*.

Para MG foram feitas Análise Generalizada de Procrustes (GPA), seguida de Análise de Componentes Principais (CPA) com o teste ANOVA e teste de Turkey, e após confirmação das significâncias das diferenças, foram feitas Análises Classificatórias usando de Análise de Variáveis Canônicas (CVA) (comparação entre n grupos) e comparações pareadas utilizando Funções



Discriminantes (FD). Para avaliar a diferença entre os pares de espécies foi feita análise discriminante com 1.000 testes de permutação, para medir acurácia. Para identificar se a diferenciação das espécies é significativa foi realizado uma MANOVA, que testa a igualdade dos vetores médios das populações multivariadas, e a significância das distâncias de Mahalanobis (dM) e de Procrustes (dP) após os testes de permutação.

Tamanho do centroide é caracterizado como a raiz quadrada do somatório dos quadrados das distâncias entre cada ponto de referência <sup>(78)</sup>. O centroide é o ponto no interior de uma forma geométrica que define o seu centro de gravidade ou centro de massa, onde as coordenadas são as médias das coordenadas de todas as coordenadas, ou seja, um “ponto médio”. Na carência de alometria, essa é a única medida de tamanho que não se relaciona com as variáveis de forma.

Na Análise de Variância Multivariada é usada a MANOVA. Tanto a MANOVA quanto a ANOVA são métodos utilizados para comparação de médias, mas ao contrário dessa última, a MANOVA é utilizada quando mais de uma variável dependente está envolvida no processo, ela é empregada para “analisar simultaneamente múltiplas medidas de cada indivíduo ou objeto sob investigação” <sup>(79)</sup>. O teste Lambda de Wilks ( $\lambda$  Lambda) foi realizado para avaliar diferenças multivariadas ao longo dos grupos. Esse teste verifica se os grupos são de algum modo diferentes, sem se preocupar com a possibilidade de diferirem em pelo menos uma combinação linear das variáveis dependentes <sup>(79)</sup>. Deste modo, quanto maior a dispersão entre grupos, menor o valor do Lambda de Wilks e assim, maior é a significância.

A ANOVA de Procrustes é um método que utiliza as coordenadas de Procrustes alinhadas como dados. Isso é possível porque o cálculo das coordenadas de Procrustes é baseada em desvios de forma a partir do consenso, o que em outras palavras refere-se à álgebra de somas de quadrados. Isso faz com que seja possível a utilização das coordenadas de Procrustes de forma análoga aos

desvios de uma média de uma ANOVA convencional <sup>(80)</sup>. A ANOVA de Procrustes foi utilizada para verificar possíveis diferenciações na forma e tamanho das asas entre os diversos táxons.

Todas estas análises foram feitas com o auxílio de programas da série TPS, da série IMP (*Integrated Morphometrics Package*) de David Sheets, o software MorphoJ de C. Klingenberg e linguagem de programação R (<http://www.r-project.org/>). Os dados referentes ao tamanho do centroide foram exportados do Tpsrelw32 e analisados utilizando análise de variância (ANOVA) com Teste de Tukey no programa Past4.06.

#### 4.5 Extração do DNA

As amostras dos espécimes de maruins, preservados em álcool etílico absoluto PA 99,5% a 4° C, foram submetidas à extração individual seguindo o protocolo do Kit de extração (DNeasy® Blood & Tissue da QIAGEN)”, com modificações:

1. Retirar o excesso de álcool e colocar por 10 min no termobloco para evaporação total do álcool;
2. Adicionar 1000 µL de água por 20min;
3. Retirar a água e adicionar novamente 1000 µL de água por 20 min;
4. Retirar a água e adicionar 180 µL de Buffer ATL e macerar com pistilo manualmente;
5. Adicionar 20 µL de proteinase K, levar ao vortex por 15 s e incubar a 56° C por 18 H;
6. Adicionar 200 µL de Buffer AL, levar ao vortex por 15 s e incubar a 70° C por 10 min;
7. Adicionar 200 µL de etanol absoluto (96-100%) e levar ao vortex por 10 s;
8. Transferir para microtubo com filtro e coluna, identificado:

9. Centrifugar a 2 min em 8000 rpm;
10. Trocar o tubo coletor;
11. Adicionar 500  $\mu$ L de Buffer AW2, esperar 5 min e centrifugar por 4 min a 14000 rpm;
12. Transferir a coluna para um novo microtubo de 1,5 mL, identificado;
13. Adicionar 100  $\mu$ L de água, esperar 10 min e centrifugar a 8000 rpm;
14. Adicionar novamente 100  $\mu$ L de água, esperar 10 min e centrifugar a 8000 rpm;
15. Armazenar em freezer -20° C.

#### **4.6 Quantificação do DNA extraído dos maruins**

O DNA extraído individualmente dos espécimes foi quantificado em espectrofotômetro Nanadrop®1000 (Thermo Fisher Scientific) a OD de 260 e 280 nm.

#### **4.7 Amplificação do alvo I (COI) do DNA mitocondrial**

O DNA extraído individualmente dos espécimes foram submetidas à amplificação em reação de cadeia de polimerase (PCR – Polymerase Chain Reaction) em um volume de 25  $\mu$ L, sendo 1  $\mu$ L de solução de DNA. A reação foi polimerizada com a enzima GoTaq® DNA Polymerase (Promega), reagentes e concentrações (Tabela 1). Para isso, foram utilizados um par de “primers” “Forward/ Reverse” (LepF ATT CAA CCA ATC ATA AAG ATA TTG G e LepR TAA ACT TCT GGA TGT CCA AAA AAT CA, direcionado ao alvo I (COI) do DNA mitocondrial <sup>(41,52,81-83)</sup>, nas seguintes condições:

- Utilizando os primers LepF/LepR para amplificação para o gene DNAm COI. Desnaturação inicial a 94° C p, 3 min; 5 ciclos de desnaturação a 94° C, 30 s. Anelamento a 45° C, 1 min e 30 s;

Extensão a 68° C, 1 min; seguidos por 35 ciclos de desnaturação a 94° C, 30 s. Anelamento a 51° C, 1 min e 30 s. Extensão a 68° C, 1 min; Extensão final a 68° C, 10 min; final 4° C ∞.

**Tabela 1.** Reagentes utilizados para a reação de amplificação do alvo I (COI) do DNA mitocondrial.

Reação	1X
GoTaqFlexi Buffer Green 5x	5 µL
MgCl <sub>2</sub> [25mM]	1,5 µL
dNTP [10mM]	0,5 µL
Primer Fw [10µm]	1 µL
Primer Rw [10µm]	1 µL
GoTaqDNA Pol [5U/µl]	0,125 µL
Água Milli-Q	14,875 µL
DNA	1 µL

#### 4.8 Eletroforese em gel de agarose

No intuito de avaliar o resultado da PCR para o alvo I (COI) do DNA mitocondrial, os produtos foram visualizados em gel de agarose 2,0 % contendo 1 µL de Gel Red.

#### 4.9 Purificação

Em seguida os amplicons foram purificados usando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System kit (Promega® Fitchburg, Wisconsin, USA) quantificados em NanoDrop® e posteriormente diluídos para 10ng/ul.

#### 4.10 Sequenciamento dos produtos da PCR

Após as reações de amplificação, o produto de PCR serviu de molde para as reações de sequenciamento, utilizando-se o kit BigDye™ Terminator Cycle Sequencing v. 3.1 – Applied Biosystems.

#### 4.11 Análises filogenéticas

As sequências nucleotídicas correspondentes ao fragmento DNA Barcode foram alinhadas e editadas usando o software MEGA v. 5.0<sup>(84)</sup>. Um alinhamento múltiplo foi realizado utilizando o programa Muscle<sup>(85)</sup>. As relações filogenéticas entre os haplótipos foram feitas através do método probabilístico de Máxima Verossimilhança utilizando o software PhyML<sup>(86)</sup>. O modelo evolutivo GTR + I + G foi o mais adequado ao conjunto de dados de acordo com o software jModelTest<sup>(87)</sup>. Também foi construída uma árvore filogenética através do método Neighbor-Joining<sup>(88)</sup>, usando a correção de Kimura 2 Parâmetros (K2P)<sup>(89)</sup>, incorporada ao software MEGA v.5.0<sup>(84)</sup>. As sequências de *Atrichopogon* sp. (HM431965.1) e *Forcipomyia* sp. (KX450776.1) foram selecionados como outgroup para os métodos de reconstrução filogenética. Nas duas abordagens filogenéticas foi utilizado o teste estatístico de suporte bootstrap com valor de 1.000 réplicas. Por fim, as sequências obtidas neste estudo foram submetidas a uma comparação por distância genética para cada uma das espécies. A dissimilaridade genética pode variar entre 0 e 1, sendo que quanto mais próximo de 1 mais distantes geneticamente são as espécies analisadas.

#### 4.12 Diversidade genética

A diversidade genética intrapopulacional foi avaliada em termos de diversidade de haplótipos ( $H_d$ ), diversidade de nucleotídeos ( $\pi$ ), número de sítios segregantes (NS) e número de haplótipos ( $h$ ), a diversidade foi mensurada usando Arlequin v. 3.5<sup>(90)</sup>. Análises quanto ao nível de diferenciação genética foram feitas com base no índice de fixação  $F_{ST}$  de forma pareada entre

as populações usando o software Arlequin v. 3.5<sup>(90)</sup>. O número médio de substituições por sítios entre as populações ( $D_{xy}$ ), o número total de substituições por sítios entre as populações ( $D_a$ ), número de polimorfismos compartilhados entre as populações pareadas ( $S_s$ ) e o número de diferenças fixadas entre as populações pareadas ( $S_f$ ) foram calculados no software DnaSP v. 4.0. Os valores do parâmetro diversidade haplotípica podem variar entre 0 e 1, sendo que quanto mais próximo de 1, maior a diversidade entre os haplótipos analisados.

#### 4. REFERÊNCIAS

- 1- Yeates DK, Wiegmann BM, Courtney GW, Meier R, et al. Phylogeny and systematics of Diptera: Two decades of progress and prospects. *Zootaxa* [Internet]. 2007 [citado em 01 de julho de 2021]; 1668(1): 565-590. Disponível em: <https://doi.org/10.11646/zootaxa.1668.1.27>
- 2- Yeates 2007 Borkent A, Coram RA, Jarzembowski EA. The oldest fossil biting midge (Diptera: Ceratopogonidae) from the Purbeck Limestone Group (Lower Cretaceous) of southern Great Britain. *Pol J Entomol* [Internet]. 2013 [citado em 01 de julho de 2021]; 82(4): 273–279. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2478/v10200-012-0041-8>
- 3- Borkent A, Dominiak P. Catalog of the Biting Midges of the World (Diptera: Ceratopogonidae). *Zootaxa* [Internet]. 2020 [citado em 01 de julho de 2021]; 4787: 1–377. Disponível em: <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4787.1.1>
- 4- Santarém MC, Felipe-Bauer ML. Brazilian species of biting midges - espécies de maruins do Brasil (Diptera: Ceratopogonidae). 2021. [citado em 01 de julho de 2021]. Disponível em: [https://portal.fiocruz.br/sites/portal.fiocruz.br/files/documentos/brazilian\\_species\\_of\\_biting\\_midges\\_2021\\_0.pdf](https://portal.fiocruz.br/sites/portal.fiocruz.br/files/documentos/brazilian_species_of_biting_midges_2021_0.pdf)
- 5- Spinelli GR, Rondero MM. Ceratopogonidae (Formas hematófagas) Artrópodos. In: Salomón OD, editor. *Artrópodos de interés médico en Argentina*. Buenos Aires: Fundación Mundo Sano, 2005. p. 61 – 66.
- 6- Borkent A, Spinelli GR. Neotropical Ceratopogonidae (Diptera: Insecta). In: Adis J, Arias JR, Rueda-Delgado G, Wantzen KM, editores. *Aquatic biodiversity in Latin America*. Moscow: Pensoft Publishers 2007; 198 p.
- 7- Wirth WW, Blanton FS. A review of maruins or biting midges of the genus *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae) in the Amazon Basin. *Amazoniana*. 1973; 4: 405-470.

- 8- Mellor PS, Boorman J, Baylis M. *Culicoides* Biting midges: Their Role as Arbovirus Vectors. *Annu Rev Entomol* [Internet]. 2000 [citado em 01 de julho de 2021]; 45:307-340. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.45.1.307>
- 9- Borkent A, Spinelli GR, Grogan WL. Ceratopogonidae. In: Brown BV, Borkent A, Cumming JM, Wood DM, Woodley NE, Zumbado MA, editores. *Manual of Central American Diptera: Volume 1*. Ottawa: NRC Research Press, 2009. p. 407-435.
- 10- Marino PI, Cazorla CG, Ronderos MM. Study of the immature stages of two species of the biting midges *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). *Acta Entomol Mus Natl Pragae*. 2013; 53(2):777-792.
- 11- Carvalho LPC, Silva FS. Seasonal abundance of livestock-associated *Culicoides* species in northeastern Brazil. *Med Vet Entomol* [Internet]. 2014 [citado em 01 de julho de 2021]; 28(2): 228-231. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/mve.12043>
- 12- Downes JA. Feeding and mating in the insectivorous Ceratopogoninae (Diptera). *Memof Entomol Soc Can* [Internet]. 1978 [citado em 01 de julho de 2021]; 104: 62 pp. Disponível em: <https://doi.org/10.4039/entm110104fv>
- 13- Wirth WW, Hubert AA. The *Culicoides* of Southeast Asia (Diptera: Ceratopogonidae). *Mem Am Entomol Inst*. 1989; 44: 1–508.
- 14- Borkent A. Ceratopogonidae (biting midges). In: Kirk-Spriggs AH, Sinclair BJ, editores. *Manual of Afrotropical Diptera, Vol. 2: Nematoceros Diptera and lower Brachycera*. SANBI Publishing. 2017. p. 733–812.
- 15- Mullen GR, Hribar LJ. Biology and feeding behavior of Ceratopogonid larvae (Diptera: Ceratopogonidae) in North America. *Bull Soc Vector Ecol*. 1988; 13: 60-81.
- 16- Borkent A, Picado A. Distinctive new species of *Atrichopogon* Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae) from Costa Rica. *Zootaxa* [Internet]. 2004 [citado em 03 de julho de 2021]; 637:1–68. Disponível em: <https://doi.org/10.11646/zootaxa.637.1.1>



- 17- ICZN. International Code of Zoological Nomenclature 4th Edition including amendments. 2012 [citado em 03 de julho de 2021]. Disponível em: <<http://iczn.org/iczn/index.jsp>>. 2012
- 18- Harrup LE, Bellis GA, Balenghien T, Garros C. *Culicoides* Latreille Diptera: (Ceratopogonidae) taxonomy: Current challenges and future directions. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2015 [citado em 03 de julho de 2021]; 30:249–66. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.12.018>
- 19- Szadziewski R, Gilka W, Anthon H. Immature stages of two European species of the subgenus *Meloehalea* (Diptera: Ceratopogonidae), with keys to the European subgenera of *Atrichopogon*. *Entomol Scand Suppl.* 1995; 26: 181–190.
- 20- Marino PI, Spinelli GR, Ferreira-Keppler R, Ronderos MM. Description of fourth instar larva and pupa of *Atrichopogon delpontei* Cavalieri & Chiossone (Diptera: Ceratopogonidae) from Brazilian Amazonia. *An Acad Bras Ciênc* [Internet]. 2017; 89(3): 2081–2094. [citado em 03 de julho de 2021]. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720150223>
- 21- De Meillon B, Wirth WW. A new pollen feeding *Atrichopogon* midge from Madagascar, with notes on closely related subsaharan species (Diptera: Ceratopogonidae). *Revue Française d'Entomologie.* 1989; 11(2): 85–89.
- 22- Borkent A, Filho LCR. First record of female adult *Atrichopogon* Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae) biting in the Neotropical region. *Proc Entomol Soc Wash.* 2006; 108(998):1001.
- 23- Szadziewski R, Gwizdalska-Kentzer M, Wojciech G. Order Diptera, family Ceratopogonidae. *Arthropod fauna of the UAE.* 2011; 4: 636–653
- 24- Szadziewski R, Gilka W, Anthon H. Immature stages of two European species of the subgenus *Meloehalea* (Diptera: Ceratopogonidae), with keys to the European subgenera of *Atrichopogon*. *Entomol Scand Suppl.* 1995: 26, 181–190.

- 25- Edwards FW. On the British biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). [E-book na Internet]. Ecol Entomol. 1926 [citado em 03 de julho de 2021]; 74: 389–426. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.1926.tb02249.x>
- 26- Wirth WW. The Heleidae of California. Univ Calif Publ Entomol. 1952; 9: 95-266.
- 27- Ewen AB, Saunders LG. Contributions towards a revision of the genus *Atrichopogon* based on characters of all stages (Diptera: Heleidae). Can J Zool [Internet]. 1958 [citado em 03 de julho de 2021]; 36(5): 671–724. Disponível em: <https://doi.org/10.1139/z58-061>
- 28- Boesel MW. The genus *Atrichopogon* (Diptera: Ceratopogonidae) in Ohio and Neighboring States. Ohio J Sci. 1973(4); 73: 202-205.
- 29- Debenham ML. Four New Guinea and northern Queensland species of *Atrichopogon* Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae) with atypical development of the thoracic setae. J Aust Entomol Soc. 1973; 12: 68–77.
- 30- Borkent A. Numbers of Extant and Fossil Species of Ceratopogonidae. 2016 [citado em 03 de julho de 2021]. Disponível em: <https://www.inhs.illinois.edu/files/4014/6785/5847/WorldCatalogtaxa.pdf>.
- 31- Felipe-Bauer ML. A importância do padrão das manchas das asas em *Culicoides* (Latreille, 1809) (Diptera: Ceratopogonidae): Sua limitação. Entomol Vect. 2003; 10(4): 595-600.
- 32- Borkent, A. The Biting Midges, the Ceratopogonidae. In: Marquardt WC, editor. Biology of Disease Vectors: Second Edition. Elsevier Academic Press. Burlington, San Diego, London; 2005. p. 113-126.
- 33- Ronderos MM, Diaz F. *Culicoides* Latreille - morfologia do adulto. In: Castellón, EG, Veras RS, editores. Maruins (*Culicoides*: Ceratopogonidae) na Amazônia brasileira. Manaus: Editora INPA. 2015. p. 75-84.
- 34- Borkent A. The Subgeneric Classification of Species of *Culicoides*- thoughts and a warning. 2015 [citado em 05 de julho de 2021]. Disponível em: <http://www.inhs.illinois.edu/files/8514/2385/5053/CulicoidesSubgenera.pdf>

- 35- Szadziowski R, Arillo A. The oldest fossil record of the extant subgenus *Leptoconops* (*Leptoconops*) (Diptera: Ceratopogonidae). *Acta Zool Cracov.* 2003; 46: 271–275.
- 36- Lowrie Jr RC, Raccurt CP, Eberhard ML, Katz SP. Assessment of *Leptoconops bequaerti* as a potential vector of *Mansonella ozzardi* in Haiti. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 1983 [citado em 05 de julho de 2021]; 32 (5): 1013-1015. Disponível em: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1983.32.1013>
- 37- Downes JA, Wirth WW. Ceratopogonidae. In: Mcalpine JF, Peterson BV, Shewell GE, Teskey HJ, Vockeroth, JR, Wood DM, organizadores. *Manual of Nearctic Diptera*. Canada: Agriculture Canada. 1981; 1: 674 p.
- 38- Clastrier J, Wirth WW. The *Leptoconops kerteszi* complex in North America (Diptera: Ceratopogonidae). *U.S. Dept Agric Tech Bull.* 1978; 1573: 1-58.
- 39- Hernández-Triana LM, Crainey JL, Hall AC, Fatih FA, Mackenzie-Dodds J, et al. DNA barcodes reveal cryptic genetic diversity within the blackfly subgenus *Trichodagmia* Enderlein (Diptera: Simuliidae: *Simulium*) and related taxa in the New World. *Zootaxa* [Internet]. 2012 [citado em 05 de julho de 2021]; 3514: 43–69. Disponível em: <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3514.1.3>
- 40- Gómez G, Jaramillo L, Correa MM. Wing Geometric morphometry and molecular assessment of members in the *Albitarsis* Complex from Colombia. *Mol Ecol Resour* [Internet]. 2013 [citado em 05 de julho de 2021]; 1082–1092. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12126>
- 41- Henni HL, Sauvage F, Ninio C, Depaquit J, Augot D. Wing geometry as a tool for discrimination of *Obsoletus* group (Diptera: Ceratopogonidae: Culicoides) in France. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2014 [citado em 05 de julho de 2021]; 21: 110-117. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.10.008>
- 42- Freitas MT, Ríos-Velasquez CM, Costa CRL, Figueirêdo CAS, Aragão NC, et al. Phenotypic and genotypic variations among three allopatric populations of *Lutzomyia umbratilis*, main vector of *Leishmania guyanensis*. *Parasites and Vectors* [Internet].

- 2015[citado em 05 de julho de 2021]; 8(1):448. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1051-7>
- 43- Pinto IS, Chaga BD, Rodrigues AAF, Ferreira AL, Rezende HR, et al. DNA Barcoding of Neotropical Sand Flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): Species Identification and Discovery within Brazil. PLoS One [Internet]. 2015 [citado em 05 de julho de 2021]; 10(10): e0140636. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140636>
- 44- Sumruayphol S, Apiwathnasorn C, Ruangsittichai J, Sriwichai P, et al. DNA barcoding and wing morphometrics to distinguish three Aedes vectors in Thailand. Acta Trop [Internet]. 2016 [citado em 07 de julho de 2021]; 159:1-10. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.03.010>
- 45- Rohlf FJ, Marcus LF. A revolution in morphometrics. Trends Ecol Evol [Internet]. 1993 [citado em 07 de julho de 2021]; 8(4): 129-132. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(93\)90024-J](https://doi.org/10.1016/0169-5347(93)90024-J)
- 46- Dujardin JP. Morphometrics applied to medical entomology. Infect Genet Evol [Internet]. 2008 [citado em 07 de julho de 2021]; 8 (6): 875-890. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2008.07.011>
- 47- Adams DC, Rohlf FJ, Slice DE. Geometric morphometrics: Ten years of progress following the “revolution”. Ital J Zool [Internet]. 2004 [citado em 07 de julho de 2021]; 71(1):5-16. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/11250000409356545>
- 48- Gomulski LM, Meiswinkel R, Delécolle JC, Goffredo M, Gasperi G. Phylogeny of the subgenus *Culicoides* and related species in Italy, inferred from internal transcribed spacer 2 ribosomal DNA sequences. Med Vet Entomol [Internet]. 2006 [citado em 07 de julho de 2021]; 20(2): 229–238. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2006.00620.x>
- 49- Perrin A, Cêtre-Sossah C, Mathieu B, Baldet T, Delécolle JC, Albina E. Phylogenetic analysis of *Culicoides* species from France based on nuclear ITS1-rDNA sequences. Med Vet Entomol [Internet]. 2006 [citado em 07 de julho de 2021]; 20(2):219-228. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2006.00616.x>

- 50- Schwenkenbecher JM, Mordue AJ, Piertney SB. Phylogenetic analysis indicates that *Culicoides dewulfi* should not be considered part of the *Culicoides obsoletus* complex. Bull Entomol Res [Internet]. 2009 [citado em 07 de julho de 2021]; 99(4): 371-375. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0007485308006391>
- 51- Matsumoto Y, Yanase T, Tsuda T, Noda H. Characterization of Internal Transcribed Spacer ITS1 - ITS2 Region of Ribosomal RNA Gene From 25 Species of *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) in Japan. J Med Entomol [Internet]. 2009 [citado em 07 de julho de 2021]; 46(5): 1099-1108. Disponível em: <https://doi.org/10.1603/033.046.0517>
- 52- Henni 2014 Bellis GA, Dyce AL, Gopurenko D, Mitchell A. Revision of the Immaculatus Group of *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) from the Australasian Region with description of two new species. Zootaxa [Internet]. 2013 [citado em 09 de julho de 2021]; 3680:015–037. Disponível em: <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3680.1.4>
- 53- Rubinoff D. Utility of mitochondrial DNA barcodes in species conservation. Conserv Biol [Internet]. 2006 [citado em 09 de julho de 2021]; 20(4) 1026-1033. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2006.00372.x>
- 54- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, Dewaard JR. Biological identifications through DNA Barcodes. Proc Biol Sci [Internet]. 2003 [citado em 09 de julho de 2021]; 270 (1512): 313-321. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- 55- Clary DO, Wolstenholme DR. The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: Nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. J Mol Evol [Internet]. 1985 [citado em 09 de julho de 2021]; 22(3): 252-271. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF02099755>
- 56- Wells JD, Williams DW. Validation of a DNA-based method for identifying Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae) used in a death investigation. Int J Legal Med [Internet]. 2007 [citado em 09 de julho de 2021]; 121(1):1-8. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00414-005-0056-8>
- 57- Hajibabaei M, Gregory A.C. Singer, Paul D.N. Hebert, Donal A. Hickey. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. Trends in

- Genetics [Internet]. 2007[citado em 10 de julho de 2021]; 23(4):167-172. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.02.001>
- 58- Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemplak TS, Francis CM. Identification of Birds through DNA Barcodes. PLoS Biol [Internet]. 2004 [citado em 10 de julho de 2021]; 2(10):e312. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020312>
- 59- Amendt J, Krettek R, Zehner R. Forensic entomology. Naturwissenschaften [Internet]. 2004 [citado em 10 de julho de 2021];91(2):51-65. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00114-003-0493-5>
- 60- Lima NRW, Sodr e GA, Lima HRR, Paiva SR, et al. Plasticidade fenotípica. Rev Ciência Elem [Internet]. 2017 [citado em 10 de julho de 2021];5(2):1-7. Disponível em: <http://doi.org/10.24927/rce2017.017>
- 61- Haffer J. Hypotheses to explain the origin of species in Amazonia. Braz J Biol [Internet]. 2008 [citado em 10 de julho de 2021];68(4):917–947. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1519-69842008000500003>
- 62- Busby RC, Faynel C, Moser A, Robbins RK. Sympatric Diversification in the Upper Amazon. A Revision of the Eumaeine Genus *Paraspiculatus* (Lepidoptera: Lycaenidae). Smithson Contr Zool [Internet]. 2017 [citado em 10 de julho de 2021]; 649: 1–65. Disponível em: <http://doi.org/10.5479/si.1943-6696.649>
- 63- Farias ES. Efeito antrópico na diversidade de maruins (Diptera: Ceratopogonidae) em uma área de assentamento rural na Amazônia [Disserta o de Mestrado]. Manaus: Instituto Leônidas e Maria Deane, Funda o Oswaldo Cruz; Universidade Federal do Amazonas; 2014. 71 p.
- 64- Santarém MCA, Trindade RL, Silva TN, Castellón EG, Patiu CAM, Felipe-Bauer ML. New Neotropical *Culicoides* and redescription of *Culicoides reticulatus* Lutz (Diptera: Ceratopogonidae). Zootaxa [Internet]. 2014 [citado em 10 de julho de 2021]; 3795(3): 255-274. Disponível em: <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3795.3.2>
- 65- Santarém MCA, Farias ES, Felipe-Bauer ML. *Culicoides castelloni* sp. nov. from the Brazilian Amazon Region with a revision of the *reticulatus* species group (Diptera,

- Ceratopogonidae). An Bras Ciênc [Internet]. 2015 [citado em 10 de julho de 2021]; 87: 955-72. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0001-3765201520140517>
- 66- Farias ES, Pereira Júnior AM, Felipe-Bauer ML, Pessoa FAC, Medeiros JF; Santarém MCA. *Culicoides hildebrandoi*, a new species of the *reticulatus* species group from the Brazilian Amazon Region (Diptera, Ceratopogonidae). ZooKeys [Internet]. 2016 [citado em 10 de julho de 2021]; 571: 105–111. Disponível em: <https://doi.org/10.3897/zookeys.571.7341>
- 67- Farias ES, Almeida JF, Pessoa FAC. List of *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) from the state of Amazonas, Brazil, including new records. Check List [Internet]. 2016 [citado em 10 de julho de 2021]; 12(6):1-27. Disponível em: <https://doi.org/10.15560/12.6.2002>
- 68- Trindade RL, Gorayeb IS. Maruins (Ceratopogonidae: Diptera) do estuário do rio Pará e do litoral do Estado do Pará, Brasil. Entomol Vectores [Internet]. 2005 [citado em 10 de julho de 2021]; 12(1): 61-74. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0328-03812005000100005>
- 69- Pessoa FAC, Castellón EG, Medeiros JF, Camargo LMA. First occurrence of the human biting midge *Leptoconops brasiliensis* (Lutz) (Diptera: Ceratopogonidae) in the triple border of Brazil, Peru, and Bolivia. Rev Soc Bras Med Trop [Internet]. 2012 [citado em 10 de julho de 2021]; 45(1): 138–139. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0037-86822012000100030>
- 70- Farias ES, Pereira-Júnior AM, Almeida JF, Pessoa FAC, Medeiros JF. Hematophagous biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) from Tefé municipality, Amazonas state, Brazil. Check List [Internet]. 2015 [citado em 10 de julho de 2021];11(4):1676. Disponível em: <https://doi.org/10.15560/11.4.1676>
- 71- Mazzoni CJ, Araki AS, Ferreira GE, Azevedo RV, et al. Multilocus analysis of introgression between two sand fly vectors of leishmaniasis. BMC Evol Biol [Internet]. 2008 [citado em 10 de julho de 2021]; 8: 141. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-141>
- 72- Anderson TJC, Haubold B, Williams JT, Estrada-Franco JG, Richardson L, et al. Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite

- Plasmodium falciparum*. Mol Biol Evol [Internet]. 2000 [citado em 10 de julho de 2021]; 17(10): 1467-1482. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026247>
- 73- Monteiro FA, Peretolchina T, Lazoski C, Harris K, Dotson EM, et al. Phylogeographic pattern and extensive mitochondrial DNA divergence disclose a species complex within the Chagas disease vector *Triatoma dimidiata*. PLoS One [Internet]. 2013 [citado em 10 de julho de 2021]; e70974. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070974>
- 74- Costa-Junior CRL, Freitas MTS, Figueiredo-Junior CAS, Aragao NC, et al. Genetic structuring and fixed polymorphisms in the gene period among natural populations of *Lutzomyia longipalpis* in Brazil. Parasit Vectors [Internet]. 2015 [citado em 10 de julho de 2021]; 8:193. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0785-6>
- 75- Soto Si, Lehmann T, Rowton ED, Vélez BID, Porter CH. Speciation and population structure in the morphospecies *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) as derived from the mitochondrial ND4 gene. Mol Phylogenet Evol [Internet]. 2001 [citado em 11 de julho de 2021];18(1): 84–93. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/mpev.2000.0863>
- 76- Pagès N, Muñoz-Muñoz F, Talavera S, Sarton V, Lorca C, Núñez JI. Identification of cryptic species of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in the subgenus *Culicoides* and development of species-specific PCR assays based on barcode regions. Vet Parasitol [Internet]. 2009 [citado em 11 de julho de 2021];165: 298-310. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.07.020>
- 77- Wirth WW, Marston N. Method for mounting small insects on microscope slides in Canada balsam. Ann Entomol Soc Am. 1968; 61(3): 783–784.
- 78- Bookstein FL. Morphometric Tools for Landmark Data Geometric and Biology. Cambridge University, Cambridge; 1991.
- 79- Hair JF, Anderson RE, Tatham RL, Black WC. Multivariate Data Analysis. Prentice-Hall Inc; 1998.p. 730
- 80- Klingenberg CP, McIntyre GS. Geometric morphometrics of developmental instability: Analyzing patterns of fluctuating asymmetry with Procrustes methods. Evolution [Internet].



- 1998 [citado em 11 de julho de 2021];52(5): 1363–1375. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1998.tb02018.x>
- 81- Cêtre-Sossah C, Baldet T, Delécolle JC, Mathieu B, Perrin A, Grillet C, Albina E. Molecular detection of *Culicoides* spp. and *Culicoides imicola*, the principal vector of African horse sickness (AHS) in Africa and Europe. *Vet Res* [Internet]. 2004 [citado em 11 de julho de 2021]; 35(3): 325-37. Disponível em: <https://doi.org/10.1051/vetres:2004015>
- 82- Slama D, Haouas N, Remadi L, Mezhoud H, Babba H, Chaker E. First detection of *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae). *Parasit Vectors* [Internet]. 2014 [citado em 11 de julho de 2021]; 7:51. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-51>
- 83- Henni 2014 Bellis 2013 Cêtre-Sossah 2004 Slama 2014 Augot D, Mathieu B, Hadj-Henni L, Barriel V, Zapata Mena S, Smolis S, et al. Molecular phylogeny of 42 species of *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae) from three continents. *Parasite*. [Internet]. 2017 [citado em 11 de julho de 2021]; 24:23. Disponível em: <https://doi.org/10.1051/parasite/2017020>
- 84- Tamura K, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* [Internet]. 2011 [citado em 11 de julho de 2021]; 28: 2731-2739. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>
- 85- Edgar RC. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* [Internet]. 2004 [citado em 11 de julho de 2021]; 5 (1): 113. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-5-113>
- 86- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* [Internet]. 2010 [citado em 11 de julho de 2021] ;59 (3):307–321. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>
- 87- Posada D. jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol* [Internet]. 2008 [citado em 11 de julho de 2021]; 25 (7): 1253-1256. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/molbev/msn083>.

- 88- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Bio Evol* [Internet]. 1987 [citado em 11 de julho de 2021]; 4(4):406–425. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- 89- Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* [Internet]. 1980 [citado em 11 de julho de 2021]; 16(2): 111–120. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/bf01731581>
- 90- Excoffier L, Lischer HE L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour* [Internet]. 2010 [citado em 11 de julho de 2021]; 10 (3): 564-567. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>

## CAPÍTULO I

### **ESTUDO FAUNÍSTICO DE TRÊS GÊNEROS DE CERATOPOGONIDAE NA AMAZÔNIA BRASILEIRA: *Atrichopogon*, *Culicoides* e *Leptoconops***

Emanuelle de Sousa Farias<sup>1,2</sup>, Sanmya Silva dos Santos<sup>1,3</sup>, Jokebede Melynda dos Santos Paulino-Rosa<sup>1,4</sup>, Luiz de Souza Coelho<sup>5</sup>, Jordam William Pereira-Silva<sup>1,6,7</sup>, Eric Fabricio Marialva<sup>1,4</sup>, Jhonata Andrade Santiago<sup>1,8</sup>, Felipe Arley Costa Pessoa<sup>1</sup>

1. Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ. Laboratório de Ecologia e Doenças Transmissíveis na Amazônia, Manaus, Amazonas, Brasil.
2. Instituto Oswaldo Cruz-IOC/FIOCRUZ. Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.
3. Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ. Programa de Bolsa de Iniciação Científica – PIBIC/CNPq
4. Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Interação Patógeno Hospedeiro, Manaus, Amazonas, Brasil.
5. Instituto Nacional de Pesquisas na Amazônia- INPA, Laboratório de Inventário Florístico e Botânica Econômica.
6. Universidade do Estado do Amazonas, Escola Superior de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Manaus, AM, Brasil.
7. Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Departamento de Ensino e Pesquisa, Manaus, AM, Brasil.
8. Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ. Programa de Apoio à Iniciativa Científica do Amazonas-PAIC/PAPEAM

#### **Autor correspondente**

Correspondente para Emanuelle de Sousa Farias, Instituto Leônidas e Maria Deane - FIOCRUZ Amazônia, Laboratório de Ecologia e Doenças Transmissíveis na Amazônia, Rua Terezina, 476, Adrianópolis, Manaus, Amazonas, CEP 69.057-070, Brasil. Telefone (92) 984125634. E-mail: emanuellefarias82@gmail.com

## RESUMO

Espécies da família Ceratopogonidae ocorrem em praticamente todas as áreas terrestres do planeta. A maioria dos ceratopogonídeos são importantes para o funcionamento de diversos ecossistemas. Numerosas espécies são pragas de humanos e animais, tendo picadas irritantes e transmitindo uma grande variedade de agentes etiológicos como vírus, protozoários e nematoides, causadores de doenças. Algumas espécies neotropicais alimentam-se da hemolinfa de outros insetos. Adultos de ambos os sexos, alimentam-se de néctar e alguns são importantes polinizadores. A identificação morfológica dos adultos de ceratopogonídeos é difícil devido tamanho diminuto desses dípteros, deficiência de chaves de identificação e o árduo trabalho de triagem, morfotipagem e montagem, onde o método atual de microscopia para identificar as espécies de maruins é intensiva em termos de tempo e trabalho. Este trabalho visou identificar a fauna de ceratopogonídeos coletada em diferentes municípios/estado da Amazônia brasileira. Para isso, os espécimes foram montados entre lâmina/lamínula em método fenol-bálsamo. Identificados a nível de espécie, através de observações por microscopia óptica, seguindo as chaves de identificação, artigos com descrição de espécies e comparação com espécies depositadas na coleção de Ceratopogonidae do Instituto Oswaldo Cruz. O estudo faunístico realizado em 12 municípios em cinco estados da Amazônia brasileira registrou espécies anteriormente desconhecidas no estado do Amazonas (*C. amazonicus*, *C. forattinii*, *C. jurutiensis*, *C. lyrinotatus*), no estado do Pará (*C. rhombus* e *C. kuripako*) e Maranhão (*Leptoconops brasiliensis*). A diversidade do grupo de espécies com asas manchadas do gênero *Atrichopogon*, aumentou para 15 espécies, com o achado de três novas espécies: *A. janseni* sp nov.; *A. riopardensis* sp nov.; e *A. sergioluzi* sp nov. Foi achado um novo registro de espécie do gênero *Culicoides* para o Brasil (*C. macorostigma*) e foram descritos os machos das espécies *C. jurutiensis* e *C. plaumanni*. As espécies *C. paraensis*, vetora do vírus do

Oropouche, foi encontrada principalmente em peridomicílios, área urbana e rural e *C. insignis*, vetora do vírus da Língua Azul, foi coletada em peridomicílios próximos a currais, área rural. Aqui, revisamos a distribuição das 40 espécies de ceratopogonídeos para a Amazônia brasileira.

**Palavra-chave:** Diversidade; ceratopogonídeos; espécies novas; distribuição geográfica.

## 1. INTRODUÇÃO

A família Ceratopogonidae possui 6.206 espécies existentes em todo o mundo, organizadas em três subfamílias e 112 gêneros; 296 fósseis válidos de Ceratopogonidae descritas de duas subfamílias extintas e três subfamílias existentes <sup>(1)</sup>. Recentemente, Santarém e Felipe-Bauer <sup>(2)</sup> reconheceram 1.309 espécies de Ceratopogonidae existentes e válidas para a Região Neotropical, sendo 520 para o Brasil e 293 para a Região Amazônica brasileira. A subfamília Ceratopogoninae Newman é a melhor representada devido aos estudos do gênero *Culicoides* Latreille, com importância sanitária; Forcipomyiinae Lenz é a segunda subfamília com maior número de espécies, sendo *Atrichopogon* um gênero bastante abundante; e Leptoconopinae Noé com menor número de espécies.

Espécies da família Ceratopogonidae ocorrem em praticamente todas as áreas terrestres do planeta, não há registro na Antártica e Nova Zelândia, ocorrendo desde áreas de marés até os picos das montanhas mais altas, com o registro superior de 3.700 até 4.000 metros de altitude no Nordeste da Argentina, até 3.819 metros de altitude na Costa Rica, 4.651 metros do lago Huacracocha no Peru, 4.400 metros registrados logo ao norte do Monte Everest e entre 4.000 e 4.400 metros nos Andes do Equador <sup>(3-6)</sup>.

A maioria dos ceratopogonídeos são importantes para o funcionamento de diversos ecossistemas. Adultos de ambos os sexos, alimentam-se de néctar e alguns são importantes polinizadores de plantas como o *Theobroma cacao* Linnaeus (cacaueiro), *Hevea brasiliensis* (Willd. Ex ADR de Juss.) Muell. Arg. (seringueira) e *Persea americana* Mill. (abacateiro), sendo importantes na agricultura <sup>(4,7)</sup>. Algumas espécies de *Atrichopogon* e *Forcipomyia* são ectoparasitas em insetos maiores <sup>(4)</sup>, *Atrichopogon* <sup>(8,9)</sup>. Borkent e Rocha-Filho <sup>(9)</sup> registraram fêmeas de *Atrichopogon* sugando sangue das asas de um besouro no Brasil.

Numerosas espécies de *Leptoconops* Skuse, *Forcipomyia* Meigen e *Culicoides* são pragas de humanos e animais, tendo picadas irritantes e transmitindo uma grande variedade de vírus, protozoários e nematoides, incluindo algumas doenças importantes <sup>(10)</sup>. Fêmeas adultas de muitas espécies, nas linhagens iniciais da família, sugam sangue de vertebrados ou são ectoparasitas em insetos maiores (por exemplo, asas de Odonata e Lepidópteros, lagartas, fasmídeos) <sup>(11)</sup>. Algumas espécies neotropicais alimentam-se da hemolinfa de outros insetos <sup>(12)</sup>, podem até mesmo ser importantes vetores de vírus que ajudam a controlar lagartas <sup>(4)</sup>. Larvas de maruins predadoras podem regular as populações de larvas de mosquitos, ex. *C. guttipennis* Boheman, *Forcipomyia* spp. e *Bezzia* sp. que predam larvas de *Aedes aegypti* Linnaeus, vetor da febre amarela e dengue <sup>(13)</sup>. Os imaturos são encontrados em uma ampla variedade de habitats terrestres aquáticos, semiaquáticos e úmidos.

As espécies do gênero *Atrichopogon* Kieffer, subfamília Forcipomyiinae, um dos gêneros mais abundantes da família, contém 513 espécies e três espécies fósseis extintas do gênero *Atrichopogon* (subfamília Forcipomyiinae), 116 espécies na região Neotropical, 31 para o Brasil e sete para região Amazônica <sup>(1,2)</sup>. Eles são comuns em todos os habitats terrestres úmidos (higropétricos) ou higrométricos-higropétricos <sup>(14,15)</sup>.

Os *Culicoides*, subfamília Ceratopogoninae, é o gênero mais estudado pois a maioria das espécies que são vetores, pertencem a esse gênero. A fauna mundial é composta por 1.999 espécies (52 extintas) <sup>(1)</sup>, sendo 299 para a Região Neotropical, 151 para o Brasil e 123 para a Região Amazônica brasileira <sup>(2)</sup>. *Culicoides* adultos são notáveis por seu padrão característico de pigmentação das asas e distribuição de macrotríquias das asas, que em certas espécies podem ser usados como a principal característica diagnóstica <sup>(16)</sup>. Variantes atípicas em padrões de asas são comumente observadas em várias espécies de *Culicoides* <sup>(17-19)</sup>, mas são necessários mais estudos para verificar se estas variações representam espécies distintas.

O gênero *Leptoconops* pertence a subfamília Leptoconopinae Skuse, são conhecidas 154 espécies, sete subgêneros, sendo 12 espécies na região neotropical pertencentes a quatro subgêneros <sup>(1,2)</sup>. No Brasil há registro de duas espécies, *L. (Holoconops) knowtoni* Clastrier & Wirth registrada no Estado de Santa Catarina e *L. (Leptoconops) brasiliensis* Lutz, com localização do tipo (Rio Tocantins Inferior) no Pará, e registros no Pará, Acre e Amazonas <sup>(20-22)</sup>.

Esse capítulo visou fazer o levantamento da fauna de ceratopogonídeos coletada em diferentes municípios/estado, e atualizar sua distribuição na Amazônia brasileira.

## **2. METODOLOGIA**

### **2.1 Dados de coleta**

As coletas foram realizadas em diferentes áreas na Amazônia: municípios de Itaituba, Marapanim, Óbidos e Oriximiná no estado do Pará; municípios de Boca do Acre, Manaus, Pauini, Presidente Figueiredo e Tefé no estado do Amazonas; municípios Porto Velho no estado de

Rondônia; município de Assis Brasil no estado do Acre; município da Raposa Maranhão (Figura 1).

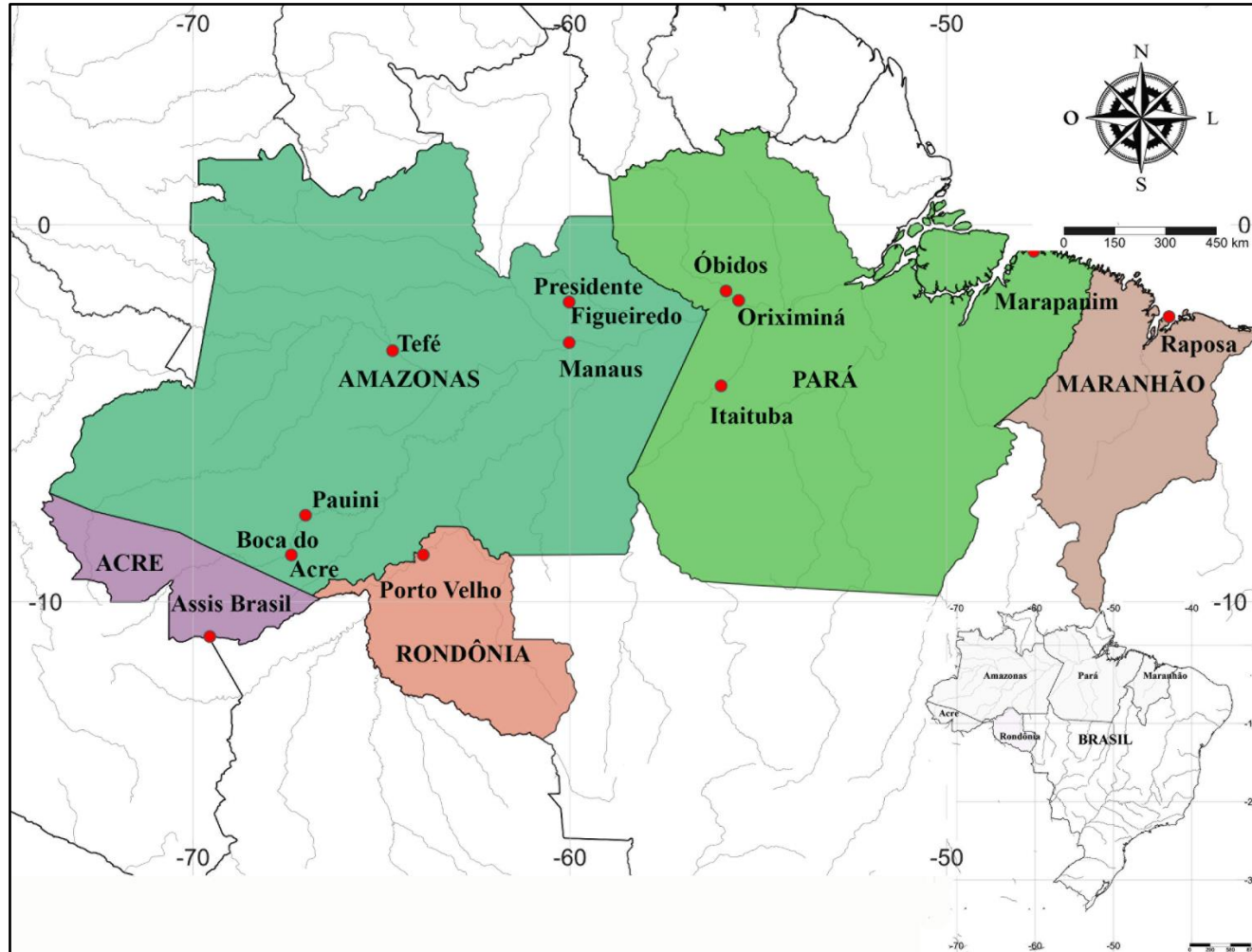
A maioria dos ceratopogonídeos foram amostrados com redes de varredura, malaise e armadilha de luz CDC. Os maruins foram triados, separados por morfótipos e armazenados em tubos com álcool absoluto. Apenas alguns exemplares de cada morfótipo foram montados, aproximadamente 1.400 espécimes.

## **2.2 Preparação de lâminas para microscopia**

Alguns exemplares de cada morfótipo foram processados individualmente no procedimento de dissecação e montagem em lâmina para análise microscópica e identificação morfológica. A asa foi montada entre lâmina e lamínula sem tratamento com KOH, as demais estruturas tratadas com KOH, foram montadas entre lâmina e lamínula em método fenol-bálsamo, conforme metodologia descrita por Wirth e Marston <sup>(23)</sup>.

As imagens foram feitas por meio de software Auto Montage 4.0 (Syncroscopy), adaptado ao microscópio óptico LEICA DMLB e uma câmera digital JVC, modelo KY-F55BE, para prancha de asas, redescrição de espécies e descrição de novos táxons.





**Figura 1 (17)** . Mapa mostra os municípios onde foram feitas as coletas de *Atrichopogon*, *Culicoides* e *Leptoconops*, nos estados do Acre, Amazonas, Maranhão, Pará e Rondônia, no Brasil (modificado após SimpleMappr, <http://www.simplemappr.net>).

### 2.3 Identificação morfoanatômica dos maruins

Os espécimes montados foram identificados a nível de espécie, através de observações por microscopia óptica, seguindo as chaves de identificação, artigos com descrição de espécies e comparação com espécies depositadas na coleção de Ceratopogonidae do Instituto Oswaldo Cruz.

## 3. RESULTADO E DISCUSSÃO

Foram examinados 8.902 espécimes de maruins, sendo 247 machos (2,7%) e 8.655 fêmeas (97,3%) de 40 espécies. Destes, 15 (0,17%) espécimes eram do gênero *Atrichopogon*, subgênero *Atrichopogon*; 6.914 (77,70%) espécimes do gênero *Culicoides* de quatro subgêneros e de cinco grupo de espécies não colocados em subgêneros: Subgênero – *Haematomyidium*, *Hoffmania*, *Macfiella* e *Mataemyia*; Grupos- *fluvialis*, *leoni*, *limai*, *pachmerus* e *reticulatus*; e 1.973 (22,16%) espécimes do gênero *Leptoconops*, subgênero *Leptoconops* (Tabelas 1 e 2).

Embora o Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN) forneça diretrizes para o uso e formato dos termos da nomenclatura formal, incluindo o nome da espécie e subgênero, as categorias infrasubgenéricas 'complexos de espécies' e 'grupo de espécies' não têm status formal sob o ICZN, ainda o seu uso é prevalente na literatura para *Culicoides* <sup>(16)</sup>.

A identificação morfológica dos adultos de ceratopogonídeos é difícil devido tamanho diminuto desses dípteros, deficiência de chaves de identificação e o árduo trabalho de triagem, morfotipagem e montagem, onde o método atual de microscopia para identificar as espécies de maruins é intensiva em termos de tempo e trabalho. Para as 40 espécies de ceratopogonídeos identificadas nesse estudo, foi fornecido a diagnose, pranchas de asas e mapa com distribuição de

espécies na Amazônia brasileira. Catálogos e listas de espécies são ferramentas importantes no estudo da biodiversidade de localidades, estados, países e regiões zoogeográficas <sup>(2)</sup>.

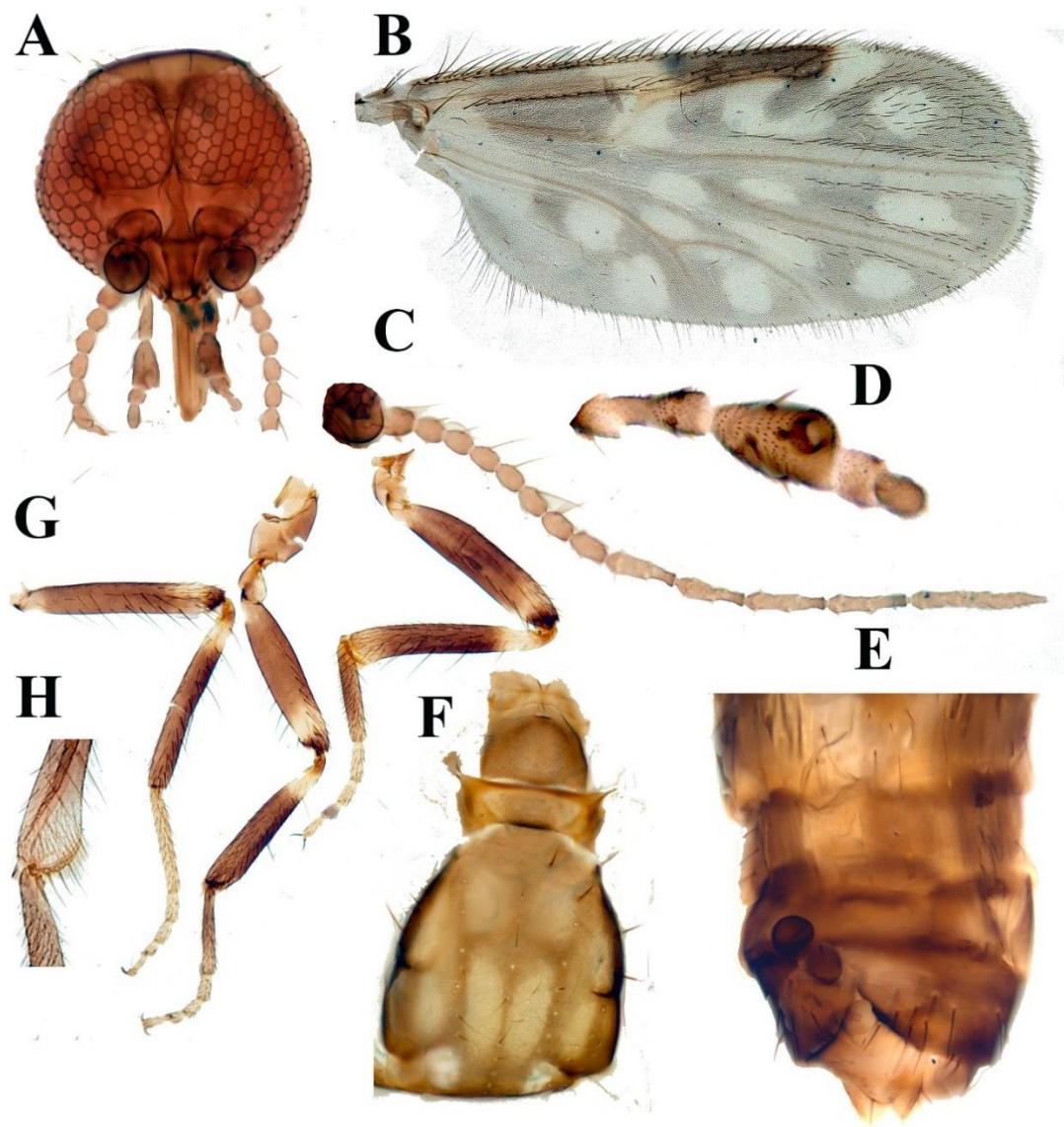
As espécies de *Atrichopogon* encontradas nesse estudo pertencem a um pequeno grupo de espécies de asas manchadas, com 12 espécies. Para esse grupo, Macfie <sup>(24,25)</sup> descreveu um *Atrichopogon* no Brasil e outro do México, baseado apenas em fêmeas com asas pigmentadas. Em seguida, Clastrier <sup>(26,28)</sup> descreveram três espécies com asas nitidamente pigmentadas, provenientes da Guiana Francesa e da Bacia do Amazonas. Cavalieri e Chiossone <sup>(29)</sup> e Spinelli e Marino <sup>(30)</sup> descreveram duas espécies da Argentina e do Paraguai. Borkent e Picado <sup>(31)</sup> descreveram uma espécie da Costa Rica. Fellipe-Bauer et al. <sup>(32)</sup> e Fellipe-Bauer <sup>(33)</sup> descreveram quatro espécies no Brasil, duas na Mata Atlântica do Rio de Janeiro, e duas no Estado do Acre, na Mata Amazônica do Brasil.

No capítulo IV descrevemos três novas espécies de *Atrichopogon* com asas pigmentadas, baseado em indivíduos machos e fêmeas. As três espécies novas do gênero *Atrichopogon*, *A. janseni* Pessoa & Farias sp. nov. *A. riopardensis* Farias, Pessoa & Paulino-Rosa sp. nov, *A. sergioluzi* Farias, Santos & Pessoa sp. nov, foram coletadas no município de Presidente Figueiredo, sendo *A. sergioluzi* Farias, Santos & Pessoa sp. nov, também coletada no município de Manaus.

Para o estado do Pará, as espécies *C. ocumarensis*, *C. plaumanni* e *C. ruizi*, foram registrados pela primeira vez no município de Oriximiná; *C. leopoldoi*, *C. paraensis*, *C. quasiparaensis* e *C. rhombus*, primeiros registros para o município de Óbidos; *C. coutinhoi*, *C. foxi*, *C. kuripako*, *C. leopoldoi*, *C. paraensis*, primeiros registros para o município de Itaituba. Todas as espécies capturadas em Itaituba são novos registros no município. Para o estado do Amazonas, as espécies *C. aitkeni*, *C. coutinhoi*, *C. ignacioi*, *C. jurutiensis*, *C. macrostigma*, *C. profundus* são novos registros no município de Tefé; *C. amazonicus*, *C. caprilesi*, *C. contubernalis*,

*C. forattinii*, *C. jurutiensis*, *C. kuripako*, *C. paucienfuscatus*, *C. ruizi* são novos para o município de Presidente Figueiredo; *C. lyrinotatus* é novo registro para o município de Manaus; *Leptoconops brasiliensis* é novo registro para o município de Boca do Acre, estado do Amazonas.

*Culicoides macrostigma* (Figura 2) é novo registro para o Brasil. As espécies *C. rhombus* e *C. kuripako* são novos registros para o estado do Pará. As espécies *C. amazonicus*, *C. forattinii*, *C. jurutiensis*, *C. lyrinotatus* e *C. macrostigma* são novo registro para o estado do Amazonas. *Leptoconops brasiliensis* é novo registro para o estado do Maranhão, coletado no município de Raposa. Os vetores, *C. paraensis* foi encontrado principalmente em peridomicílios, área urbana e rural e *C. insignis* foi mais abundante em peridomicílios próximos a currais, área rural.



**Figura 2 (18).** Fêmea adulta de *Culicoides macrostigma*. **A.** Cabeça, vista anterior; **B.** Asa; **C.** Antena; **D.** Palpo; **E.** Abdome; **F.** Tórax, vista ventral; **G.** Pernas; **H.** Espinho tibial

**Tabela 1 (2).** Relação de espécies de maruins dos Gêneros *Atrichopogon*, *Culicoides* e *Leptoconops* (Diptera: Ceratopogonidae) identificadas no estudo.

Gênero	Subgênero/ Grupo	Espécies		
<i>Atrichopogon</i> Kieffer	<i>Atrichopogon</i> Kieffer	<i>A. janseni</i> Pessoa & Farias sp.nov.		
		<i>A. riopardensis</i> Farias, Pessoa & Paulino-Rosa sp.nov		
		<i>A. sergioluzi</i> Farias, Santos & Pessoa sp.nov		
<i>Culicoides</i> Latreille	<i>Haematomyidium</i> Goeldi	<i>C. debilipalpis</i> Lutz		
		<i>C. glabrior</i> Macfie		
		<i>C. jurutiensis</i> Trindade & Felipe-Bauer		
		<i>C. paraensis</i> Goeldi		
		<i>C. quasiparaensis</i> Clastrier		
	<i>Hoffmania</i> Fox/ <i>guttatus</i>	<i>C. coutinhoi</i> Barreto		
		<i>C. foxi</i> Ortíz		
		<i>C. fusipalpis</i> Wirth & Blanton		
		<i>C. ignacioi</i> Forattini		
		<i>C. insignis</i> Lutz		
<i>Culicoides</i> Latreille	<i>Hoffmania</i> Fox/ <i>hylas</i>	<i>C. ocumarensis</i> Ortíz		
		<i>C. paraignacioi</i> Spinelli		
		<i>C. plaumanni</i> Spinelli		
		<i>C. pseudodiabolicus</i> Fox		
		<i>C. ruizi</i> Forattini		
		<i>Macfiella</i> Fox	<i>Macfiella</i> Fox	<i>C. aitkeni</i> Wirth & Blanton
				<i>C. contubernalis</i> Ortiz
				<i>C. hylas</i> Macfie
		<i>Mataemyia</i> Vargas	<i>Mataemyia</i> Vargas	<i>C. aldomari</i> Felipe-Bauer & Trindade
				<i>C. bricenoi</i> Ortíz
Não definido/ <i>fluvialis</i>	Não definido/ <i>fluvialis</i>	<i>C. fluvialis</i> Macfie		
		<i>C. leopoldoi</i> Ortíz		
		<i>C. tetrathyris</i> Wirth & Blanton		
Não definido/ <i>leoni</i>	Não definido/ <i>leoni</i>	<i>C. glabellus</i> Wirth & Blanton		
Não definido/ <i>limai</i>	Não definido/ <i>limai</i>	<i>C. limai</i> Barreto		



<i>C. hylas</i>	0	0	17	80	5	16	0	0	0	0
<i>C. ignacioi</i>	0	0	0	1	0	4	0	0	0	0
<i>C. insignis</i>	0	0	33	83	0	3	0	0	0	0
<i>C. jurutiensis</i>	0	0	5	11	0	1	0	0	0	0
<i>C. kuripako</i>	0	0	1	4	0	0	0	0	0	0
<i>C. leopoldoi</i>	0	0	12	46	0	8	0	0	0	0
<i>C. limai</i>	0	0	1	9	0	0	0	0	0	0
<i>C. lyrinotatus</i>	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. macrostigma</i>	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0
<i>C. ocumarensis</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>C. paraensis</i>	0	0	0	34	0	0	0	0	0	0
<i>C. paraignacioi</i>	0	0	3	78	0	1	0	0	0	0
<i>C. paucienfuscatus</i>	0	0	0	1	0	9	0	0	0	0
<i>C. phlebotomus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. plaumanni</i>	0	0	4	10	0	0	0	0	0	0
<i>C. profundus</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>C. pseudodiabolicus</i>	0	0	59	265	0	0	0	0	0	0
<i>C. quasiparaensis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. rhombus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. ruiji</i>	0	0	2	9	0	0	0	0	0	0
<i>C. tetrathyris</i>	0	0	3	8	0	0	0	0	0	0
<i>Leptoconops brasiliensis</i>	0	0	0	0	0	0	0	21	0	31

---







Aqui é possível verificar os principais caracteres utilizados para identificação das 40 espécies válidas que compõe este trabalho, bem como, imagem das asas, e mapas de distribuição das espécies na Amazônia brasileira (Figura 17).

### **Subfamília Forcipomyiinae Lenz, 1934**

#### **Gênero *Atrichopogon* Kieffer**

*Atrichopogon* Kieffer, 1906 (como subgênero de *Ceratopogon*). Espécies-tipo: *Ceratopogon exilis* Coquillett (= *Ceratopogon levis* Coquillett), designação por Coquillett, 1910. Espécies-tipo.

#### **Subgênero *Atrichopogon* Kieffer**

#### ***Atrichopogon janseni* Pessoa & Farias sp. nov.**

(Figuras 4 e 12A)

*Atrichopogon janseni* Pessoa & Farias, 2020. Presidente Figueiredo - Amazonas

**Identificação** – é principalmente pelo macho. Espécie de *Atrichopogon* com asas pigmentadas na região Neotropical com gonóstilo não bifurcados, espatulados em 2/3 distais, com sulco médio e ápice quadrático distintos. A fêmea possui poucas características diagnósticas; asa como na figura 12A, com duas manchas mais escuras distintas; os flagelômeros 1–8 mais escuros do que os flagelômeros 9–13; genitália marrom médio; espermateca única, sem ductos esclerotizados, pequena e ovóide.

**Distribuição** – Brasil, Amazonas (Presidente Figueiredo), sp. nov.

***Atrichopogon riopardensis* Farias, Pessoa & Paulino-Rosa sp. nov.**

(Figuras 4, 12B)

*Atrichopogon riopardensis* Farias, Pessoa & Paulino-Rosa, 2020. Presidente Figueiredo – Amazonas. Espécies tipo.

**Identificação** – é principalmente pelo macho. Apenas espécies existentes de *Atrichopogon* com asas pigmentadas na região Neotropical com gonóstilo bifurcado próximo ao seu comprimento médio; porção interna curta, como uma unha, com sulco longitudinal; porção externa, apicalmente curvada, 4 × mais longa que a interna, com uma cerda longa 1/3 basal. A fêmea possui poucas características diagnósticas; asa com duas manchas mais escuras distintas (Figura 12B); padrão de cor uniforme da antena e pernas; uma espermateca curta, ovoide, esclerotizada, com ducto esclerotizado curto e largo.

**Distribuição** – Brasil, Amazonas (Presidente Figueiredo), sp. nov.

***Atrichopogon sergioluzi* Farias, Santos & Pessoa sp. nov.**

(Figuras 4, 12C)

*Atrichopogon sergioluzi* Farias, Santos & Pessoa, 2020. Presidente Figueiredo – Amazonas. Espécies tipo.

**Identificação** – é principalmente pelo macho. Apenas espécies existentes de *Atrichopogon* com asas pigmentadas na região Neotropical com gonóstilo espesso, inchado na metade basal, com ápice bífido com ponta interna esclerotizada. A fêmea possui poucas características diagnósticas; asa com duas manchas mais escuras distintas (Figuras 12C); uma grande espermateca elíptica.

**Distribuição** – Brasil, Amazonas (Manaus e Presidente Figueiredo), sp. nov.

## Subfamily Ceratopogoninae Newman, 1834

### Gênero *Culicoides* Latreille

*Culicoides* Latreille, 1809. *Culicoides punctatus* Latreille (= *Ceratopogon punctatus* Meigen).

Espécies tipo.

### Subgênero *Haematomyidium* Goeldi

*Haematomyidium* Goeldi, 1905. Espécies-tipo: *Haematomyidium paraensis* Goeldi, por designação original.

### *Culicoides debilipalpis* Lutz

(Figuras 4 e 12D)

*Culicoides debilipalpis* Lutz, 1913. São Paulo, Brasil.

*Culicoides khalafi* Beck, 1957. Flórida, EUA.

*Culicoides ichesi* Ronderos & Spinelli, 1995. Argentina.

**Identificação** – Fêmea: Olhos amplamente separados. Flagelômero 8 maior que 9, últimos cinco segmentos não muito mais longos do que os segmentos anteriores, sensilas presentes nos flagelômeros 1, 5–7; AR 0,76–0,90. Palpo com 3º segmento delgado, com uma fossa pequena e profunda; PR 2,00–2,60. Mandíbula com 12–19 dentes. Pernas marrom escuras; fêmures dianteiro e médio com anéis claros estreitos, subapicais; todas as tíbias com anéis claros, estreitos, apicais e sub-basal. Asa como na figura 12D, com duas manchas claras pós-estigmáticas em célula  $r_3$  geralmente bem separada, a posterior localizada ligeiramente próxima da anterior; mancha clara distal na célula  $r_3$  geralmente transversal a ligeiramente reniforme; dois pontos claros na célula  $m_1$ ; uma mancha clara nos ápices da célula  $m_2$  e célula anal; manchas claras presentes atrás garfo medial e na frente do garfo mediocubital, este último

ausente em alguns espécimes; macrotríquias distribuída em dois terços distais da asa; CR 0,59–0,68; comprimento da asa 0,66–0,92 mm. Halter marrom. Duas espermatecas <sup>(34)</sup>.

**Distribuição** – Amplamente distribuída, desde o sudeste dos UEA até a Argentina e Brasil (Acre, Amapá, Amazonas, Ceará, Goiás, Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Pará, Pernambuco, São Paulo, Santa Catarina, Rondônia e Roraima).

***Culicoides glabrior* Macfie**

(Figuras 4 e 12E)

*Culicoides debilipalpis* var. *glabrior* Macfie, 1940. Guyana.

*Culicoides grahambelli* Forattini, 1956. Panamá.

**Identificação** – Fêmea: olhos nus, amplamente contíguos. Antena com sensilas distais presentes nos flagelômeros 1, 4–7; AR 0,80–0,99. Palpo com terceiro segmento largo, com uma fossa sensorial muito ampla e rasa; o quarto segmento é muito mais amplo do que o quinto; PR 1,7–2,6. Asa como na figura 12E, com três manchas clara na célula  $r_3$  arranjadas em um triângulo largo, mancha distal transversal; somente uma mancha distal na célula  $m_2$ ; manchas claras presentes atrás da forquilha medial e na frente da forquilha mediocubital; uma mancha clara simples no ápice da célula anal transversal, estendendo proximamente à margem da asa; macrotríquias esparsas na metade distal da asa, umas poucas na base da célula medial e na célula anal. Distingue-se de outras espécies próximas pela notável largura da segunda célula radial. Comprimento da asa 0,86–1,22 mm. Halter marrom com extremidade ligeiramente mais clara. Duas espermatecas piriforme, subiguais <sup>(35)</sup>.

**Distribuição** – Brasil (Acre, Amazonas, Pará, Rondônia e Roraima), Guiana, Honduras ao Equador, Suriname e Trinidad.

**\**Culicoides jurutiensis* Trindade & Felipe-Bauer**

(Figuras 3A-H, 4, 12F)

*Culicoides jurutiensis* Trindade & Felipe-Bauer, 2011. Brasil (Pará).

**Identificação** – Fêmea: Olhos separados por uma distância igual ao diâmetro de 1.5 omatídios, com pilosidade entre os omatídeos. Flagelômero marrom, alongados; com 2/3 proximais dos flagelômeros 1–6 mais claros; AR 0,85; sensilas coelocônicas nos flagelômeros 1, 6–8. Terceiro segmento do palpo inchado distalmente, com fosseta subapical rasa e arredondada; PR 2,7. Mandíbula com 17-18 dentes. Pernas marrom-escuras; fêmures anterior e posterior com anéis claros subapicais; todas as tíbias com anéis claros sub-basais; ápice da tíbia posterior com anel claro. Asa conforme figura 12F, com padrão apenas moderadamente distinto de manchas claras; 2ª célula radial com mancha escura; mancha clara na nervura cruzada r–m, contígua à margem costal da asa; mancha clara pós-estigmática na célula r<sub>3</sub> ligeiramente oblíqua; mancha clara distal na célula r<sub>3</sub> transversal não contígua à margem da asa; m<sub>1</sub> com duas manchas claras, a proximal menor, arredondada; um distal longe da margem da asa; m<sub>2</sub> com uma mancha clara fraca posterior à bifurcação medial; manchas claras distais em m<sub>2</sub>, CuA<sub>1</sub> e célula anal contígua à margem da asa. Macrotríquias esparsas, distribuídas na metade distal da asa. Comprimento da asa 0,86–1,22 mm, CR 0,58–0,60. Halter castanho escuro, haste clara. Duas espermatecas ovoides, subiguais com ductos esclerotizados curtos <sup>(36)</sup>.

**\*Descrição do Macho**

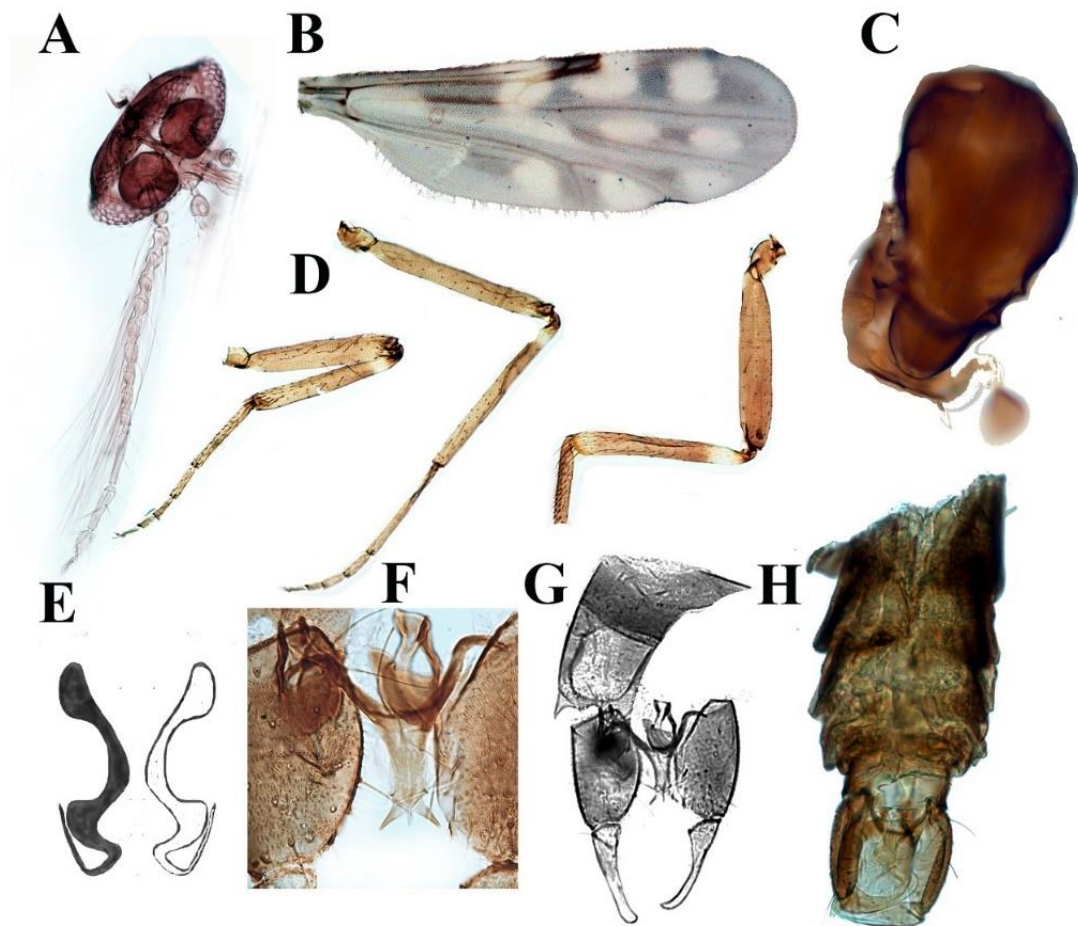
Macho (Figuras 3A-H): Comprimento da asa 0,80–0,85 (n=2), largura da asa 0,30–0,33 (n=2), relação da asa 0,55–0,58 (n=2). Semelhante a fêmea com diferenças sexuais usuais. Genitália: 9º esternito raso, pouco visível. 9º tergito quadrangular, com fenda conspícua no meio, processos apicolaterais bem desenvolvidos. Gonocoxito relativamente robusto. Gonóstilo curvo distalmente. Parâmeros separados, cada um com botão basal esclerotizado; haste longa, curva perto da base, ligeiramente sinuosa, inchada na porção média com lobo ventral.

**Material Examinado** – Dois machos adultos, montado em lâmina/lamínula com fenol-balsamo. Dados da etiqueta como segue: BRASIL, Amazonas, Presidente Figueiredo, Rio

Pardo, 1° 49'02,3"S 60°19'03,5"W, armadilha de luz CDC, Ramal Gusmão, dossel, floresta, Pereira-Silva J. Col. VII. 2016; Lâmina nº 825, 507.

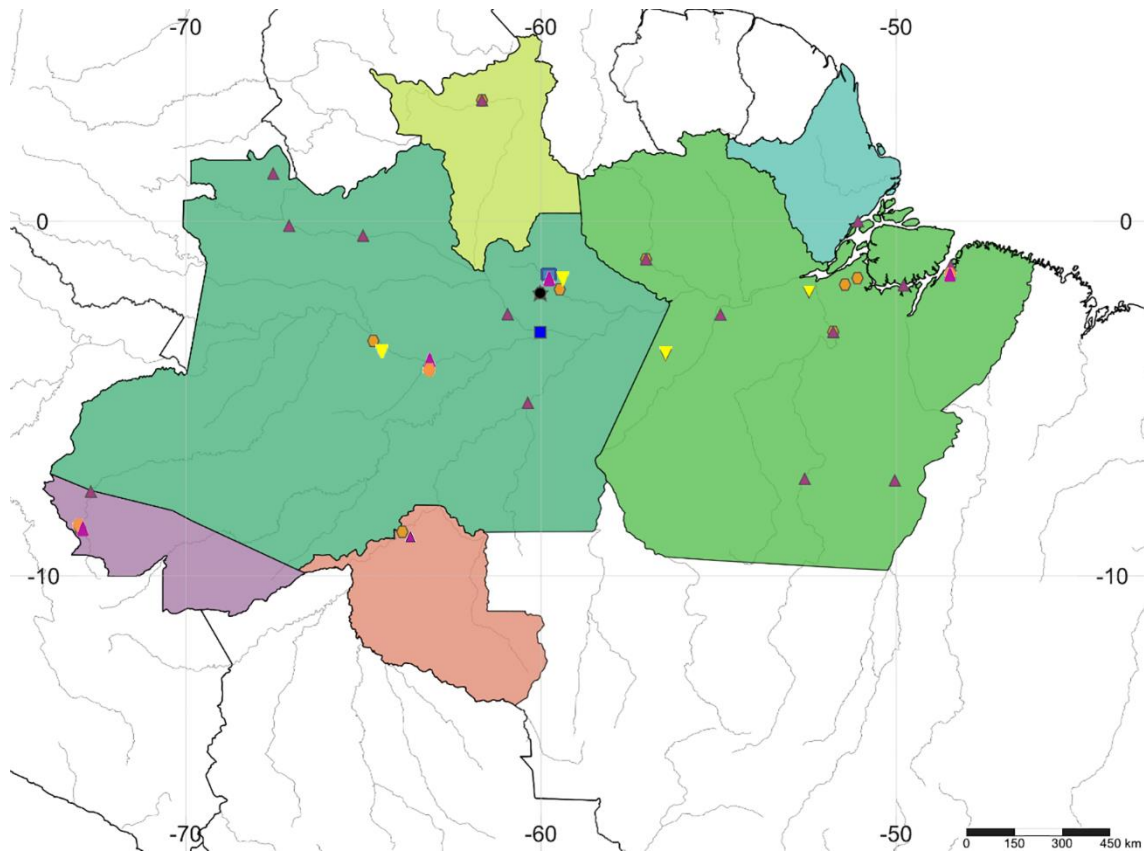
**Distribuição** – Brasil (Amazonas e Pará).

**\*Novos Registros** – Novo registro para o estado do Amazonas (Presidente Figueiredo e Tefé), nova descrição do macho.



**Figura 3 (19).** Macho adulto *Culicoides jurutiensis*. **A.** Cabeça, vista anterior; **B.** Asa; **C.** Tórax, vista dorsal; **D.** Pernas; **E.** Parâmeros; **F.** Edeago, vista ventral; **G.** Genitália; **H.** Abdome.





- *Atrichopogon (Atrichopogon) janseni* Pessoa & Farias sp.nov;
- ★ *A. (A) riopardensis* Farias, Pessoa & Paulino-Rosa sp.nov
- *A. (A) sergioluzi* Farias, Santos & Pessoa sp.nov
- ▲ *Culicoides (Haematomyidium) debilipalpis* Lutz
- ◆ *C. (Ha) glabrior* Macfie
- ▼ *C. (Ha) jurutiensis* Trindade & Felipe - Bauer

**Figura 4 (20).** Mapa da distribuição das espécies dos gêneros *Atrichopogon* e *Culicoides* na Amazônia brasileira (modificado após SimpleMappr, <http://www.simplemappr.net>).

**\**Culicoides paraensis* (Goeldi)**

(Figuras 5, 12G)

*Haematomyidium paraensis* Goeldi, 1905. Pará, Brasil.

*Culicoides undecimpunctatus* Kieffer, 1917. Argentina.

**Identificação** – Olhos bem separados, nus. Antena com sensilas nos flagelômeros 1, 5–7. AR 0,71–0,81. Terceiro segmento do palpo mais longo e mais delgado, com uma pequena fossa

sensorial profunda. PR 1,7–2,8. Mandíbula com 14–15 dentes. Pernas marrom-escuras, fêmures dianteiro e médio com anel claro subapical, todas as tíbias com anel claro sub-basal e a tíbia posterior com anel claro apicais. Asa como na figura 12G; 2ª célula radial escura; mancha clara sobre a veia r–m estreita; célula r<sub>3</sub> com quatro pequenas manchas clara redondas; célula m<sub>1</sub> com três pequenas manchas claras; célula m<sub>2</sub> com mancha clara; uma mancha clara atrás da forquilha medial e uma na frente da forquilha mediocubital, e uma mancha na parte distal da célula sobre a margem da asa; célula cua<sub>1</sub> com pequena mancha clara redonda próxima da margem da asa; célula anal com uma mancha clara na porção distal; ápices das veias M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, CuA<sub>1</sub> e CuA<sub>2</sub> escuros; macrotríquias esparsas na metade distal da asa, umas poucas na base da célula m<sub>2</sub> e na célula anal. Comprimento da asa 0,69-0,89 mm; CR 0,56-0,60. Halter claro. Duas espermatecas piriforme, desiguais; terceira espermateca rudimentar mais curta; anel esclerotizado longo e curvo (bem diferenciado do grupo *paraensis*)<sup>(17,35)</sup>.

**Distribuição** – EUA a Argentina e Brasil (Acre, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Bahia, Ceará, Maranhão, Pernambuco, Mato Grosso do Sul, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e Santa Catarina).

\* **Novo registro** – Primeiro registro para o município de Óbidos, Pará.

\****Culicoides quasiparaensis* Clastrier**

(Figures 5, 12H)

*Culicoides quasiparaensis* Clastrier, 1971. Guiana Francesa.

**Identificação** – Fêmea: olhos estreitamente separados acima, contíguos abaixo. Antena com sensilas coelocônicas nos flagelômeros 1.6–8; Ar 0,80. Palpo com 3º segmento largo e curto com fosseta larga e rasa, raramente profunda e aberto por um poro menor; PR 1,7. Asa como na figura 12H; com três manchas claras na célula m<sub>1</sub>; mancha clara distal distalmente separada da mancha clara subapical; comprimento da asa 0,83 mm; CR 0,61. Duas espermatecas de tamanhos muito desiguais<sup>(17)</sup>.

**Distribuição** – Honduras e El Salvador, ao sul até Colômbia, Peru, Guiana Francesa e Brasil (Acre, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima e Maranhão).

\* **Novo registro** – Primeiro registro para o município de Óbidos, Pará.

***Subgênero Hoffmania* Fox**

*Hoffmania* Fox, 1948. Como subgênero de *Culicoides*. Espécies tipo; *Culicoides inamollae* Fox & Hoffman, 1944 (= *Culicoides insignis* Lutz 1913), pela designação original.

\****Culicoides aitkeni* Wirth & Blanton**

(Figuras 8, 13D)

*Culicoides aitkeni* Wirth & Blanton, 1968. Trinidad e Tobago

**Identificação** – Fêmea: olhos contíguos, nus. Antena longa e delgada, segmentos com bases visivelmente claras; sensilas coelocônicas presente nos flagelômeros 1, 9–13; AR 1,26. Palpo com sensilas espalhadas no 3º segmento; PR 6.0. Fêmures médio e posterior com anel claro subapical. Asa como na figura 13D; 2ª célula radial incluída em uma única mancha clara; célula r<sub>3</sub> com mancha clara; ápices das veias M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, CuA<sub>1</sub> e CuA<sub>2</sub> claros; uma única mancha clara cruzando a segunda célula radial; comprimento da asa 1,50 mm. Duas espermatecas com ductos esclerotizados curtos e delgados <sup>(37)</sup>.

**Distribuição** - Brasil (Amazonas e Pará); Trinidad e Tobago.

\* **Novo registro** – Primeiro registro no município de Tefé, Amazonas.

\****Culicoides contubernalis* Ortíz & León**

(Figuras 8, 13E)

*Culicoides contubernalis* Ortíz & León, 1955. Equador.

**Identificação** – Fêmea: olhos contíguos, nus. Antena longa e delgada, segmentos com bases visivelmente claras; sensilas coelocônicas presente nos flagelômeros 1, 9–13; AR 1,09–1,14. Palpo com sensilas espalhadas 3º segmento; PR 3,8–4,3. Fêmur médio e posterior com anel claro subapical. Asa como na figura 13E; uma mancha clara na célula r<sub>3</sub>; uma mancha clara que

cruza a segunda célula radial, simples e larga, não atingindo a veia  $M_1$ ; uma mancha clara distal amplamente atingindo a margem da asa; mancha clara sobre a veia r-m estendendo da margem costal para a célula  $m_2$ ; célula  $m_1$  com duas manchas claras arredondadas; duas manchas claras situadas entre as forquilhas medial e mediocubital; célula  $cua_1$  com uma mancha clara arredondada atingindo margem da asa; ápices das veias  $M_1$ ,  $M_2$ ,  $CuA_1$  e  $CuA_2$  claros; macrotríquias esparsas na metade distal da asa e da célula anal; comprimento de asa 1,30–1,35 mm. Halter claro. Duas espermatecas ovoides, desiguais; com ductos esclerotizados curtos e delgados <sup>(35,37)</sup>.

**Distribuição** – Equador e Brasil (Amazonas e Rondônia).

\***Novo registro** – Primeiro registro para o estado do Amazonas (Presidente Figueiredo).

\****Culicoides coutinhoi* Barretto**

(Figures 5, 12I)

*Culicoides coutinhoi* Barretto, 1944. São Paulo, Brasil.

**Identificação** – Fêmea: Olhos contíguos, por uma distância de 3 omatídeos. Antena marrom; flagelômeros 1–7 com base claras e 1, 8-12 com sensilas; AR 1,03–1,18. Asa com padrão contrastante (Figura 12I); veia r-m infuscada na metade anterior; veia  $R_3$  clara; uma mancha clara transversal na célula  $r_3$  amplamente atingindo a margem da asa; duas manchas claras distais na célula  $m_1$ ; ápices das veias  $M_1$ ,  $M_2$  e  $CuA_1$  claros, ápice da veia  $CuA_2$  escuro; poucas macrotríquias presentes nas extremidades das células  $r_3$ ,  $m_1$  e  $m_2$ ; comprimento da asa 0,89–1,10; CR 0,65–0,68. Halter claro, escurecido em alguns espécimes. Duas espermatecas subsférica para ovoide, subiguais <sup>(35,38)</sup>.

**Distribuição** – Brasil (Amazonas, Pará, Rondônia e São Paulo).

\* **Novo registro** – Primeiro registro nos municípios de Itaituba e Tefé, estados do Pará e Amazonas, respectivamente.

\****Culicoides foxi* Ortíz**

(Figuras 5, 12J)

*Culicoides foxi* Ortíz, 1950. Porto Rico.

**Identificação** – Fêmea: olhos contíguos por uma distância igual ao diâmetro de 1 omatídeo. Palpo com 3º segmento alongado, fossa sensorial arredondada e rasa; PR 2,5–3,6; AR 1,10; Mandíbula com 14–17 dentes. Asa como na figura 12J; veia r–m cruzada inteiramente, uma mancha clara distal grande, transversal, profundamente infuscada na célula r<sub>3</sub> encontrando-se amplamente com a margem da asa; duas manchas claras distais na célula m<sub>1</sub>, ápices das veias M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> e CuA<sub>1</sub> amplamente claros, ápice da veia CuA<sub>2</sub> escuro; comprimento da asa 1,01–1,33 mm; CR 0,67–0,71. Halter escuro; haste clara. Duas espermatecas subesférica a ovóide, desigual<sup>(35,38)</sup>.

**Distribuição** – México ao nordeste da Argentina; Brasil (Amazonas, Rondônia, Pará, Roraima, Bahia, Maranhão, Pernambuco, Piauí, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná).

\* **Novo registro** – Primeiro registro para o município de Itaituba, Pará.

***Culicoides fusipalpis* Wirth & Blanton**

(Figuras 5, 12K)

*Culicoides fusipalpis* Wirth & Blanton, 1973. Pará, Brasil.

**Identificação** – Fêmea: olhos contíguos por uma distância igual ao diâmetro de 2,0–2,5 omatídeos. 3º segmento do palpo fusiforme, ligeiramente inchado apenas na parte média, com sensilas de superfície dispersas. Antena marrom, flagelômeros 1–7 com base de claras e 1, 8–12 com sensilas; AR 1,04–1,16. Asa como na figura 12K; r–m levemente escurecida e com larga mancha clara, uma grande mancha distal clara transversal na célula r<sub>3</sub>, amplamente encontrando a margem da asa, uma mancha distal clara na célula m<sub>1</sub>, ápices de veias M<sub>1</sub> e M<sub>2</sub> claros, ápices das veias CuA<sub>1</sub> e CuA<sub>2</sub> escuros; comprimento da asa 0,91–1,16; CR 0,66–0,70. Halter claro. Duas espermatecas subiguais, subesférica com anel esclerotizado curto<sup>(38)</sup>.

**Distribuição** – El Salvador para Bolívia, Equador, Guiana Francesa, Guiana e Brasil (Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Bahia, Maranhão e Rio de Janeiro).

***Culicoides hylas* Macfie**

(Figuras 8, 13F)

*Culicoides hylas* Macfie, 1940. Guiana.

**Identificação** – Fêmea: olhos contíguos, nus. Antena longa e delgada, segmentos com bases visivelmente claras; sensilas coelocônicas presente nos flagelômeros 1, 9–13; AR 1,06–1,15. Palpo com fossas sensoriais irregular no 3º segmento; RP 2,6–3,6. Mandíbula com 17–21 dentes. Asa como na figura 13F; r<sub>3</sub> com mancha clara presente anterior à base da veia M<sub>1</sub>; uma única mancha clara cruzando a segunda célula radial; ápices de CuA<sub>1</sub> e CuA<sub>2</sub> claros; Comprimento da asa 0,99–1,29 mm; RC 0,68. Fêmur medial com faixa clara subapical; fêmur posterior escuro apical. Halter claro. Duas espermatecas ovoides, desiguais; com ductos esclerotizados curtos e delgados <sup>(35,37)</sup>.

**Distribuição** – México ao Peru e Brasil (Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima e Maranhão).

**\**Culicoides ignacioi* Forattini**

(Figuras 5, 12L)

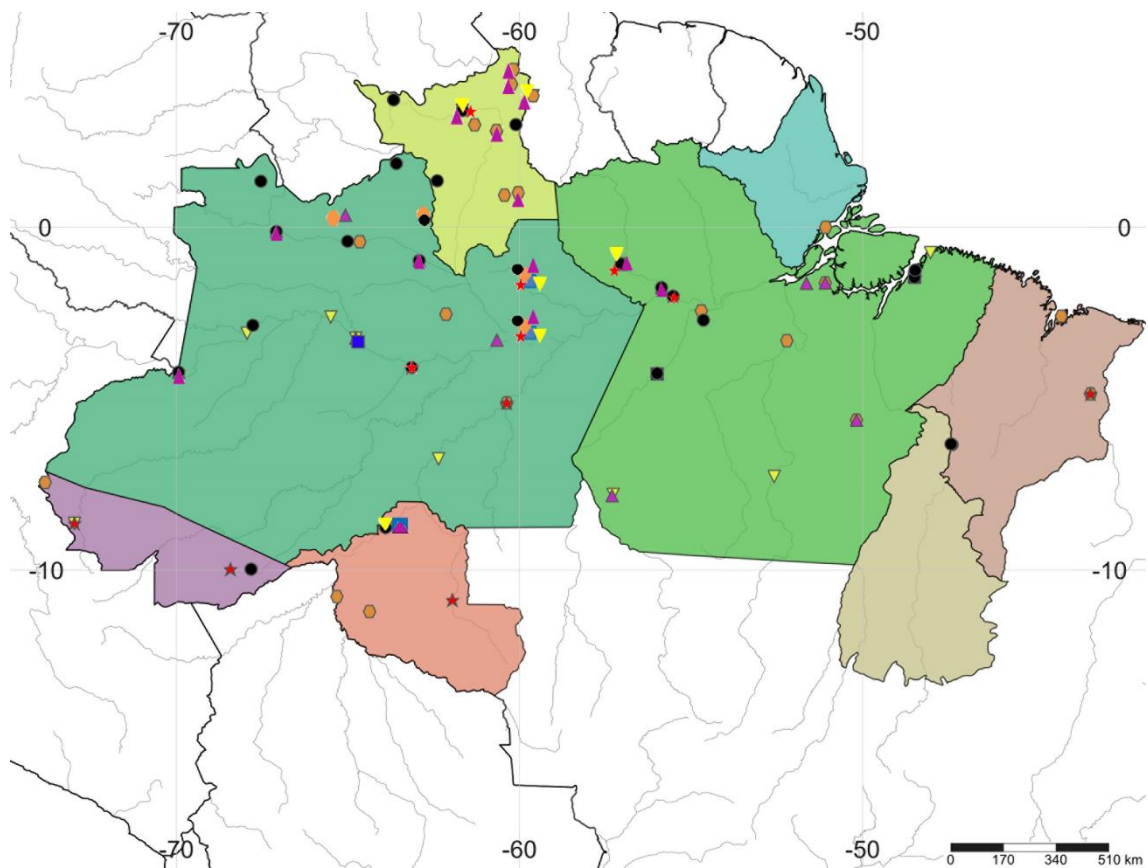
*Culicoides ignacioi* Forattini, 1957. São Paulo, Brasil.

*Culicoides saintjusti* Tavares & Ruiz, 1980. Rio de Janeiro, Brasil.

**Identificação** – Fêmea: olhos contíguos por uma distância igual com o diâmetro de 1,5 omatídeo. Antena marrom; flagelômeros 1–7 com base clara; AR 0,95. Palpo com terceiro segmento largo no meio, com fossa irregular; PR 3.60. Mandíbula com 20–22 dentes. Asa como mostrado na figura 12L; comprimento da asa 1.38–1.61 mm; CR 0,68– 0,70. Halter marrom, haste clara. Duas espermatecas ovais, pequenas, ligeiramente desigual <sup>(39)</sup>.

**Distribuição** – Brasil (Acre, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Maranhão, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo) e Paraguai.

\* **Novo registro** – Primeiro registro para o município de Tefé, Amazonas.



● *Culicoides (Haematomyidium) paraensis* Goeldi

★ *C. (Ha) quasiparaensis* Clastrier

■ *C. (Hoffmania) coutinhoi* Barreto

▲ *C. (Ho) foxi* Ortíz

◈ *C. (Ho) fusipalpis* Wirth & Blanton

▼ *C. (Ho) ignacioi* Forattini

**Figura 5 (21).** Mapa da distribuição das espécies do gênero *Culicoides* na Amazônia brasileira (modificado após SimpleMappr, <http://www.simplemappr.net>).

***Culicoides insignis* Lutz**

(Figuras 7, 12M)

*Culicoides insignis* Lutz, 1913. Bahia e Rio de Janeiro, Brasil.

*Culicoides inamollae* Fox e Hoffman, 1944. Porto Rico.

*Culicoides painteri* Fox, 1946. Porto Rico.

**Identificação** – Fêmea: olhos contíguos por uma distância igual ao diâmetro de 1.5 omatídeo. Antena marrom; flagelômeros 1–7 com base clara e sensilas em 1, 8–12; AR 1,04–1,16. Palpo com fossa definida e irregular no 3º segmento; PR 3,30–3,90. Asa conforme a figura 12M; veia r–m escura na metade anterior; veia CuA<sub>2</sub> escura até o ponto em que vira para encontrar a costa; apenas um ponto claro distal na célula m<sub>1</sub>; comprimento da asa 0.91–1.16 mm; CR 0,66–0,70. Halter escuro. Duas espermatecas piriformes a subesférica; ligeiramente desiguais <sup>(38)</sup>.

**Distribuição** – EUA, México, América Central e Caribe; Brasil (Amazonas, Pará, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Maranhão, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Espírito Santo, Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Rondônia e Santa Catarina).

**\**Culicoides ocumarensis* Ortíz**

(Figuras 7, 12N)

*Culicoides ocumarensis* Ortíz, 1950. Venezuela.

**Identificação** – Fêmea: olhos contíguos por uma distância igual ao diâmetro de 1,5–2,0 omatídios. Antena marrom; base dos flagelômeros 1-8 claros; sensilas coelocônicas nos flagelômeros 1, 9-13; AR 1,00-1,20. Palpo com 3º segmento ligeiramente mais largo no meio, fossa irregular; PR 3,25-3,80. Asa como na figura 12N; r-m cruzada com mancha clara; uma mancha clara transversal distal na célula r<sub>3</sub>, encontrando a margem da asa; duas manchas claras distais na célula m<sub>1</sub>; ápices das veias M<sub>1</sub> e M<sub>2</sub> claros; ápices das veias CuA<sub>1</sub> e CuA<sub>2</sub> escuros; comprimento da asa 0,95-1,20; CR 0,65-0,68. Halter marrom escuro. Duas espermatecas subesféricas a piriformes, subiguais <sup>(38)</sup>.

Distribuição: México ao norte do Brasil (Amazonas, Pará e Rondônia).

\* **Novo registro** – Primeiro registro para o município de Oriximiná, Pará.



***Culicoides paraignacioi* Spinelli**

(Figuras 7, 12O)

*Culicoides paraignacioi* Spinelli, 1993. Colômbia.

**Identificação** – Fêmea: olhos contíguos por uma distância igual ao diâmetro de 1.5 omatídeo. Antena marrom; flagelômeros 1–7 com base clara; sensilas coelocônicas em 1, 8–12; AR 0,95–1,04. Palpo com 3º segmento delgado; fossa arredondada, pequena e superficial; PR 3,55–4,55. Mandíbula com 21–23 dentes. Asa como na figura 12O; pequeno comprimento de asa 1,03–1,27 mm; largura 0,49–0,57 mm; CR 0,68. Halter escuro. Duas espermatecas ovoides, desiguais. Esta espécie é semelhante a *C. ignacioi*, que difere das fêmeas de *C. paraignacioi* por ser significativamente maior (comprimento da asa 1,38–1,61 mm em *C. ignacioi*), e por ter o terceiro segmento palpal mais robusto, com uma fossa sensorial irregular conspícua<sup>(38)</sup>.

**Distribuição** – Belize, Costa Rica, Colômbia, Guiana e Brasil (Amazonas, Pará e Rondônia).

**\**Culicoides plaumanni* Spinelli**

(Figuras 6A-I, 7, 13A)

*Culicoides plaumanni* Spinelli, 1993. Argentina.

**Identificação** – Fêmea: olhos contíguos por uma distância igual ao diâmetro de 1,5–2,5 omatídios. Antena marrom; flagelômeros 1–7 com base clara e sensilas em 1, 8–12; AR 1,09–1,20. 3º segmento palpal com fosseta irregular. Mandíbula com 13–15 dentes; PR 3.00–3.35. Asa como na figura 13A, r–m escura 1/2 anterior; uma mancha clara distal na r<sub>3</sub>, estreitamente encontrando a margem da asa; duas manchas claras distais na célula m<sub>1</sub>, ápices das veias M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> e CuA<sub>1</sub> claros, ápice de veia CuA<sub>2</sub> escuro; macrotríquias presentes 1/3 da asa; comprimento da asa 1,05–1,27 mm; CR 0.65–0.68. Halter marrom escuro. Duas espermatecas piriforme, desiguais<sup>(38)</sup>.

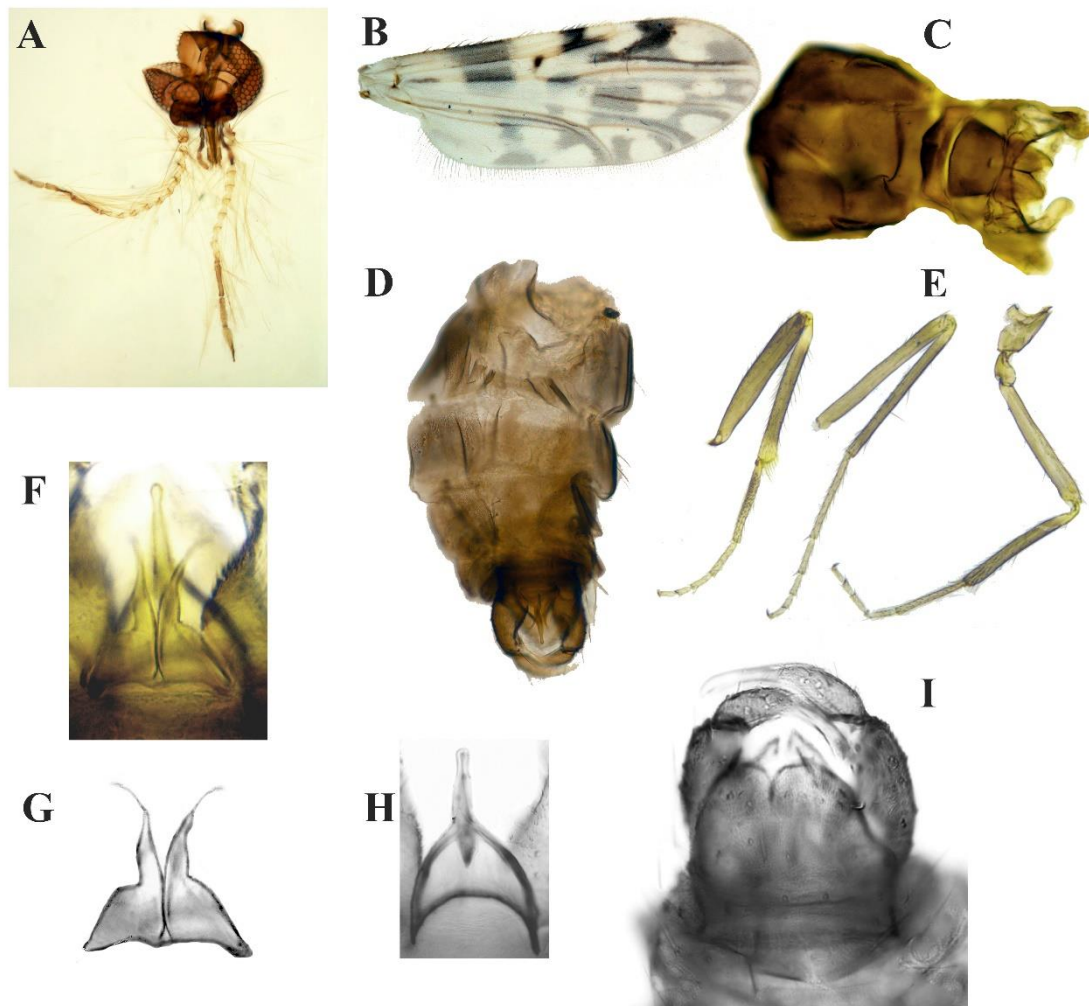
**\*Descrição do Macho**

**Macho.** (Figuras 6A-I): comprimento da asa 1,0 (n=2) mm, largura da asa 0,43 (n=2) mm, relação da asa 0,67 (n=2). Semelhante a fêmea com diferenças sexuais usuais. Genitália: 9º esternito muito raso com escavação médio-caudal. 9º tergito com fenda conspícua no meio, processos apicolaterais próximos. Gonocoxito relativamente robusto. Gonóstilo curvo distalmente. Edeago com arco basal baixo e largo; braços laterais ligeiramente convexos; porção distal delgada com papila terminal; distinta extensão esclerotizada interna presente. Parâmeros conectados na base por um curto espaço; base larga estreitando-se até ao ápice; ápice possui minúsculos fios de cabelo distais.

**\*Material examinado** – Dois machos adultos, montados em lâmina/lamínula com fenol-balsamo. 1º macho: Brasil, Amazonas, Presidente Figueiredo, Rio Pardo, 1°49'02,3" S 60°19'03,5" W, armadilha de luz CDC, Ramal Taxista, floresta, coletor Pereira-Silva J. VII. 2016; Lâmina nº 60. 2º macho: Brasil, Pará, Oriximiná, comunidade Icatú, Lago Sapucúá; coordenadas -1.7331826180451502, -56.10414694114495; armadilha de luz CDC, área rural, peridomicílio, galinheiro; coletor Coelho, Luiz; I. 2018 Lâmina nº 507.

**Distribuição** – Bolívia, Peru, Brasil (Amazonas, Pará, Rondônia e Minas Gerais) e nordeste da Argentina.

**\* Novo registro** – Primeiro registro para o município de Oriximiná, Pará.



**Figura 6 (22).** Macho adulto *Culicoides plaumanni*. **A.** Cabeça, vista anterior; **B.** Asa; **C.** Tórax, vista dorsal; **D.** Abdome; **E.** Pernas; **F.** Parâmeros/edeago, vista ventral; **G.** Parâmeros; **H.** Edeago; **I.** Genetália, vista dorsal.

### *Culicoides pseudodiabolicus* Fox

(Figuras 7, 13B)

*Culicoides pseudodiabolicus* Fox, 1946. Trinidad.

**Identificação** – Fêmea: olhos contíguos com distância igual a 2–3 omatídeos. Antena marrom; flagelômeros 1–7 com base clara e sensilas em 1, (4), (6), 8–12; AR 1,06–1,10. Palpo com fossa subdividida no 3º segmento; PR 2.50–3.30. Mandíbula com 14–16 dentes. Asa com padrão contrastante (Figura 13B); r–m veia escura 1/2 anterior; veia R<sub>3</sub> clara; uma grande mancha clara distal transversal na célula r<sub>3</sub> amplamente encontrando margem da asa; célula m<sub>1</sub> com duas

manchas claras distais, ápices das veias M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> e CuA<sub>1</sub> claros, ápice da veia CuA<sub>2</sub> escuro, macrotríquias dispersa presente nos ápices das células r<sub>3</sub>, m<sub>1</sub> e m<sub>2</sub>; comprimento da asa 0.92–1.07; CR 0.64–0.68. Halter claro, infuscado em alguns espécimes. Duas espermatecas nitidamente desiguais <sup>(38)</sup>.

**Distribuição** – México para Peru e Brasil (Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima e Maranhão).

**\**Culicoides ruizi* Forattini**

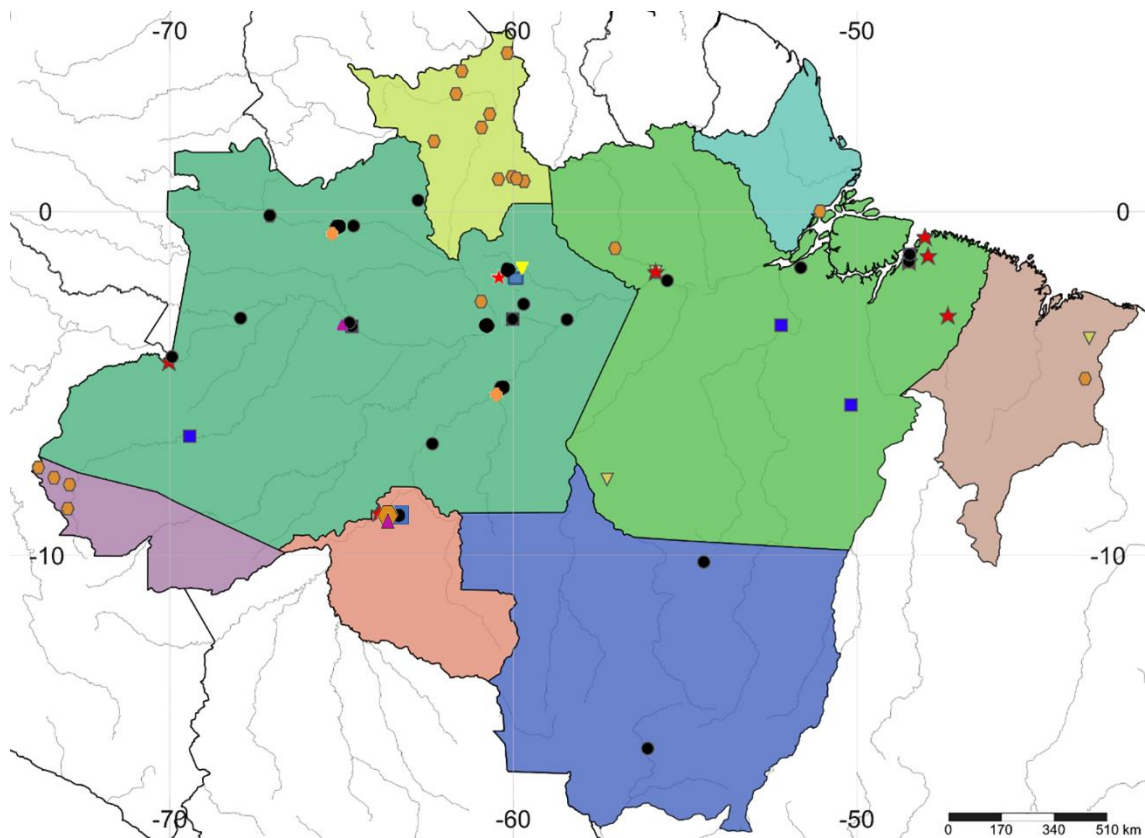
(Figuras 7, 13C)

*Culicoides ruizi* Forattini, 1954. Goiás, Brasil

**Identificação** – Fêmea: olhos contínuos por uma distância de 2.5 omatídeo. Antena marrom; flagelômeros 1– 7 com base clara e sensilas em 1, 8–12; AR 1,03–1,10. Asa com mancha escura estigmática (Figura 13C), parte na primeira e segunda célula radiais; r–m clara; duas machas claras na célula r<sub>3</sub>; célula m<sub>1</sub> com duas manchas claras distais; ápices das veias M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> e CuA<sub>1</sub> claras, ápice da veia CuA<sub>2</sub> escuro <sup>(38)</sup> (Spinelli et al. 1993).

**Distribuição** – Colômbia e Brasil (Amazonas, Pará, Maranhão e Goiás).

\* **Novo registro** – Primeiro registro para o município de Oriximiná, Pará.



- *C. (Hoffmania) insignis* Lutz
- ★ *C. (Ho) ocumarensis* Ortíz
- *C. (Ho) paraignacioi* Spinelli
- ▲ *C. (Ho) plaumanni* Spinelli
- ⬡ *C. (Ho) pseudodiabolicus* Fox
- ▼ *C. (Ho) ruizi* Forattini

**Figura 7 (23).** Mapa da distribuição das espécies do gênero *Culicoides* na Amazônia brasileira (modificado após SimpleMappr, <http://www.simplemappr.net>).

### Subgênero *Macfiella* Fox

*Macfiella* Fox, 1955. Como subgênero de *Culicoides*. Espécies-tipo: *Ceratopogon phlebotomus* Williston, pela designação original.

***Culicoides phlebotomus* (Williston)**

(Figuras 8, 13G)

*Culicoides phlebotomus* (Williston), 1896. (Ceratopogon). St. Vincent  
*amazonius* Macfie, 1935. Pará, Brasil.

**Identificação** – Fêmea: olhos contíguos a uma curta distância, nus. Antena com sensilas presente nos flagelômeros 1, 3–7; AR 1,19. Palpo com uma grande área sensorial irregular e aberta; PR 1,8–2,5. Mandíbula com 13–17 dentes. Pernas amarelo acastanhado, sem bandas distintas; pente tibial posterior com 6–8 espinhos. Asa como na figura 13G; 2° célula radial muito escura; mancha clara sobre a veia cruzada r–m; célula r<sub>3</sub> com quatro manchas claras, três manchas em um triângulo na área pós-estigmática; mancha clara presente no meio da veia M<sub>2</sub>; célula anal com uma mancha clara na porção distal e uma faixa clara perto da base; célula M<sub>2</sub> com uma mancha clara atrás da bifurcação medial e outra na frente da bifurcação médio-cubital; uma mancha clara situada a apenas distância do árculo basal e outra situada sobre a base médio-cubital; macrotríquias muito esparsa comprimento da asa 0,89–1,15; CR 0,53–0,58. Halter claro. Duas espermatecas ovais, desigual <sup>(35)</sup>.

**Distribuição** – Brasil (Pará, Ceará, Maranhão, Pernambuco, Goiás)

**Subgênero *Mataemyia* Vargas**

*Mataemyia* Vargas, 1960. Como subgênero de *Culicoides*. Espécies-tipo: *Culicoides mojingaensis* Wirth & Blanton, pela designação original.

***Culicoides aldomari* Felipe-Bauer & Trindade**

(Figuras 8, 13H)

*Culicoides aldomari* Felipe-Bauer & Trindade, 2013. Pará, Brasil.

**Identificação** – Fêmea: olhos separados por uma distância igual ao diâmetro de 1/2 omatídios. Flagelômeros 8 e 9 subiguais, sensilas coelocônicas nos flagelômeros 1, 6–8; AR 0,77–0,89; Palpo marrom; 3° segmento robusto, com fosseta sensorial profunda no comprimento médio;

PR 2.0–2.2. Mandíbula com 12–14 dentes. Asa como na figura 13H; asa menor dentro do subgênero *Mataemyia*; lúmen mais escuro da 2ª célula radial (lúmen claro nas outras espécies do subgênero); pequena mancha escura em  $r_3$ , localizada na extremidade distal da 2ª célula radial; macrotríquias escassa na metade distal da asa; comprimento da asa 0,80–0,88 mm; largura 0,40–0,43 mm; CR 0,60–0,62 (0,61, n = 10). Halter claro. Duas espermatecas ovais, ligeiramente desiguais ou às vezes subiguais <sup>(39)</sup>.

**Distribuição** – Brasil (Amazonas e Pará).

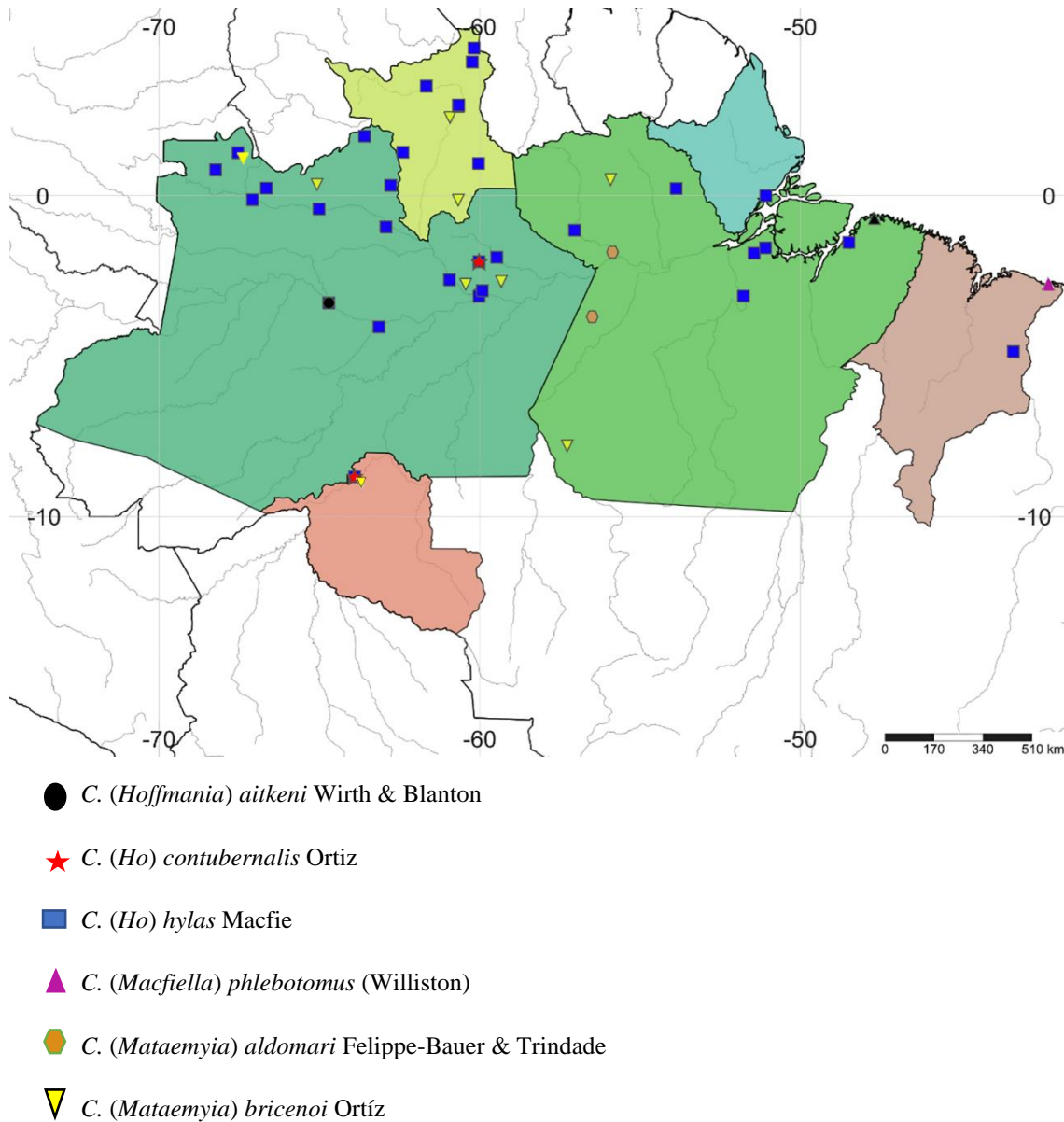
***Culicoides bricenoi* Ortíz**

(Figuras 8, 13I)

*Culicoides bricenoi* Ortíz, 1951. Venezuela.

**Identificação** – Fêmea: asa como na figura 13I; 2ª célula radial longa, duas vezes mais longa do que a primeira;  $r_3$  com duas grandes manchas claras, a 2ª localizada na porção distal da célula atingindo a margem da asa <sup>(39)</sup>.

**Distribuição** – Venezuela, Equador, Peru, Bolívia e Brasil (Amazonas, Pará, Rondônia e Roraima).



**Figura 8 (24).** Mapa da distribuição das espécies do gênero *Culicoides* na Amazônia brasileira (modificado após SimpleMappr, <http://www.simplemappr.net>).

### Grupo *fluvialis*

#### *Culicoides fluvialis* Macfie

(Figuras 9, 13J)

*Culicoides fluvialis* Macfie, 1940. Guyana.

**Identificação** – Fêmea: olhos estreitamente separados, nus. Antena com sensilas coelocônicas nos segmentos 1, 5–7; AR 1,05–1,11. Palpo com 3º segmento curto e ligeiramente inchado; PR



1,7–1,9, com uma fossa sensorial pequena e profunda. Mandíbula com 12–15 dentes. Asa como na figura 13J; 2ª célula radial moderadamente escura, célula r<sub>3</sub> com duas manchas claras pós-estigmáticas redondas, separadas, a posterior localizado atrás da 2ª célula radial; mancha clara distal em forma de ampulheta na margem da asa; ápices das veias M<sub>1</sub> e M<sub>2</sub> com uma pequena mancha clara na margem da asa; célula CuA<sub>1</sub> com uma mancha clara; comprimento da asa 0,73–0,79 mm. Pernas marrons; manchas nos joelhos enegrecidas; todos os fêmures com anéis claros subapicais e todas as tíbias com anéis claros estreitos sub-basais; os fêmures são claros nas bases. Halter claro. Duas espermatecas ovais, ligeiramente desiguais ou às vezes subiguais, com ductos esclerotizados longos <sup>(35)</sup>.

**Distribuição** - Honduras à Colômbia, Venezuela, Trinidad, Guiana e Brasil (Amazonas, Pará, Rondônia e Roraima).

**\**Culicoides leopoldoi* Ortíz**

(Figuras 9, 13K)

*Culicoides leopoldoi* Ortíz, 1951. Venezuela.

**Identificação** – Fêmea: olhos contíguos, nus. Antena com sensilas coelocônicas distais, presentes nos flagelômeros 1, 4–7; AR 1,12–1,26. Palpo com 3º segmento muito curto e inchado; fossa sensorial grande, rasa e irregular; PR 1,6–1,9. Mandíbula com 12–13 dentes. Asa conforme a figura 13K; uma mancha clara extensa na r–m; mancha clara presente atrás da 2ª célula radial; manchas clara pós-estigmáticas alinhadas longitudinalmente, uma posterior menor; mancha clara distal na célula r<sub>3</sub> grande, com extensão proximal estreita; macrotríquias escassas 1/3 distal da asa; comprimento da asa 0,74–0,96 mm; CR 0,59–0,64. Halter escuro. Uma espermateca piriforme <sup>(34,35)</sup>.

**Distribuição** – Guatemala e Belize para a Bolívia, nordeste da Argentina, Trinidad e Brasil (Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Bahia, Ceará, Maranhão, Pernambuco, Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de Janeiro).

\* **Novo registro** – Primeiro registro para os municípios de Óbidos e Oriximiná, Pará.

***Culicoides tetrathyris* Wirth & Blanton**

(Figuras 9, 13L)

*Culicoides tetrathyris* Wirth & Blanton, 1959. Panamá.

**Identificação** – Fêmea: olhos quase contíguos, nus. Antena com sensilas coelocônicas distais, presentes nos segmentos 1, 5–7; AR 1,04–1,14. Palpo com 3º segmento moderadamente inchado ao ápice; fossa sensorial moderadamente grande e profunda; RP 1,5–2,1. Mandíbula com 12–15 dentes. Asa como na figura; célula  $r_3$  com quatro manchas claras, pequenas, redondas, dispostas em um trapézio; duas manchas claras na célula  $m_1$  e na célula anal; apenas uma mancha clara na porção distal da célula  $m_2$ , uma mancha clara atrás do garfo medial e outro na frente do garfo mediocubital; extremidades das veias  $M_1$ ,  $M_2$  e  $CUA_1$  com mancha clara na margem da asa. Macrotríquias esparsadas  $\frac{1}{4}$  da asa; comprimento da asa 0,69–0,87; CR 0.70. Halter claro. Duas espermatecas subiguais <sup>(35)</sup>.

**Distribuição** – Honduras, Costa Rica, Panamá, Equador, Suriname, Trindade e Brasil (Acre, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima e Bahia).

**Grupo *leoni***

***Culicoides glabellus* Wirth & Blanton**

(Figuras 9, 13M)

*Culicoides glabellus* Wirth & Blanton, 1956. Panamá.

**Identificação** – Fêmea: olhos bem separados, com pêlos curtos interfacetais. Antena com sensilas coelocônicas distais presentes nos segmentos 1, 5–7; AR 0,88–0,95. Palpo com 3º segmento ligeiramente inchado, com pequenas e profundas fossa sensorial; PR 1,7–2,1. Mandíbula com 11–13 dentes. Asa como na figura 13M; ponto claro pós-estigmático na célula  $r_3$ , apenas raramente dividido de forma incompleta em dois pontos separados, estes localizados na mesma distância da base da asa; mancha clara no ápice da célula  $r_3$  grande e arredondada,

geralmente preenchendo a maior parte do espaço entre a margem anterior da asa e a veia  $M_1$ ; duas manchas claras na célula  $m_1$ ; apenas uma mancha clara em cada um dos ápices da célula  $m_2$  e da célula anal; manchas claras presentes na frente do garfo mediocubital e atrás do garfo medial; macrotríquias muito esparsa nos ápices extremos das células  $r_3$ ,  $m_1$  e  $m_2$ ; comprimento da asa 0,66–0,76 mm; CR 0,65. Halter claro. Uma espermateca <sup>(35)</sup>.

**Distribuição** – Honduras ao Panamá, Equador, Trindade e Brasil (Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima e Bahia).

### **Grupo *limai***

#### ***Culicoides limai* Barretto**

(Figuras 9, 13N)

*Culicoides limai* Barretto, 1944. São Paulo, Brasil.

**Identificação** – Fêmea: Olhos quase contíguos, nus. Antena com sensilas coelocônicas distais presentes nos segmentos 1, 4–7; AR 1,06. Palpo com 3º segmento consideravelmente inchado até o ápice, com fossa sensorial moderadamente larga e rasa; PR 1,7–1,8; mandíbula com 12–14 dentes. Asa como na figura 13N; muito semelhante a *C. galindoi*, mas com a mancha clara distal na célula  $r_3$  encurtada e arredondada distalmente, e se estendendo obliquamente para a margem anterior da asa, não seguindo veia  $M_1$  até a ponta da asa; macrotríquias esparsa no quarto distal da asa; Comprimento da asa 0,79–0,82; CR 0,63. Halter claro. Duas espermatecas ligeiramente desiguais <sup>(35)</sup>.

**Distribuição** – El Salvador ao Equador, nordeste Argentina e Brasil (Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e Santa Catarina).

### **Grupo *pachymerus***

#### ***Culicoides caprilesi* Fox**

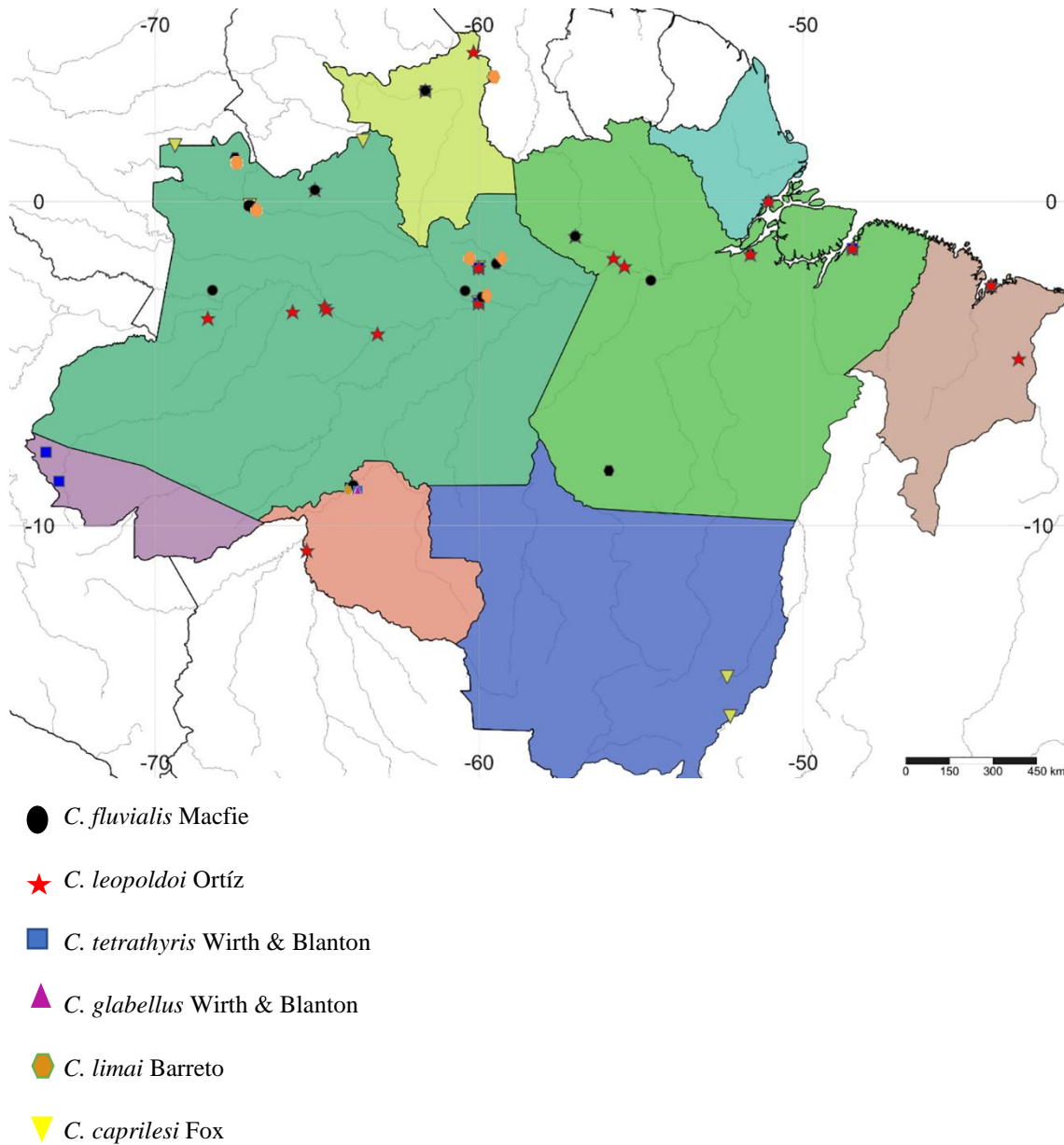
(Figuras 9, 13O)

*Culicoides caprilesi* Fox, 1952. Venezuela

*Culicoides kintzi* Wirth & Blanto, 1953. Panamá.

**Identificação** – Fêmea: olhos amplamente separados, nus. Antena com sensilas coelocônicas distais presentes nos segmentos 1, 5–7, às vezes ausentes em 5. AR 0,58–0,65. Palpo com 3º segmento ligeiramente inchado, com pequena fossa sensorial rasa; PR 1,6–2,3; mandíbulas com 16–17 dentes. Asa muito pilosa na qual o padrão de cor escura é mais extenso (Figura 13O); a marca escura se estendendo do base da 2ª célula radial quase até seu ápice e estendendo-se para a célula  $r_3$  como uma pequena mancha escura arredondada logo atrás da ponta da segunda célula radial; em alguns espécimes, a última mancha escura é estreitamente conectada para a próxima área escura distal; Comprimento da asa 0,73–0,98 mm; CR 0,7. Duas espermatecas subiguais (35).

**Distribuição** – Colômbia, Panamá, Venezuela e Brasil (Amazonas, Pará e Mato Grosso).



**Figura 9 (25).** Mapa da distribuição das espécies do gênero *Culicoides* na Amazônia brasileira (modificado após SimpleMappr, <http://www.simplemappr.net>).

### Grupo *reticulatus*

#### \**Culicoides amazonicus* Santarém, Felipe-Bauer & Trindade

(Figuras 10, 14A)

*Culicoides amazonicus* Santarém, Felipe-Bauer & Trindade, 2014. Pará, Brasil.

**Identificação** – Fêmea: olhos nus, estreitamente separados, menores que  $\frac{1}{2}$  omatídio. Pedicelo marrom, flagelômeros marrom-claros, os primeiros oito flagelômeros mais claros em  $\frac{1}{2}$

proximal; AR 0,98–1,04; sensilas coelocônicas em flagelômeros 1, 6–8, dois em 1, 6–7 e três em 8. Palpo com 3º segmento inchado, com fossa sensorial grande, rasa e oval no meio do segmento; PR 2,6–3,2. Probóscide longa; mandíbula com 24 dentes. Tórax com escudo com quatro manchas amareladas, medianas, dispostas anteriores como um trevo de folhas. Asa como na figura 14A; 2ª célula radial com mancha escura; mancha clara sobre r-m estendendo-se de M<sub>1</sub> até a margem costal, subdividida; r<sub>3</sub> com quatro manchas claras; m<sub>1</sub> com duas manchas claras; m<sub>2</sub> com quatro manchas claras; cua<sub>1</sub> com uma pequena mancha clara arredondada; célula anal com uma área clara basal tênue, uma mancha clara distal perto da bifurcação mediocubital e uma mancha muito clara alcançando a margem da asa, não presente em alguns espécimes; base da asa com uma mancha clara em M; veias M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> e CuA<sub>1</sub> claras no ápices; macrotríquias mal distribuída; comprimento da asa 0,87–0,95 mm; largura 0,42–0,47 mm; CR 0,62–0,66. Halter marrom lateralmente, haste claro. Duas espermatecas ovais desiguais, com ductos esclerotizados <sup>(40)</sup>.

**Distribuição** – Brasil (Amazonas e Pará)

**\*Novos Registros** – Novo registro para o estado do Amazonas (Presidente Figueiredo)

**\**Culicoides forattinii* Ortiz**

(Figuras 10, 14B)

*Culicoides forattinii* Ortiz, 1961. Venezuela

**Identificação** – Fêmea: AR 1.05-1.10. Mandíbula com 12 dentes. Asa como na figura 14B; r<sub>3</sub> com cinco manchas claras, uma distal alcançando a margem da asa; célula m<sub>1</sub> com duas manchas claras, a distal longe da margem da asa; Halter escuro.

**Distribuição** – Venezuela e Brasil (Amazonas, Roraima e Rondônia).

**\*Novos Registros** – Novo registro para o estado do Amazonas (Presidente Figueiredo).

***Culicoides hildebrandoi* Farias, Pereira Júnior, Felipe-Bauer, Pessoa, Medeiros & Santarém**

(Figuras 10, 14C)

*Culicoides hildebrandoi* Farias, Pereira Júnior, Felipe-Bauer, Pessoa, Medeiros & Santarém, 2016. Rondônia, Brasil

**Identificação** – Fêmea: olhos nus, separados por uma distância igual ao diâmetro de quase um omatídio. Pedicelo antenal marrom; flagelo marrom-claro, flagelômeros 1–8 claro em ½ proximal; AR 0,90–1,00; sensilas coelocônicas nos flagelômeros 1, 6–8. Palpo com 3º segmento cilíndrico, sem fossa sensorial, mas com sensilas espalhadas na cutícula superficial; PR 3,30–3,90. Escudo com duas manchas anteriores submedianas em forma de folha de trevo. Asa como na figura 14C; 2ª célula radial com mancha escura, r<sub>3</sub> com quatro manchas claras esparsamente distribuídas, r–m clara na veia cruzada; comprimento da asa 1,10–1,30 mm, largura 0,50–0,58 mm; CR 0,60–0,68. Fêmur posterior com banda clara subapical; Halter marrom, haste clara. Duas espermatecas ovais de tamanho subiguais, ductos esclerotizados delgados; terceira espermateca rudimentar delgada e alongada <sup>(41)</sup>.

**Distribuição** – Brasil (Amazonas e Rondônia).

**\**Culicoides kuripako* Felipe-Bauer**

(Figuras 10, 14D)

*Culicoides kuripako* Felipe-Bauer, 2010. Amazonas, Brasil.

**Identificação** – Fêmea: olhos nus, estreitamente separados por uma distância do diâmetro de ½ omatídio. Pedicelo castanho; flagelômeros castanho claros; sensilas coelocônicas nos flagelômeros 1, 5–8; AR 1,12–1,23. Palpo com uma fossa sensorial moderadamente profunda na porção distal do 3º segmento; RP 2,2–2,7. Mandíbula com 11–13 dentes. Apenas espécies do grupo de espécies *reticulatus* com escudo com padrão proeminente de manchas ovais amareladas. Asa como na figura 14D; mancha clara pós-estigmática na célula r<sub>3</sub> em forma de L

invertido, veias M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, CuA<sub>1</sub> claras, CuA<sub>2</sub> clara com ápice escuro ou inteiramente clara; comprimento da asa 0,89–1,05 mm; largura 0,43–0,48 mm; CR 0,60–0,62. Halter claro. Duas espermatecas ovais, desiguais, com ductos esclerotizados longos <sup>(42)</sup>.

**Distribuição** – Brasil (Amazonas, Pará e Rondônia).

**\*Novos Registros** – Novo registro para o estado do Pará (Itaituba)

**\**Culicoides lyrinotatus* Wirth & Blanton**

(Figuras 10, 14E)

*Culicoides lyrinotatus* Wirth & Blanton 1955. Panamá.

*Culicoides lyrinotatus* Wirth & Blanton 1959. Redescrição; Registros do Panamá.

**Identificação** – Fêmea: olhos estreitamente separados, nus. Flagelômeros com sensilas coelocônicas nos segmentos 1, 6–8; AR 1,01. Palpo com 3º segmento dilatado, com uma fossa sensorial muito ampla, rasa; RP 2.27. Mandíbula com 12 dentes. Asa como na figura 14E; r<sub>3</sub> com quatro manchas claras em a ½ proximal da célula; r–m cruzada, escura; m<sub>1</sub> com duas áreas claras, a distal longe da asa margem; CuA<sub>2</sub> com ápice claro; comprimento da as 1,17 mm. Halter infuscado. Duas espermatecas, piriformes, larga, subiguais, base dos dutos não esclerotizada <sup>(35)</sup>.

**Distribuição** – Nicarágua, Panamá e Brasil (Amazonas e Pará).

**\*Novos Registros** – Novo registro para o estado do Amazonas (Manaus)

**\**Culicoides macrostigma* Wirth & Blanton**

(Figuras 2A-H, 10, 14F)

*Culicoides macrostigma*. Panamá.

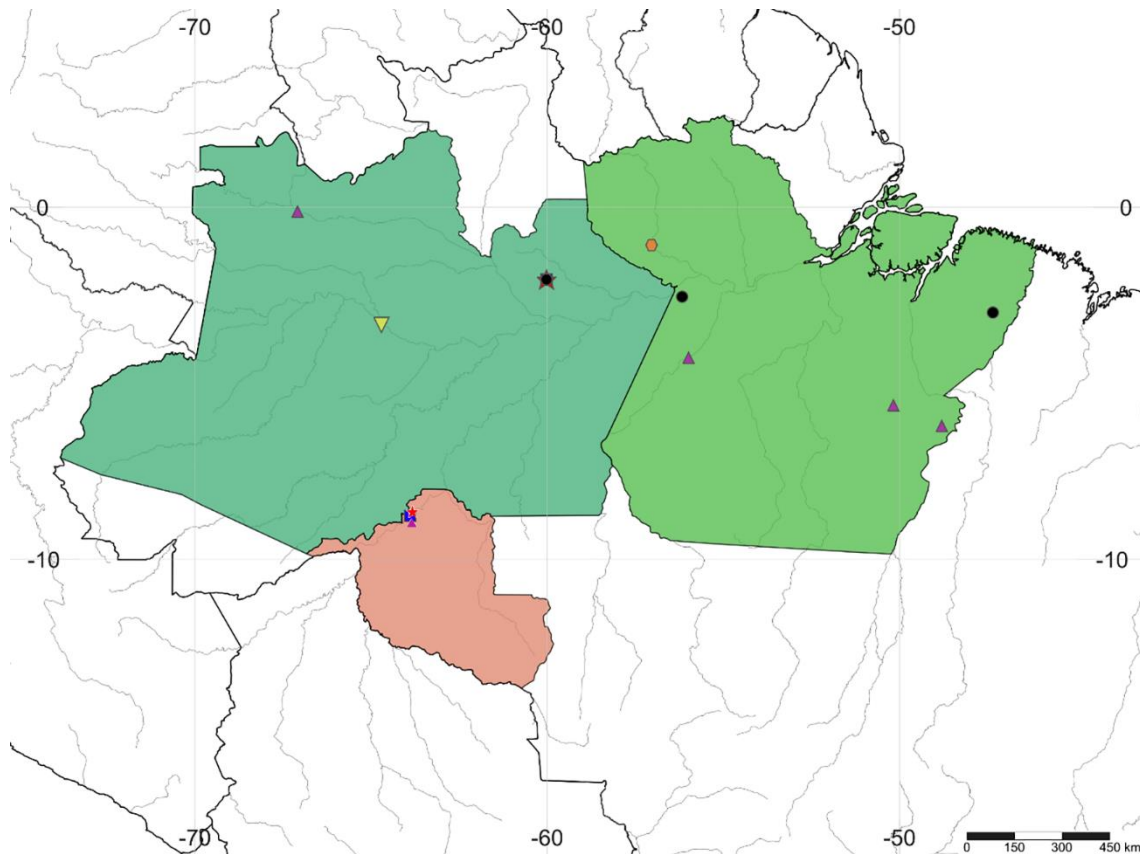
**Identificação** – Fêmea: olhos contíguos, nus. Antenas com sensilas coelocônicas distais nos segmentos 1 e 5–8; AR 1,97. Palpo com 3º segmento inchado; fossa sensorial profunda com poro menor. Mandíbula com 11 dentes. Mesonoto marrom-escuro, com padrão proeminente de manchas cinza pruinosa consistindo em um par de manchas submedianas alongadas, um par de



pequenas manchas umerais e dois pares de manchas arredondadas pontos laterais, um de cada lado da sutura lateral. Escutelo marrom no meio; pós-escutelo e pleura marrom-escuros. Fêmur posterior escuro. Asa como na figura 14F; esta espécie é muito distinta no comprimento da 2ª célula radial anterior e as duas manchas claras redondas longitudinalmente em linha atrás da célula  $r_3$ ;  $r_3$  com quatro manchas claras  $\frac{1}{2}$  proximal da célula; 2ª célula radial 2,5 x mais longa do que primeiro, com lúmen claro;  $m_1$  com duas manchas claras, a distal longe da margem da asa.; comprimento da asa 0,9–1,0 mm, largura 0,47 mm; CR 0,70. Halter claro (com mancha escura lateral e haste clara, na população do Amazonas). Duas espermatecas subiguais, piriformes <sup>(35,43)</sup> (Wirth e Blanton 1953, Santarém et al. 2015).

**Distribuição** – Costa Rica para Colômbia e Brasil (Amazonas).

**\*Novos Registros** – Novo registro para o Brasil (Tefé-Amazonas)



● *C. amazonicus* Santarém; Felipe - Bauer & Trindade

★ *C. forattinii* Ortiz

■ *C. hidelbrandoi* Farias, Pereira Júnior, Felipe-Bauer, et al.

▲ *C. kuripako* Felipe - Bauer; Damasceno; Trindade & Py-Daniel

◆ *C. lyrinotatus* Wirth & Blanton

▼ *C. macrostigma* Wirth & Blanton

**Figura 10 (26).** Mapa da distribuição das espécies do gênero *Culicoides* na Amazônia brasileira (modificado após SimpleMappr, <http://www.simplemappr.net>).

**\**Culicoides paucienfuscatus* Barbosa**

(Figuras 11, 14G)

*Culicoides paucienfuscatus* Barbosa, 1947. Amazonas, Brasil.

**Identificação** – Fêmea: olhos estreitamente separados, nus. Antena com sensilas coelocônicas nos flagelômeros 1, 5–8, raramente ausente no 5; AR 1,02–1,34. Palpo com 3º segmento moderadamente inchado, com fosseta sensorial moderadamente grande e profunda. Asa como

na figura 14G; com manchas claras interconectada;  $r_3$  com duas manchas claras, mancha clara pós-estigmática invertida em forma de L, isolando uma mancha escura ponto atrás da segunda célula radial;  $m_1$  com duas manchas claras, a distal alcançando a margem da asa;  $CuA_1$  claro e  $CuA_2$  escuro; comprimento da asa 0,84–1,16 m; CR 0,60–0,66. Halter castanho claro, amarelado. Duas espermatecas piriforme, levemente desiguais<sup>(43)</sup>.

**Distribuição** – Costa Rica para Peru, Venezuela, Trindade, Brasil (Acre, Amazonas, Goiás, Pará, Rondônia, Roraima, Maranhão) e Bolívia.

**\*Novos Registros** – Novo registro para o município de Presidente Figueiredo, Amazonas.

***Culicoides profundus* Santarém, Felipe-Bauer & Trindade**

(Figuras 11, 14H)

*Culicoides profundus* Santarém, Felipe-Bauer & Trindade, 2014. Pará, Brasil.

**Identificação** – Fêmea: olhos estreitamente separados, nus; menores que  $\frac{1}{2}$  omatídio. Pedicelo antenal marrom; flagelômeros marrom-claros, os primeiros oito flagelômeros mais claros em  $\frac{1}{2}$  proximal; sensilas coelocônicas nos flagelômeros 1, (5) 6–8; AR 1,02–1,18. Terceiro segmento do palpo inchado, com fossa sensorial grande e profundo na porção média, abrindo-se em um poro pequeno e arredondado, PR 1,8–2,4. Probóscide moderadamente longa, relação P/H 0,86–0,95; mandíbula com 16 dentes; escudo com quatro manchas medianas anteriores amareladas arranjado como um trevo de folhas. Asa como mostrado na figura 14H;  $r_3$  com quatro manchas claras,  $m_1$  com duas manchas claras, a distal longe da margem da asa; base da asa com uma mancha clara em M;  $M_1$ ,  $M_2$  e  $CuA_1$  com vértice clara; macrotríquias mal distribuída no terço distal da asa; comprimento da asa 0,82–0,97 mm; largura 0,40–0,50 mm; CR 0,60–0,67. Halter marrom no meio, em  $\frac{1}{2}$  distal em alguns espécimes, haste clara. Duas espermatecas ovais ligeiramente desiguais, com dutos esclerotizados<sup>(40,43)</sup>.

**Distribuição** – Distribuição: Brasil (Amazonas, Pará e Rondônia).

**\*Novos Registros** – Novo registro para o estado do Pará (Óbidos)

**\**Culicoides rhombus* Santarém, Felipe-Bauer & Castellón**

(Figuras 11, 14I)

*Culicoides rhombus* Santarém, Felipe-Bauer & Castellón in Santarém, 2014. Roraima, Brasil.

**Identificação** – Fêmea: esta espécie é facilmente distinguida pela seguinte combinação de caracteres: 3º segmento do palpo com fossa romboidal, com uma depressão sensorial irregular bem desenvolvida e rasa que atinge a porção distal extrema do segmento; PR 2,5–3,0. Olhos nus, estreitamente separados, menores que  $\frac{1}{2}$  omatídio. Pedicelo antenal marrom, flagelômeros marrom-claros, os primeiros oito flagelômeros mais claros em  $\frac{1}{2}$  proximal; AR 1,05–1,10; sensilas coelocônicas em flagelômeros 1, 6–8. Mandíbula com 23 dentes. Asa como na figura 14I; 2ª célula radial incluindo mancha escura; mancha clara sobre r–m estendendo-se de M<sub>1</sub> até a margem costal, subdividida; r<sub>3</sub> com quatro manchas claras pequenas e separadas; m<sub>1</sub> com dois pontos claros; m<sub>2</sub> com quatro manchas claras; cua<sub>1</sub> com uma mancha clara arredondada no meio da cela; célula anal com uma área clara basal fraca próxima à base e uma mancha clara distal próxima à bifurcação mediocubital; base da asa com uma mancha clara em M; veias M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> e CuA<sub>1</sub> com ápices claras; macrotríquias mal distribuída na parte distal terço da asa; comprimento da asa 0,85–0,97 mm; largura 0,40–0,45 mm; CR 0,64–0,66. Halter marrom, haste clara. Duas espermatecas ovais ligeiramente desiguais, com dutos esclerotizados <sup>(40)</sup>.

**Distribuição** – Brasil (Amazonas, Pará e Roraima).

**\*Novos Registros** – Novo registro para o estado do Pará (Óbidos)

***Subfamília Leptoconopinae* NOÉ, 1907**

**Gênero *Leptoconops* Skuse**

*Leptoconops* Skuse, 1889. Espécies-tipo: *Leptoconops stygius* Skuse. Por monotipo;

*Mycterotypus* Noè, 1905. Espécies-tipo; *Mycterotypus bezzii* Noè, designação de Carter, 1921;

*Protersesthes* Kieffer, 1921. Espécie-tipo; *Tersesthes brasiliensis* Lutz, 1913. Pela designação

original; *Tersesthes* Townsend, 1893, espécie tipo; *Tersesthes torrens* Townsend, pela designação original; *Schizoconops* Kieffer, 1918. Espécie tipo: *Schizoconops indicus* Kieffer.

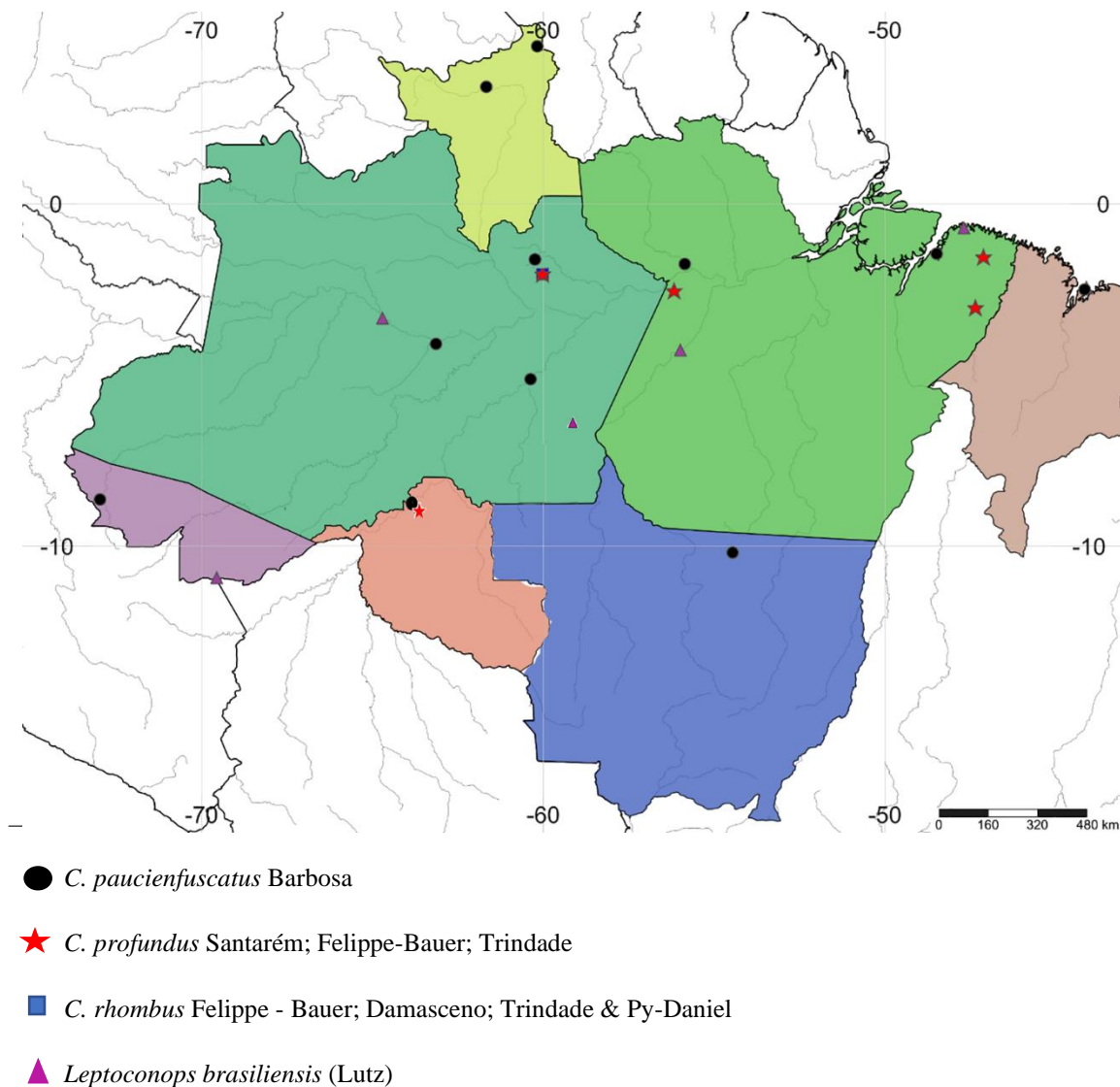
***Leptoconops brasiliensis* (Lutz)**

*brasiliensis* (Lutz), 1913. (*Tersesthes*). Amazonas, Brasil.

**Identificação** – Fêmea: cabeça marrom; vértice com 8 cerdas irregularmente alinhadas; fronte com um par de cerdas muito alinhadas; largura da cabeça dividido pelo comprimento da parte bucal 1,90–2,20. Olhos compostos nus, amplamente separados; separação aproximadamente de 8–10 omatídeo; facetas omatidiais de 0,31–0,38 da largura total da cabeça. Antena com escapo claro, pedicelo marrom-escuro; flagelômero marrom-escuro, com 12 segmentos; flagelômero apical alongado, cerca de 2,20–3,90 vezes mais longo que largo. Palpo com quatro segmentos palpais, ápices do 1º e 2º segmentos e base estreita do branco do 4º segmento, com um 3º segmento palpar subigual ao quarto, que apresenta um anel basal claro; palpo maxilar com 3º segmento ligeiramente inchado, com fosseta sensorial que ocupa de 1/3 a 2/4 de todo o comprimento da margem interna. Relação palpal 2,20–3,80. Mandíbula com 13–18 dentes. Asa branca leitosa como na figura; a maioria das veias distintas, longitudinalmente atingindo o margino da asa; crossvein r-m ausente e células radiais fundidas em estigma inchado; comprimento da asa 0,77–0,82. Razão costal 0,40–0,50. Halter claro com haste escura. Abdome com lamelas genitais longas e estreitas; 9º esterno com escavação oval e profunda, aparentemente formando braço para o gonóporo. Abertura do átrio mais largo que longo, delimitada por uma faixa pigmentada em forma de arco trilobado, apresentando e em sua parte central dois pares de cerdas muito fortes, individualmente implantadas em um mamilo proeminente. Duas espermatecas ovóides, subiguais (Capítulo III, Farias et al.).

**Distribuição** – Distribuição: Brasil (Acre, Amazonas e Pará).

**\*Novos Registros** – Novo registro para o estado do Maranhão (Raposa); novo registro para município de Itaituba, Pará.

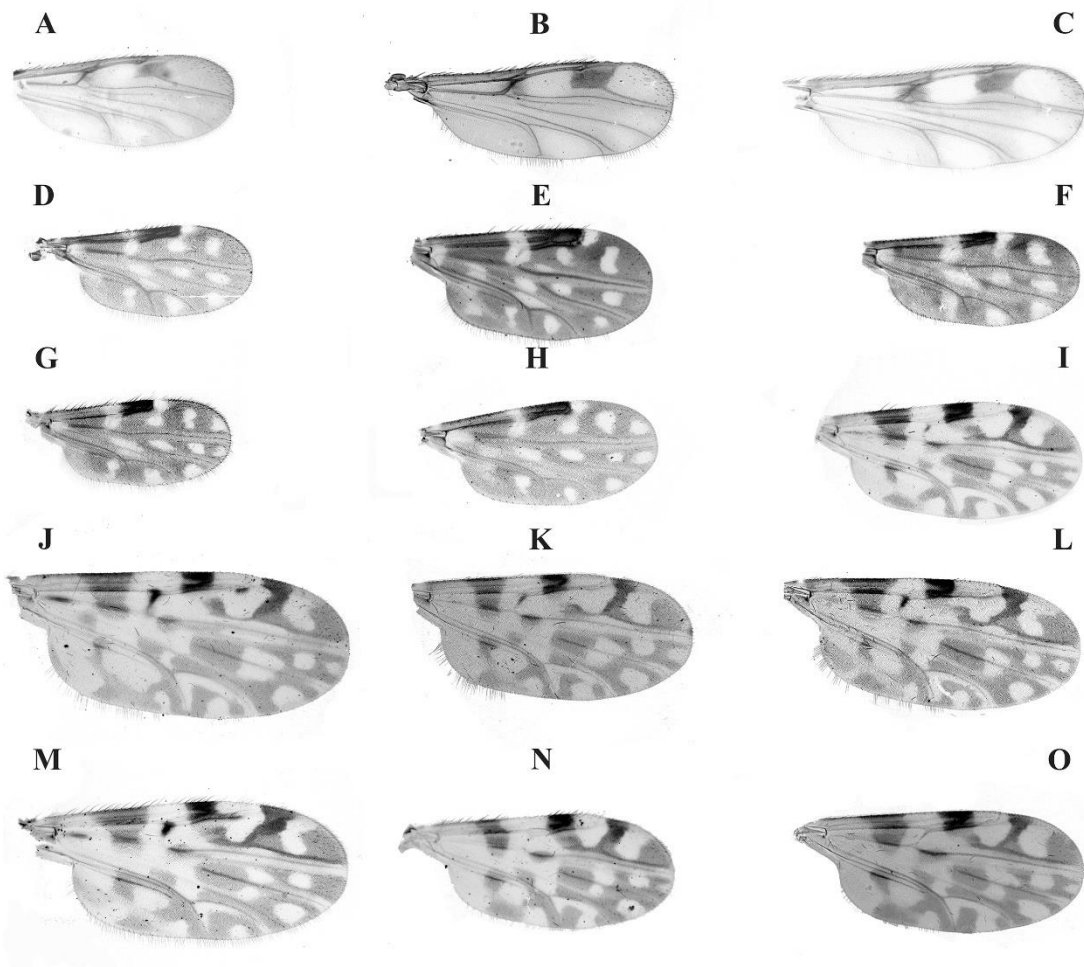


**Figura 11 (27).** Mapa da distribuição das espécies dos gêneros *Culicoides* e *Leptoconops* na Amazônia brasileira (modificado após SimpleMappr, <http://www.simplemappr.net>).

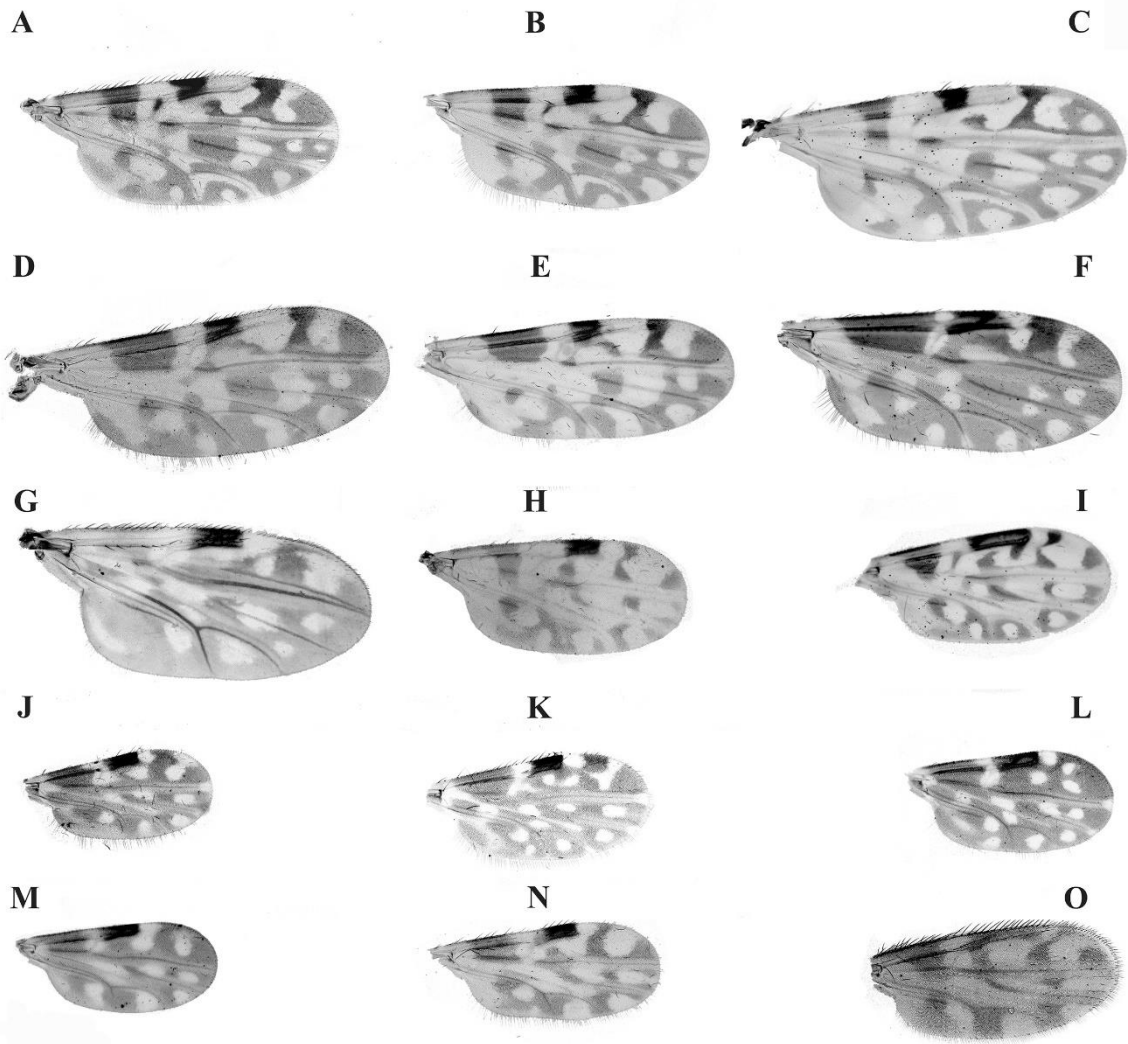
Variações morfológicas intraespecíficas foram evidenciadas no padrão de mancha das asas da população de *C. ruizi* do Pará (Figura 6 A-B) e que diferem do padrão das manchas das asas de *C. ruizi* do Amazonas (Figura 6 C-D), sendo que ambas apresentam a veia r-m levemente escura 1/3, diferente da descrição da espécie tipo que é totalmente clara.

Diferenças morfológicas intraespecíficas nos padrões de manchas das asas foram evidenciadas na população de *C. leopoldoi* do Amazonas (Figura 7 A-D), possui a segunda célula radial muito escura; mancha clara sobrea veia r-m extensiva, amplamente atingindo a

margem anterior da asa; célula  $r_3$  com quatro manchas claras, apresentando variação de padrão dentro da população, uma anterior pós-estigmática moderada em tamanho e separada de duas outras manchas pós-estigmáticas pequenas alinhadas longitudinalmente; mancha clara larga distal na célula  $r_3$  atingindo amplamente a margem da asa e tendo uma extensão estreita clara em direção proximal, apresentando variação de padrão dentro da população; mancha clara distal da célula  $m_1$  em alguns exemplares atinge a margem da asa; Veia  $CuA_2$  é escura em alguns exemplares.

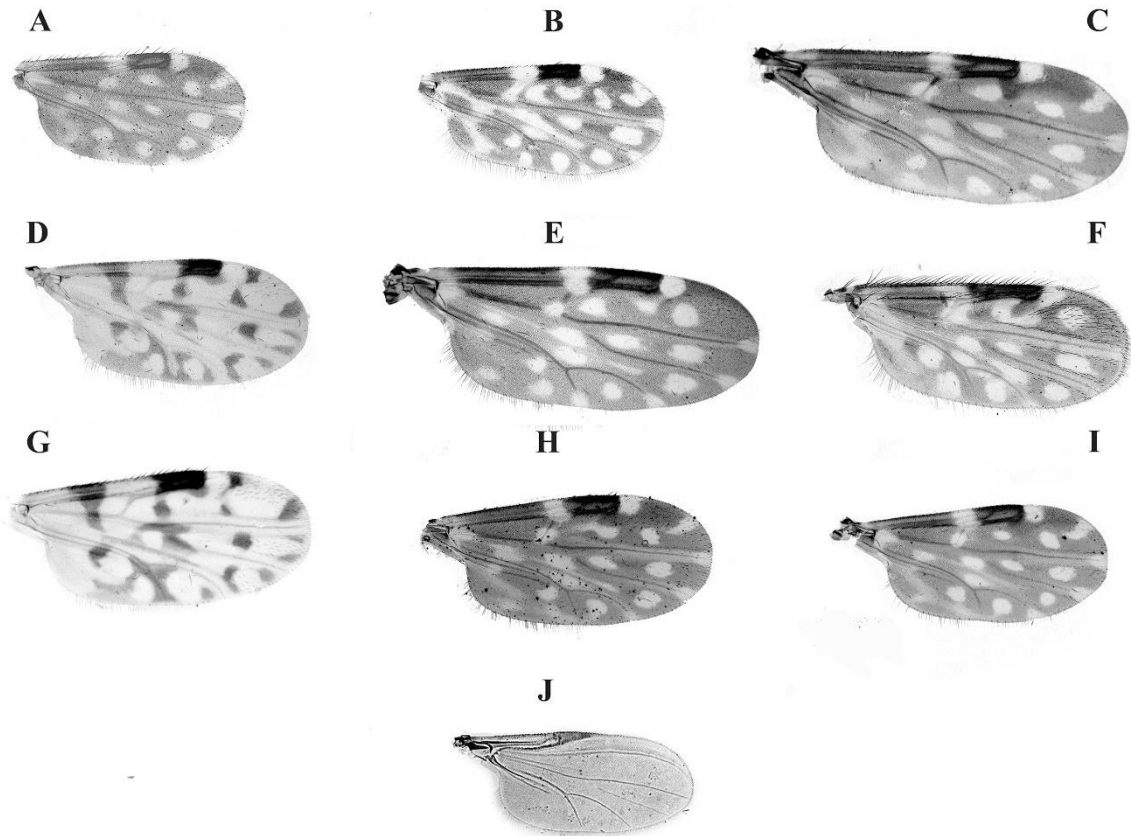


**Figura 12 (28).** Asa de fêmeas adultas de Ceratopogonidae. Gênero *Atrichopogon* - Subgênero *Atrichopogon* – **A.** *A. janseni* sp.nov; **B.** *A. riopardensis* sp.nov; **C.** *A. sergioluzi* sp.nov. Gênero *Culicoides* – Subgênero *Haematomyidium* - **D.** *C. debilipalpis*, **E.** *C. glabrior*; **F.** *C. jurutiensis*; **G.** *C. paraensis*; **H.** *C. quasiparaensis*. Gênero *Hoffmania* - **I.** *C. coutinhoi*; **J.** *C. foxi*; **K.** *C. fusipalpis*; **L.** *C. ignacioi*; **M.** *C. insignis*; **N.** *C. ocumarensis*; **O.** *C. paraignacioi*.



**Figura 13 (29).** Asa de fêmeas adultas de Ceratopogonidae. Gênero *Culicoides* – Gênero *Hoffmania* - **A.** *C. plaumanni*; **B.** *C. pseudodiabolics*; **C.** *C. ruizi*; **D.** *C. aitkeni*; **E.** *C. contubernalis*; **F.** *C. hylas*. Subgênero *Macfiella* – **G.** *C. phlebotomus*. Subgênero *Mataemyia* – **H.** *C. aldomari*; **I.** *C. bricenoi*. Grupo fluvial – **J.** *C. fluvialis*; **K.** *C. leopoldoi*; **L.** *C. tetrathyris*. Grupo *leoni* – **M.** *C. glabellus*. Grupo *limai* – **N.** *C. limai*. Grupo *pachymerus* – **O.** *C. caprilesi*.





**Figura 14 (30).** Asa de fêmeas adultas de Ceratopogonidae. Gênero *Culicoides* – Grupo *reticulatus* – **A.** *C. amazonicus*; **B.** *C. forattinii*; **C.** *C. hidelbrandoi*; **D.** *C. kuripako*; **E.** *C. lyrinotatus*; **F.** *C. macrostigma*; **G.** *C. paucienfuscatus*; **H.** *C. profundus*; **I.** *C. rhombus*. Gênero *Leptoconops* – Subgênero *Leptoconops* – **J.** *Leptoconops brasiliensis*.

Quando a identificação é baseada apenas na taxonomia tradicional, podemos ter dificuldades como identificação de espécies crípticas ou em espécies que apresentam grande plasticidade fenotípica resultando em uma identificação errônea. Nesse trabalho, evidenciamos variações morfológicas entre populações de algumas espécies, como *C. leopoldoi* e *C. ruizi* (Figuras 15 e 16).

Muitas espécies de maruins têm sido descritas e nomeadas com base em pequenas variações morfológicas e de morfometria linear. No entanto, algumas dessas espécies acabam sendo sinonimizadas. Recentemente, oito novas espécies foram descritas por apresentarem

variações nas fossas sensoriais presentes e ausentes nos palpos de espécies identificadas antes, como *C. reticulatus* Lutz<sup>(40,41)</sup>.

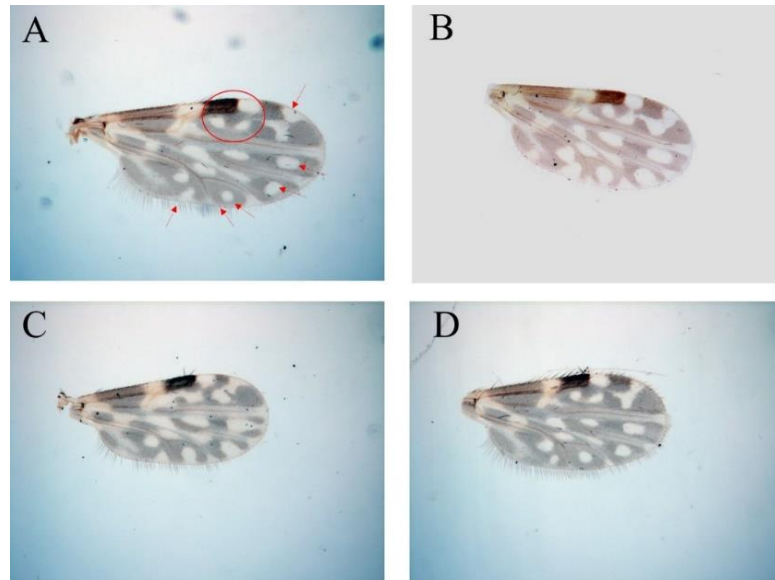


Figura 15 (31). **A-D.** Variações morfológicas em asas de fêmeas adultas de *Culicoides leopoldoi*. Setas e círculo em vermelho mostram onde ocorre as principais variações no padrão de mancha das asas.

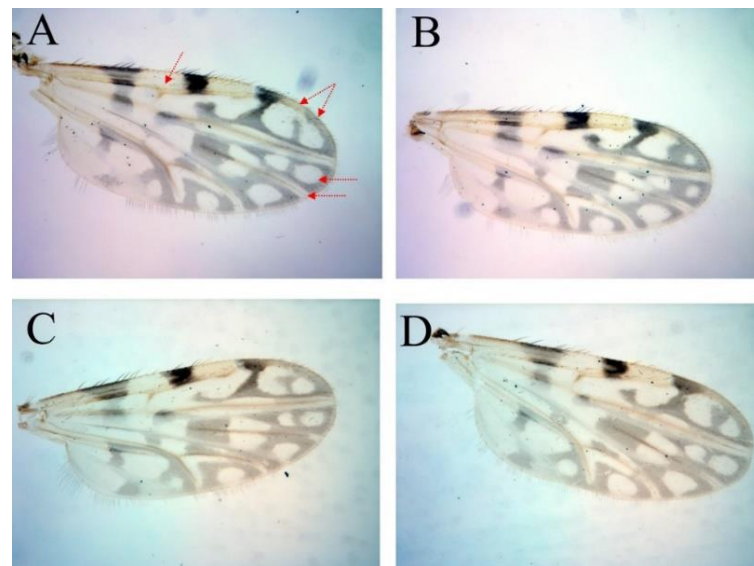


Figura 16 (32). Variações morfológicas em asas de fêmeas adultas de *Culicoides ruizi*. **A-B.** *C. ruizi*, população do Pará; **C-D.** *C. ruizi*, população do Amazonas. Setas vermelhas apontam onde ocorre as principais variações no padrão de mancha das asas.



**Figura 17 (33).** Locais de registro das 40 espécies de maruins, na Amazônia brasileira: **Acre** – 1 Rio das Minas, 2 Rio Azul, 3 Igarapé Romon, 4 Rio Juruá, 5 Assis Brasil, 6 Rio Branco, 7 Bela Vista; **Amazonas** – 0 Rio Içana, 1 Rio Xiê, 2 Río Içana, 3 São Gabriel da Cachoeira, 4 Br-307 perimetral, 5 Santa Isabel do Rio Negro, 6 Barcelos, 7 Demini, 8 Rio Toototobi, 9 Ilha de Juçara, 10 11 Coari, Tefé, 12 Rio Cuieiras, 13 Manacapuru, 14 Novo Airão, 15 Manaus, 16 Presidente Figueiredo, 17 Parintins, 18 Novo Aripuanã, 19 Rio Madeira, 20 Tabatinga, 21 Santo Antônio; **Pará** – 1 UHE - Cachoeira Porteira, 2 Oriximiná, 3 Óbidos, 4 Juriti, 5 Itaituba, 6 Mission Tiriyos, 7 Rio Parú do Oeste, 8 Projeto Alcoa, 9 Floresta nacional Caxiuanã, 10 Melgaço, 11 UHE - Cachoeira dos Espelhos, 12 Currelinho, 13 Outeiro, 14 Béliem, 15 Ourém, 16 Paragominas, 17 São Geraldo do Araguaia, 18 Rio Maruaru, 19 Rio Xingú, 20 Gurupá, 21 Rio Cururu; **Amapá** – 1 Macapá/IEPA; **Tocantins** – 1 Tocantinópolis; **Rondônia** – 1 Porto Velho, 2 Guajará-Mirim 3 Rio Pacaás, 4 Ji-Paraná; **Mato Grosso** – 1 Serra de Cachimbo, 2 Cuiabá, 3 Xavantina, 4 Barra das garças; **Roraima** – 1 Maloca Uiramutã, 2 Ilha Maracá, 3 Alto Alegre, 4 Maloca Ericó, 5 Maloca Wacuxi, 6 Maloca Socó, 7 Rorainópolis, 8 Mucajá, 9 Normandia, 10 São Luiz Anauá, 11 Baixo Catrimani.

#### 4. CONCLUSÃO

O estudo faunístico realizado em 12 municípios em cinco estados da Amazônia brasileira registrou espécie anteriormente desconhecido no estado do Amazonas (*C. amazonicus*, *C. forattinii*, *C. jurutiensis*, *C. lyrinotatus*), no estado do Pará (*C. rhombus* e *C. kuripako*) e Maranhão (*Leptoconops brasiliensis*), bem como, um novo registro de espécie do gênero *Culicoides* para o Brasil (*C. macrostigma*).

A diversidade do grupo de espécies com asas manchadas do gênero *Atrichopogon*, aumentou para 15 espécies, com o achado de três novas espécies: *A. janseni* sp nov.; *A. riopardensis* sp nov.; e *A. sergioluzi* sp nov.

Aqui, revisamos a distribuição das 40 espécies de ceratopogonídeos para a Amazônia brasileira. As espécies vetoras, *C. paraensis* e *C. insignis*, foram coletadas nesse estudo.

#### 5. REFERÊNCIAS

- 1- Borkent A, Dominiak P. Catalog of the Biting Midges of the World (Diptera: Ceratopogonidae). Zootaxa [Internet]. 2020 [citado em 13 de julho de 2021]; 4787(1):1–377. Disponível em: <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4787.1.1>
- 2- Santarém MC, Felipe-Bauer ML. Brazilian species of biting midges - espécies de maruins do Brasil (Diptera: Ceratopogonidae). 2021 [citado em 14 de julho de 2021]. Disponível em: [https://portal.fiocruz.br/sites/portal.fiocruz.br/files/documentos/brazilian\\_species\\_of\\_biting\\_midges\\_2021\\_0.pdf](https://portal.fiocruz.br/sites/portal.fiocruz.br/files/documentos/brazilian_species_of_biting_midges_2021_0.pdf)
- 3- Howard-Bury C, Mallory G. Mount Everest, the Reconnaissance 1921. London: Edward Arnold & Company; 1922. 356 p.
- 4- Borkent A, Spinelli GR. Neotropical Ceratopogonidae (Diptera: Insecta). In: Adis J, Arias JR, Rueda-Delgado G, Wantzen KM, editores. Aquatic biodiversity in Latin America. Moscow: Pensoft Publishers; 2007. 198 p.

- 5- Kuhn J, Andino P, Calvez R, Espinosa R, Hamerlik L, et al. Spatial variability in macroinvertebrate assemblages along and among neighbouring equatorial glacier-fed streams. *Freshw Biol* [Internet]. 2011 [citado em 14 de julho de 2021]; 56(11): 2226–2244. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2011.02648.x>
- 6- Tapia L, Sánchez T, Baylón M, Jara E, Arteaga C, et al. Invertebrados bentónicos como bioindicadores de calidad de agua en Lagunas Altoandinas del Perú. *Ecol Apl* [Internet]. 2018 [citado em 14 de julho de 2021]; 17(2):149–163. Disponível em: <https://doi.org/10.21704/rea.v17i2.1235>
- 7- Glendinning DR. Natural pollination of cocoa. *New Phytol* [Internet]. 1972 [citado em 14 de julho de 2021]; 71: 719–729. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1972.tb01284.x>
- 8- Szadziewski R, Gwizdalska-Kentzer M, Gilka W. Order Diptera, family Ceratopogonidae. *Arthropod fauna of the UAE*; 2011. 636–653 p.
- 9- Borkent A, Filho LCR. First record of female adult *Atrichopogon* Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae) biting in the Neotropical Region. *Proc Entomol Soc Wash*. 2006; 108(998): 1001.
- 10- Borkent A. The Biting Midges, the Ceratopogonidae. In: Marquardt WC, editor. *Biology of Disease Vectors: Second Edition*. Elsevier Academic Press. Burlington, San Diego, London; 2005. p. 113-126.
- 11- Stur E, Borkent A. When DNA barcoding and morphology mesh: Ceratopogonidae diversity in Finnmark, Norway. *ZooKeys* [Internet]. 2014 [citado em 14 de julho de 2021]; 463:95-131. Disponível em: <https://doi.org/10.3897/zookeys.463.7964>
- 12- Spinelli GR, Wirth WW. Los Ceratopogonidae de la Argentina (Insecta: Diptera). In: Castellanos ZA, editor. *Fauna de Agua Dulce de la Republica Argentina*. 1993. 38(3): 1-121.
- 13- Mullen GR, Hribar LJ. Biology and feeding behavior of Ceratopogonid larvae (Diptera: Ceratopogonidae) in North America. *Bull Soc Vector Ecol*. 1988; 13: 60-81.
- 14- Szadziewski R, Gilka W, Anthon H. Immature stages of two European species of the subgenus *Meloehalea* (Diptera: Ceratopogonidae), with keys to the European subgenera

- of *Atrichopogon*. *Insect Syst Evol* [Internet]. 1995 [citado em 14 de julho de 2021]; 26(2): 181–190. Disponível em: <http://doi.org/10.1163/187631295X00189>
- 15- Marino PI, Spinelli GR, Ferreira-Kepler R, Ronderos MM. Description of fourth instar larva and pupa of *Atrichopogon delpontei* Cavalieri and Chiossone (Diptera: Ceratopogonidae) from Brazilian Amazonia. *An Acad Bras Ciênc* [Internet]. 2017 [citado em 15 de julho de 2021]; 89(3): 2081–2094. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720150223>
- 16- Harrup LE, Bellis GA, Balenghien T, Garros C. *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) taxonomy: Current challenges and future directions. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2015 [citado em 15 de julho de 2021]; 30:249–266. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.12.018>
- 17- Felipe-Bauer ML, Cáceres AG, Silva CS, Valderrama-Bazan W, Gonzales-Perez A. Two new *Culicoides* of the *paraensis* species group (Diptera: Ceratopogonidae) from the Amazonian region of Peru. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2003 [citado em 15 de julho de 2021]; 98 (8): 1051-1058. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762003000800014>
- 18- Felipe-Bauer ML, Cáceres AG, Silva CS, Valderrama-Bazan W, Gonzáles-Perez A. A new *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) of the subgenus *Diphaomyia* from Peru. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2005 [citado em 15 de julho de 2021]; 100(1):51-53. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762005000100010>
- 19- Pagès N, Muñoz-Muñoz F, Talavera S, Sarton V, Lorca C, Núñez JI. Identification of cryptic species of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in the subgenus *Culicoides* and development of species-specific PCR assays based on Barcode regions. *Vet Parasitol* [Internet]. 2009 [citado em 15 de julho de 2021]; 165(3-4): 298-310. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.07.020>
- 20- Trindade RL, Gorayeb IS. Maruins (Ceratopogonidae: Diptera) do estuário do rio Pará e do litoral do Estado do Pará, Brasil. *Entomol Vectores* [Internet]. 2005 [citado em 15 de julho de 2021]; 12(1): 61-74. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0328-03812005000100005>
- 21- Pessoa FAC, Castellón-Bermúdez EG, Medeiros JF, Camargo LMA. First occurrence of the human biting midge *Leptoconops brasiliensis* (Lutz) (Diptera: Ceratopogonidae)

- in the triple border of Brazil, Peru, and Bolivia. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 2012 [citado em 15 de julho de 2021]; 45(1): 138–139. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0037-86822012000100030>
- 22- Farias ES, Pereira-Júnior AM, Almeida JF, Pessoa FAC, Medeiros JF. Hematophagous biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) from Tefé municipality, Amazonas state, Brazil. *Check List* [Internet]. 2015 [citado em 15 de julho de 2021]; 11(4):1676. Disponível em: <https://doi.org/10.15560/11.4.1676>
- 23- Wirth WW, Marston N. Method for mounting small insects on microscope slides in Canada balsam. *Ann Entomol Soc Am*. 1968; 61(3): 783–784.
- 24- Macfie JWS. A report on a collection of Brazilian Ceratopogonidae (Diptera). *Rev Entomol*. 1939;89: 137–219.
- 25- Macfie JWS. Notes on Ceratopogonidae. I. New species of *Forcipomyia* and *Atrichopogon* from the State of Chiapas, Mexico. *Proceedings of the Royal Entomological Society of London*. 1949; 18, 109–115.
- 26- Clastrier J. Deux Ceratopogonides nouveaux de la Guyane Francaise. *Archives de l’Institut Pasteur de la Guyane Francaise e de l’Inini*. 1968; 21: 85–92.
- 27- Clastrier J. Un nouvel *Atrichopogon* de la Guyane Francaise (Diptera: Ceratopogonidae). *Revue Française d’Entomologie*. 1979;1:30–32.
- 28- Clastrier J. *Atrichopogon ornatipennis*, n.sp., de la Guyane Francaise (Diptera: Ceratopogonidae). *Entomologiste*. 1987; 43: 271–274.
- 29- Cavalieri F, Chiossone IF. Notas sobre el género *Atrichopogon* Kieffer, 1906, de la Argentina (Diptera: Ceratopogonidae). II. Descripción de *Atrichopogon casali* sp. nov. *Physis*. 1973; 3284: 151–159.
- 30- Spinelli GR, Marino PI. A new Neotropical species of *Atrichopogon* Kieffer, and a redescription of *A. casali* Cavalieri & Chiossone (Diptera: Ceratopogonidae). *Stud Neotrop Fauna Environ* [Internet]. 2007 [citado em 15 de julho de 2021]; 42(3): 203–209. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/01650520601136912>
- 31- Borkent A, Picado A. Distinctive new species of *Atrichopogon* Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae) from Costa Rica. *Zootaxa* [Internet]. 2004 [citado em 16 de julho de 2021]; 637:1–68. Disponível em: <https://doi.org/10.11646/zootaxa.637.1.1>

- 32- Felipe-Bauer ML, Silva TN, Alves JRC. Two new species of *Atrichopogon* Kieffer from Rio de Janeiro, Brazil (Diptera: Ceratopogonidae). *Zootaxa* [Internet]. 2012 [citado em 16 de julho de 2021]. Disponível em: <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3566.1.4>
- 33- Felipe-Bauer ML. Two new species of *Atrichopogon* Kieffer from Acre State, Brazil (Diptera: Ceratopogonidae). *Zootaxa* [Internet]. 2018 [citado em 16 de julho de 2021]. Disponível em: <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4532.2.5>
- 34- Spinelli GR, Ronderos MM. Ceratopogonidae (Formas hematófagas) Artrópodos. In: Salomón. Artrópodos de interés médico en Argentina. Buenos Aires: Fundación Mundo Sano, 2005. p. 61 – 66.
- 35- Wirth WW, Blanton FS. Biting midges of the genus *Culicoides* from Panama (Diptera: Heleidae). *Proc. U. S. Natl. Mus* [Internet]. 1959 [citado em 16 de julho de 2021]; 109(3415): 237-482. Disponível em: <https://doi.org/10.5479/si.00963801.109-3415.237>
- 36- Trindade RL, Felipe-Bauer ML. Two new biting midges from Pará, Brazil (Diptera: Ceratopogonidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2011 [citado em 16 de julho de 2021]; 106(1): 61-64. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000100010>
- 37- Felipe-Bauer ML, Damasceno CP, Py-Daniel V, Spinelli GR. *Culicoides baniwa* sp.nov. from the Brazilian Amazon Region with a synopsis of the *hylas* species group (Diptera: Ceratopogonidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2009 [citado em 16 de julho de 2021]; 104(6): 851-857. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000600005>
- 38- Spinelli GR, Wirth WW. Los Ceratopogonidae de la Argentina (Insecta: Diptera). In: Castellanos ZA. Fauna de Agua Dulce de la Republica Argentina. 1993; 38(3): 1-121.
- 39- Felipe-Bauer ML, Silva TN, Trindade RL. New *Culicoides* Latreille of the subgenus *Mataemyia* Vargas from Pará, Brazil (Diptera: Ceratopogonidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2013 [citado em 16 de julho de 2021]; 108(1): 54-58. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762013000100009>
- 40- Santarém MCA, Trindade RL, Silva TN, Castellón EG, Mello-Patiu CA, FelipeBauer ML. New Neotropical *Culicoides* and redescription of *Culicoides reticulatus* Lutz



- (Diptera: Ceratopogonidae). Zootaxa [Internet]. 2014 [citado em 16 de julho de 2021]; 3795: 255-274. Disponível em: <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3795.3.2>
- 41- Farias ES, Almeida JF, Pessoa FAC. List of *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) from the state of Amazonas, Brazil, including new records. Check List [Internet]. 2016 [citado em 16 de julho de 2021]; 12(6): 1-27. Disponível em: <https://doi.org/10.15560/12.6.2002>
- 42- Felipe-Bauer ML, Damasceno CP, Trindade RL, Py-Daniel V. A new *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) of the *Reticulatus* species group from Brazilian Amazon Region. Mem Inst Oswaldo Cruz [Internet]. [citado em 16 de julho de 2021]; 105(7): 863-865. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762010000700004>
- 43- Santarém MCA, Farias ES, Felipe-Bauer ML. *Culicoides castelloni* sp. nov. from the Brazilian Amazon Region with a revision of the *reticulatus* species group (Diptera, Ceratopogonidae). An Acad Bras Ciênc [Internet]. 2015 [citado em 16 de julho de 2021]; 87(2): 955-972. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0001-3765201520140517>

## CAPÍTULO II

### ***Leptoconops brasiliensis* (DIPTERA: CERATOPOGONIDAE): TAXONOMIA INTEGRADA DE POPULAÇÕES DA REGIÃO AMAZÔNICA BRASILEIRA, E DESCRIÇÃO DO MACHO E REDESCRIÇÃO DA FÊMEA**

Emanuelle de Sousa Farias<sup>1,2</sup>, Jokebede Melynda dos Santos Paulino-Rosa<sup>1,3</sup>, Jordam William Pereira-Silva<sup>1,4,5</sup>, Sanmya Silva dos Santos<sup>1,6</sup>, Ana Carolina Vicente<sup>7</sup>, Claudia María Ríos-Velásquez<sup>1</sup>, Felipe Arley Costa Pessoa<sup>1</sup>

1. Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ. Laboratório de Ecologia e Doenças Transmissíveis na Amazônia, Manaus, Amazonas, Brasil.
2. Instituto Oswaldo Cruz-IOC/FIOCRUZ. Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.
3. Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Interação Patógeno Hospedeiro, Manaus, Amazonas, Brasil.
4. Universidade do Estado do Amazonas, Escola Superior de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Manaus, AM, Brasil.
5. Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Departamento de Ensino e Pesquisa, Manaus, AM, Brasil.
6. Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ. Programa de Bolsa de Iniciação Científica – PIBIC/CNPq
7. Instituto Oswaldo Cruz – IOC. Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos

#### **Autor correspondente**

Correspondente para Emanuelle de Sousa Farias, Instituto Leônidas e Maria Deane - FIOCRUZ Amazônia, Laboratório de Ecologia e Doenças Transmissíveis na Amazônia, Rua Terezina, 476, Adrianópolis, Manaus, Amazonas, CEP 69.057-070, Brasil. Telefone (92) 984125634. E-mail: emanuellefarias82@gmail.com

## RESUMO

A família Ceratopogonidae é composta de pequenos dípteros Culicomorpha de alta diversidade. O gênero *Leptoconops* Skuse é diurno, encontrado em várias partes do mundo, é hematófago de vertebrados, incluindo o homem. Além, do incomodo e reações alérgicas às picadas, algumas espécies são apontadas como vetores de filária *Mansonella ozzardi*. A sistemática do gênero *Leptoconops* pode ser difícil, principalmente quando variações morfológicas são encontradas em populações coletadas em diferentes localidades e ecótipos. A Morfometria Geométrica (MG) torna possível identificar variações morfológicas dentro e entre as populações. Para o gênero *Leptoconops*, existem 12 espécies na região neotropical, ocorrendo duas no Brasil: as espécies *L. (Holoconops) knowtoni* Clastrier & Wirth registrada no Estado de Santa Catarina e *L. (Leptoconops) brasiliensis* Lutz, com registros no Pará, Acre e Amazonas. Esse estudo visou comparar populações de *L. brasiliensis* de diferentes localidades na Amazônia, utilizando morfometria geométrica e DNA Barcode; descrever o macho de *L. brasiliensis*, bem como redescrição (taxonômica) da fêmea. A MG foi realizada comparando as três populações de *L. brasiliensis* para os componentes tamanho e forma. A análise MG mostrou diferença significativa intrapopulacional e interpopulacional, podendo indicar a presença de espécies crípticas ou a existência de um complexo de espécies. A MG comparando as três populações de *L. brasiliensis* apontou as populações de Humaitá e Itaituba como as mais semelhantes e a população de Marapanim como a mais divergente em relação as outras duas, sendo que a análise de componentes principais mostra que populações de *L. brasiliensis* de Humaitá e Itaituba se sobrepõem, em parte, no morfoespaço. Todas as comparações pareadas entre as populações, a ANOVA, exibiu disparidade métrica significativa ( $p < 0,05$ ), exceção, o teste de Tukey para o tamanho do centroide, que não apresentou diferença significativa entre as populações de *L. brasiliensis* população de Marapanim e Itaituba. O macho de *L. brasiliensis* foi coletado no Município de Marapanim e descrito neste trabalho, assim como, a redescrição da fêmea. A análise de distância genética feita com DNA Barcode foram congruentes com os resultados de MG de asa, para as populações de *L. brasiliensis* de Itaituba e Marapanim, onde a análise de variável canônica formou um claro agrupamento, e a distância genética entre as duas populações foi de aproximadamente 6%. As populações de Itaituba e Marapanim estão distantes geneticamente da amostra do Acre (aproximadamente 18%). Um número maior de amostras sequenciadas e uso de outros marcadores moleculares poderão contribuir e esclarecer a existência de espécies crípticas nas populações estudadas, e confirmar a presença de novas espécies, como consequência de processos como dispersão e/ou vicariância, surgidos pelas distâncias geográficas. Os *L. brasiliensis* de Humaitá e Itaituba foram coletados próximos a

grandes rios como rio Madeira e rio Tapajós, respectivamente. Esses rios, entre vários outros, contribuíram para a formação do eixo Solimões-Amazonas, tornando-o o maior rio em extensão e volume de água do planeta. A única sequência de *L. brasiliensis* do Acre, é proveniente do rio Acre. A população *L. brasiliensis* de Marapanim foi coletado em área costeira, banhada pelo Oceano Atlântico.

**Palavras – Chave:** Maruim, Culicomorpha, hematófagos.

## 1. INTRODUÇÃO

A família Ceratopogonidae é composta de pequenos dípteros Culicomorpha com uma diversidade grande de maruins. O gênero *Leptoconops* Skuse é diurno encontrado em várias partes do mundo, são hematófagos de aves, répteis, anfíbios e mamíferos, inclusive humanos <sup>(1, 2)</sup>.

Para o gênero *Leptoconops*, existem 12 espécies na região neotropical distribuídos em quatro subgêneros: *Brachyconops*, *Holoconops*, *Leptoconops*, *Megaconops*. Sendo, apenas as espécies *L. (Holoconops) knowtoni* Clastrier & Wirth registrada no Estado de Santa Catarina e *L. (Leptoconops) brasiliensis* Lutz, localização do tipo (baixo Rio Tocantins) no Pará, com registros também nos estados do Acre e Amazonas <sup>(3-7)</sup>.

O gênero *Leptoconops* é conhecido em várias partes do mundo devido suas picadas incômodas durante o dia que podem causar lesões graves, especialmente quando estão presentes em grande número <sup>(8,9)</sup>. Além dos efeitos de suas picadas, as espécies *L. becquaerti* (Kieff.) e *L. laurae* (Weiss) são vetores de filária *Mansonella ozzardi* (Manson) e em infecções experimentais, fêmeas de *L. becquaerti* foram capazes de manter o desenvolvimento completo de *M. ozzardi* <sup>(10)</sup>. No Brasil, a importância médica de *L. brasiliensis* é desconhecida <sup>(5,6)</sup>. O fato de *L. brasiliensis* ter sido coletado em uma área endêmica de mansonelose, significa que deve ser mais estudado <sup>(6)</sup>.

A sistemática do gênero *Leptoconops* baseia-se em caracteres morfológicos, que provavelmente pode ser dificultada quando encontram-se variações morfológicas em populações coletadas em diferentes localidades e ecótipos. *Leptoconops* são caracterizados por: asas hialinas, veia cruzada r-m ausente, fêmea com células radiais fundidas em estigma inchado; olhos amplamente separados, fronte desenvolvida, antena com 13 flagelômeros no macho e 11-12 nas fêmeas, flagelômero apical alongado, palpos com segmentos 4 e 5 fundidos, cerco anal é grande, alongado e coniforme nas fêmeas (exceto o subgênero *Brachyconops* Wirth & Atchley); gonóstilo masculino com uma cavilha apical (*Leptoconops*)<sup>(1)</sup>. A taxonomia de *Leptoconops*, devido ao seu tamanho diminuto, similaridades entre as fêmeas, pode causar algumas dúvidas, e por vezes, a identificação a nível específico só é possível com os machos, gerando complexos de espécies<sup>(11)</sup>.

O uso de novas técnicas taxonômicas é de suma importância para elucidar problemas de identificação que a morfologia e morfometria linear não podem resolver sozinhas<sup>(12)</sup>. A taxonomia integrada que agrega caracteres morfológicos, morfométricos e genéticos, em diversas famílias de dípteros, inclusive vetores, têm sido importantes para elucidar diversidade biológica oculta, exemplos em: Simulídeos<sup>(13)</sup>, *Anopheles*<sup>(14)</sup>, *Culicoides*<sup>(15,16)</sup>, flebotomíneos<sup>(17,18)</sup> e *Aedes*<sup>(19)</sup>.

A Morfometria Geométrica (MG) torna possível a identificação de variações morfológicas e permite explorar suas causas dentro e entre as populações<sup>(20)</sup>. É uma ferramenta taxonômica usada para identificar novas espécies, além de poder ajudar em investigações sobre os limites taxonômicos de uma espécie<sup>(21)</sup>. As principais vantagens da utilização dessa técnica são a velocidade da coleta de material de teste, pois, várias imagens podem ser digitalizadas e analisadas de forma rápida, o baixo custo do processo e o fato de que o material pode ser obtido tanto de exemplares secos quanto frescos<sup>(22)</sup>.

A MG analisa a variação da forma das estruturas, retirando o efeito do tamanho, orientação e posição. A análise se baseia no uso de coordenadas cartesianas de pontos anatômicos e métodos de superposição (Análise Generalizada de Procrustes-AGP) <sup>(12)</sup>. Os pontos anatômicos (PARs ou Landmarks) de diferentes espécimes são sobrepostos por AGP, permitindo extrair o tamanho centroide, e, dessa forma, analisando separadamente a forma e o tamanho <sup>(21)</sup>.

A MG, somada a análises multivariadas, é capaz de distinguir espécies e delimitar populações da mesma espécie ou reconhecer espécies crípticas em populações simpátricas ou alopátricas <sup>(21,23,24)</sup>. Para isso, a forma de asa tem sido usada com sucesso em diferentes grupos de dípteros e outros insetos para discriminar populações geograficamente distantes ou espécies ou subespécies intimamente relacionadas <sup>(24)</sup>. A ocorrência de diferenciação, especiação e vicariância devido a fatores geográficos, hipótese de isolamento e adaptação tem sido estudada em diversos grupos.

O DNA Barcode é definido como o uso de sequências padronizadas curtas para identificar espécimes em espécies <sup>(25)</sup>. Segundo Stur e Borkent <sup>(26)</sup> o DNA Barcode é usado para analisar os limites das espécies por meio de comparações genéticas entre táxons semelhantes e fornece um conjunto de dados com objetivo a ser usado na definição das espécies, além da morfologia, ecologia e outras características específicas das espécies. O uso do DNA Barcode em Ceratopogonidae foi restrito a interpretar os membros importantes do ponto de vista médico e veterinário de *Culicoides* <sup>(26)</sup>.

Hipóteses biogeográficas podem explicar a diversificação das espécies na Amazônia. Wallace <sup>(27)</sup>, baseado em observações taxonômicas de primatas ao longo da Amazônia, sugeriu que os rios amazônicos servem como barreiras geográficas que diminuem consideravelmente o fluxo gênico entre populações. Essa hipótese também foi aceita para explicar a diversificação de aves <sup>(28)</sup>.

Freitas et al. <sup>(29)</sup> apontam que as populações de *Lutzomyia umbratilis* Ward & Fraiha (Psychodidae) das regiões Norte e Nordeste são separadas por distâncias e barreiras abióticas significativas o suficiente para sugerir que esses indivíduos podem ter evoluído para populações geneticamente diferenciadas. As populações de *L. brasiliensis* estudadas aqui, têm sido encontradas próximas a rios e regiões costeiras, sendo separadas por grandes distâncias, também ocorrem em áreas endêmicas de mansonelose, e são altamente antropofílicas <sup>(3,4)</sup>. Como resultado de seus habitats larvais nas praias, várias espécies tropicais de *Leptoconops* foram mencionadas como um problema significativo para a indústria do turismo no Caribe <sup>(30)</sup>, bem como, para moradores na área do estudo (comunicação pessoal).

Esse estudo objetivou comparar populações de *L. brasiliensis* de diferentes localidades na Amazônia, utilizando morfometria geométrica e DNA Barcode; descrever o macho de *L. brasiliensis*, bem como redescrção da fêmea.

## **2. METODOLOGIA**

### **2.1 Dados de coletas**

As amostras foram capturadas com armadilha malaise e puçá em enxameamentos, em beira dos rios, em praias de areia branca. Para estudos morfológicos e de MG, as populações foram provenientes de três pontos de coleta (Figura 1): ponto-1, *Leptoconops brasiliensis* - população de Marapanim-PA, coletados no mês de janeiro de 2019; ponto-2, *L. brasiliensis* - população de Humaitá-AM, coletados no mês de setembro de 2019; e ponto-3, *L. brasiliensis* - população de Itaituba-PA, coletados no mês de janeiro de 2018.

O ponto de coleta 1 (um) foi no município de Marapanim, distrito Marudá, praia de Crispim, há 173 km de Belém-Pará, acesso pela BR 316, limita-se ao norte pelo oceano

Atlântico (00°43'03"S 47°41'59"W). A região litorânea é datada da época do Holoceno, possuindo vales fluviais parcialmente submersos, latossolo amarelo, solos aluviais e solos de mangue <sup>(31)</sup>. As precipitações pluviométricas variam em torno de 2.500 a 3.000 mm até inferiores a 60 mm, na estação seca, respectivamente <sup>(32)</sup>. As temperaturas são altas, sendo a média anual em torno de 27,7° C <sup>(33)</sup>. A umidade relativa do ar situa-se entre 80-85% (média anual), associada ao regime de chuvas <sup>(34)</sup>, com altitude média de 3 m ao nível do mar <sup>(35)</sup>.

O ponto de coleta 2 foi no município de Humaitá, ao sul do Estado do Amazonas à margem esquerda do Rio Madeira, afluente da margem direita do Rio Amazonas, distante cerca de 200 km de Porto Velho e 580 km de Manaus (linha reta) pela Rodovia BR-319 e está situado na zona fisiográfica do Rio Madeira <sup>(36)</sup>, no “Arco Norte Amazônico”. A região possui paleovárzea relativamente jovem depositada pelo rio Amazonas/Solimões, com idade entre 7.000 e 27.000 anos <sup>(37,38)</sup>. Possui grandes quantidades de liteiras e raízes finas no solo podzólicos da calha norte do rio Amazonas, característico da região, além de siltoso, o solo é principalmente tipo Laterita Hidromórfica e nos terraços e nas planícies fluviais ocorrem solos hidromórficos Gleyzados e aluviais Eutróficos ou Álicos <sup>(39)</sup>. As precipitações pluviométricas ficam em torno de 2.250 a 2.750 mm, as temperaturas variam entre 24°C a 26°C, a umidade relativa do ar varia de 85 a 90%, altitude média é de 90 metros acima do nível do mar <sup>(40)</sup>.

O ponto de coleta 3 foi no município Itaituba, comunidade Pedra Branca, localizado no sudoeste do Estado do Pará, há 889 km de Belém, capital do Pará e 467 km de Manaus, capital do Amazonas (04°16'34"S 55°59'01"W). As precipitações pluviométricas ficam em torno de 75 a 295 mm. As temperaturas médias anuais oscilando de 24° C a 26° C, umidade relativa do ar média é de 80% <sup>(41)</sup>, situada a 18 m de altitude.



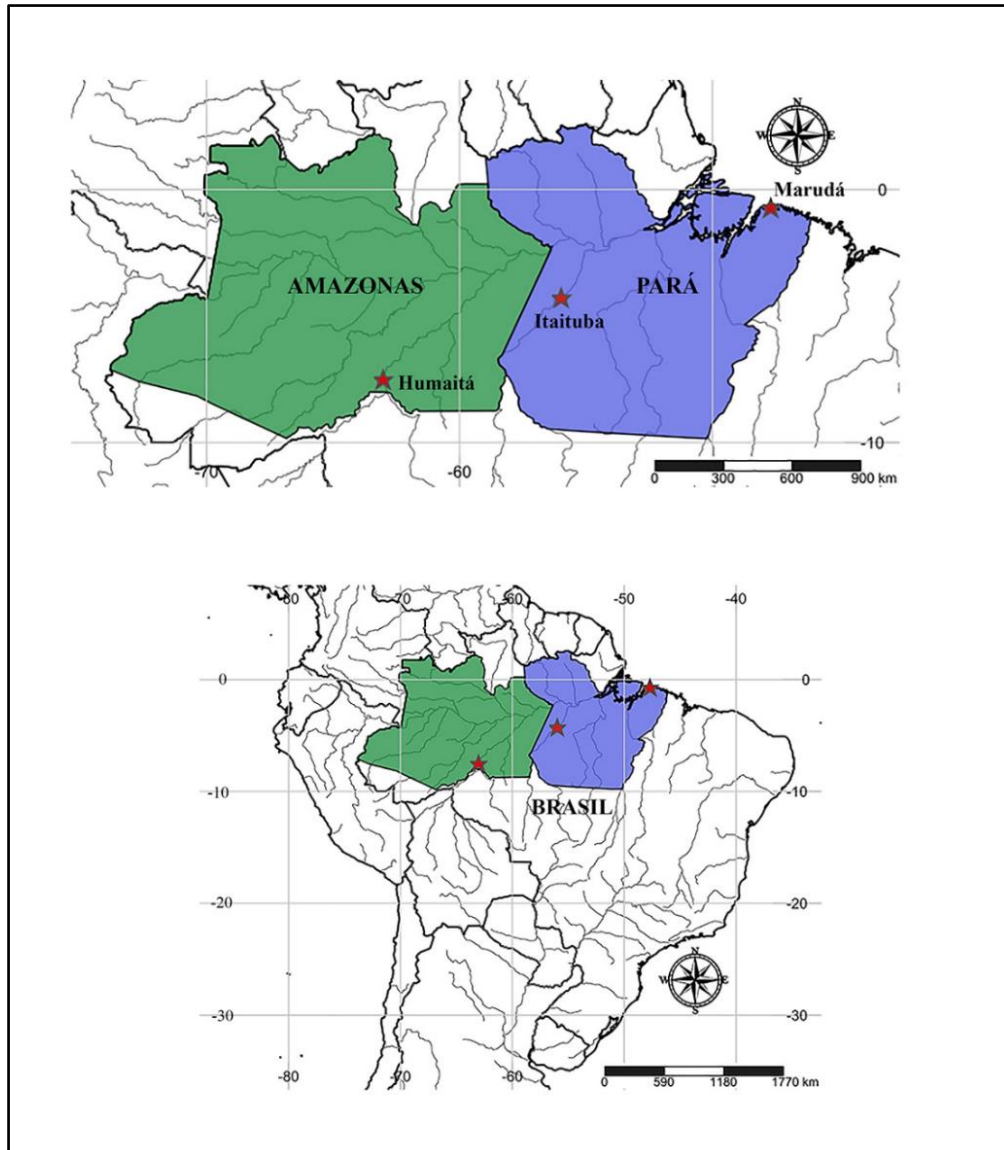
## 2.2 Preparação de lâminas para identificação morfoanatômica e para MG

Os espécimes foram processados individualmente no procedimento de dissecação para a montagem em lâmina para análise microscópica, identificação morfológica e análise de morfometria geométrica. Estruturas geminadas do lado direito como pernas e asa, posição ventral do inseto, e parte do abdome, foram armazenadas em álcool absoluto e refrigerada a -20° C para extração de DNA. A asa esquerda, lado ventral do inseto, foi montada entre lâmina e lamínula sem tratamento com hidróxido de potássio (KOH), para marcação dos Pontos Anatômicos. As demais estruturas foram tratadas com KOH, montadas entre lâmina e lamínula em método fenol-bálsamo, conforme metodologia descrita por Wirth e Marston <sup>(42)</sup>.

A informação merística foi dada como intervalo, seguida pela média e número de espécimes examinados. As imagens e medidas foram obtidas em sistema digital (Synoptics, Cambridge, UK) acoplado a um microscópio óptico (Leica DM 1000, Frankfurt, Germany). As imagens das asas (aumento de 10x) e estruturas taxonômicas, foram obtidas com câmera digital (JVC 3CCDTM, Wayne, EUA), e o Auto Montage 4.0 foi utilizado para a obtenção das imagens finais.

A terminologia foi seguida de Clastrier e Wirth <sup>(43)</sup>; para identificação foram consultadas descrição original de Lutz <sup>(44)</sup> e chave entomológica *Leptoconops* Neotropicais de Ronderos e Spinelli <sup>(45)</sup>, bem como comparados com o material depositado na Coleção de Ceratopogonidae do Instituto Oswaldo Cruz, IOC, Rio de Janeiro.

O mapa foi confeccionado no simpleMappr ([Http://www.simplemappe.net](http://www.simplemappe.net)) e modificado no Adobe Photoshop.



**Figura 1 (34).** Localização geográfica dos pontos de coletas de *Leptoconops*, nos estados do Amazonas e Pará, na América do Sul. As áreas verde e azul mostram os estados de coletas.

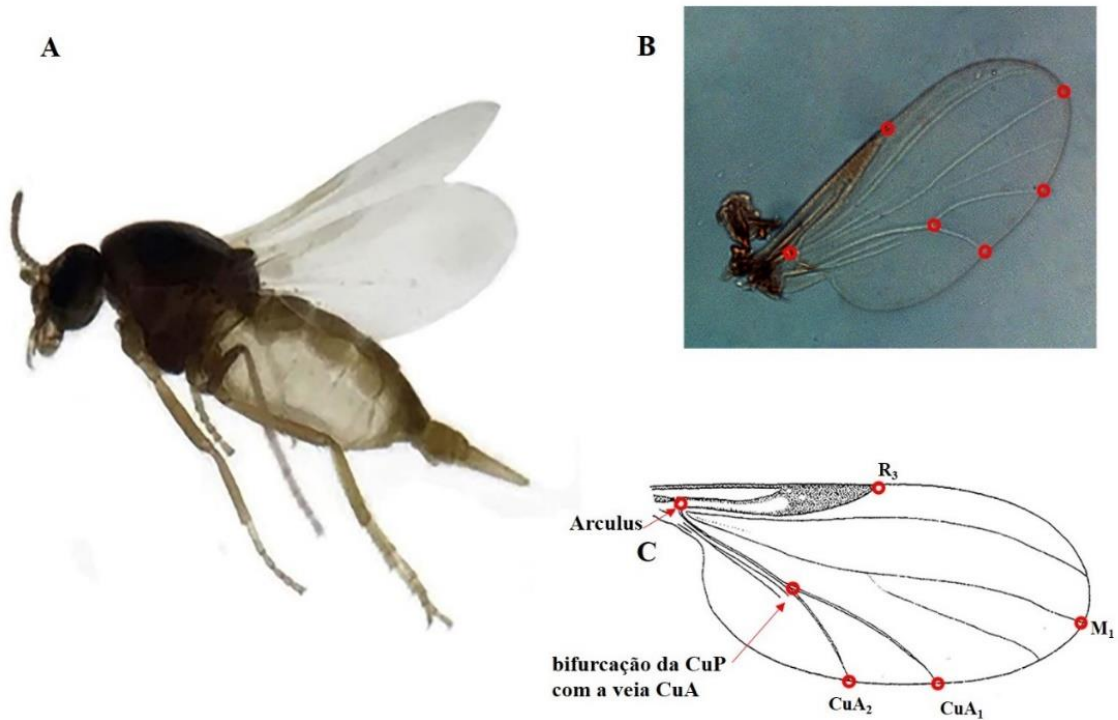
### 2.3 Morfometria geométrica das asas

Foram selecionados seis pontos anatômicos de referência (PARs ou Landmarks), 1 e 6 do tipo I (encontro entre dois tecidos) e 2-5 do tipo II (característica pontual) (Figura 2B-C). Os PARs estão nas seguintes posições da asa: (1) entre a bifurcação do árculo basal com a veia radial, (2) corresponde ao ápice costal, (3) veia M1, (4) veia na CuA1, (5) veia na CuA2, (6) entre a bifurcação da CuP com a veia CuA.

Para a MG foram comparadas três populações de *L. brasiliensis* (Figura 2A). O conjunto de dados conteve 70 observações, das quais 70 foram incluídas para análises. Foram 27 asas do grupo 1, *L. brasiliensis* - população de Marapanim-PA; 18 asas do grupo 2, *L. brasiliensis* - população de Humaitá-AM; e 25 asas do grupo 3, *L. brasiliensis* - população de Itaituba-PA. A análise do Tamanho do Centroide (TC) da asa foi estimada a partir das coordenadas dos PARs. Os valores de TC foram extraídos da matriz de coordenadas da asa de cada indivíduo. Foi realizada uma ANOVA e um teste de Tukey, para mostrar as diferenças de TC entre as três populações de *L. brasiliensis* estudadas.

Foi realizada a Análise Generalizada de Procrustes (AGP), seguida de Análise de Componentes Principais (ACP) com o teste ANOVA, e após confirmação das significâncias das diferenças, foram feitas a análise classificatórias usando de Análise de Variáveis Canônicas (AVC) (comparação entre n grupos) e comparações pareadas utilizando Funções Discriminantes (FD) e validação cruzada. Para avaliar a diferença entre os pares de espécies foi utilizada a análise discriminante com 1.000 testes de permutação, para medir acurácia. Para identificar se as diferenciações das populações são significativas, foi realizada uma MANOVA, que testa a igualdade dos vetores médios das populações multivariadas, e a significância das distâncias de Mahalanobis (dM) e de Procrustes (dP) após os testes de permutação.

As análises foram feitas com o auxílio de programas da série TPS, da série IMP (*Integrated Morphometrics Package*) de David Sheets, o software MorphoJ de C. Klingenberg e até mesmo a linguagem de programação R (<http://www.r-project.org/>). Os dados referentes ao TC foram exportados do Tpsrelw32 e analisados utilizando análise de variância (ANOVA) com Teste de Tukey no programa Past 4.06.



**Figura 2 (35).** A. Fêmea de *Leptoconops brasiliensis*; B-C. Asa; círculos em vermelho mostram os seis pontos anômicos de referência-PARs utilizados para Análise de Morfometria Geométrica.

#### 2.4 Extração de DNA, PCR e Sequenciamento

As amostras de *Leptoconops* foram preservados em álcool etílico absoluto 99,5% a 4° C, submetidos à extração individual seguindo o protocolo do Kit de extração (DNeasy® Blood & Tissue da QIAGEN)”. O DNA extraído dos espécimes foi submetido à amplificação por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR – Polymerase Chain Reaction) usando a enzima GoTaq® DNA Polymerase (Promega), em um volume final de 25 µL, sendo usado 1 µL do DNA extraído. A reação foi polimerizada com a enzima GoTaq® DNA Polymerase (Promega), reagentes e concentrações. Foram utilizados um par de “primers” “Forward/Reverse”: LepF ATT CAA CCA ATC ATA AAG ATA TTG G; LepR TAA ACT TCT GGA TGT CCA AAA AAT CA, direcionado ao DNA Barcode contido no gene mitocondrial

*Citocromo Oxidase subunidade I* (COI) <sup>(16,46,47)</sup>. A PCR foi feita nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94° C, 3 min; 5 ciclos de desnaturação a 94° C, 30 s; anelamento a 45° C, 1 min e 30 s; extensão a 68° C, 1 min; seguidos por 35 ciclos de desnaturação a 94° C, 30 s; anelamento a 51° C, 1 min e 30 s; Extensão a 68° C, 1 min; extensão final a 68° C, 10 min; final 4° C ∞.

Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose 2 % contendo 1 µL de Gel Red. Em seguida, os amplicons foram purificados usando o kit Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System kit (Promega<sup>®</sup> Fitchburg, Wisconsin, USA) quantificados em NanoDrop<sup>®</sup> e posteriormente diluídos para 10ng/µl. Após as reações de amplificação, o produto de PCR foi submetido ao sequenciamento nucleotídico, utilizando-se o kit BigDye<sup>™</sup> Terminator Cycle Sequencing v. 3.1 – Applied Biosystems.

Cada sequência gerada para o fragmento correspondente ao DNA Barcode foi avaliada quanto ao grau de confiabilidade de seus nucleotídeos usando um valor de PHRED igual ou acima de 30, através do pacote de programas Staden <sup>(48)</sup>. Todas as novas sequências criadas neste estudo serão depositadas no banco de dados GenBank (NCBI).

Temos três amostras da população de *L. brasiliensis* de Itaituba e cinco amostras da população de *L. brasiliensis* de Marapanim, e uma sequência proveniente do estado do Acre, município de Pauini. Amostras do Acre não estão presentes nos estudos morfológicos e morfométricos. As sequências foram analisadas quanto a diversidade genética. A diversidade genética intrapopulacional foi avaliada em termos de diversidade de haplótipos (Hd), diversidade nucleotídeos ( $\pi$ ), número de sítios segregantes (NS) e número de haplótipos (h); a diversidade foi mensurada usando Arlequin v. 3.5 <sup>(49)</sup>. Análises quanto ao nível de diferenciação genética foram feitas com base no índice de fixação FST de forma pareada entre as populações usando o software Arlequin v. 3.5 <sup>(49)</sup>. O número médio de substituições por sítios entre as populações (Dxy), o número total de substituições por sítios entre as populações (Da), número

de polimorfismos compartilhados entre as populações pareadas (Ss) e o número de diferenças fixadas entre as populações pareadas (Sf) foram calculados no software DnaSP v. 4.0<sup>(50)</sup>. Os valores do parâmetro diversidade haplotípica podem variar entre 0 e 1, e quanto mais próximo de 1, maior a diversidade entre os haplótipos analisados.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

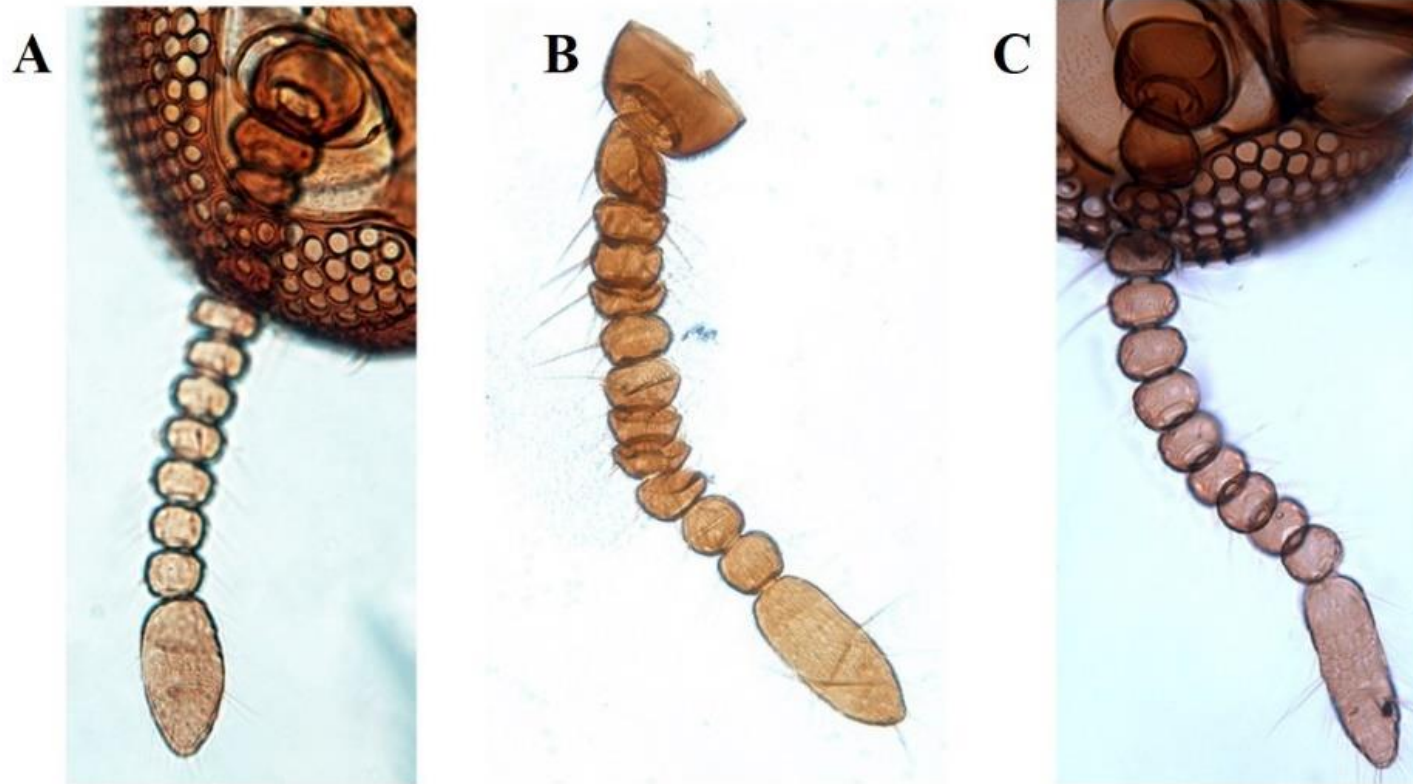
#### 3.1 Identificação Morfológica

Os indivíduos foram identificados sendo *L. brasiliensis*, mas o principal passo da chave para identificação proposta por Ronderos e Spinelli<sup>(45)</sup> foi baseado na relação do último flagelômero, que em *L. chilensis* Forattini apresenta último flagelômero 2 vezes mais longo do que largo; em *L. venezuelensis* Ortiz e *L. ricardoi* Ronderos & Spinelli apresentam último flagelômero 2.6 vezes mais longo que largo; em *L. brasiliensis* e *L. casali* Cavalieri & Chiossone apresentam último flagelômero 4 a 5 vezes mais longo que largo. Os espécimes examinados aqui apresentam uma variância do último flagelômero de 2 a 3.9 vezes mais longo que largo, sendo apenas um espécime da população de Itaituba com medida próxima a 4 vezes mais longo que largo. Mas essa variação também foi observada nos espécimes depositados na Coleção de Ceratopogonidae (FIOCRUZ/CCER), bem como nos exemplares coletados por Trindade e Gorayeb<sup>(3,4)</sup>, depositados no Museu Paraense Emílio Goeldi, Pará.

Foram evidenciadas as variações morfológicas entre as três populações (Figuras 3-5). Todas as três populações apresentam olhos largamente separados; sem sutura frontal; Flagelômero (Figura 3) apical de 2,20 – 3,90 (2,70; n = 7) vezes mais longo do que largo em *L. brasiliensis* de Marapanim; 2,00 – 3,60 (2,78; n = 9) vezes mais longo do que largo em *L. brasiliensis* de Humaitá; e 2,70 – 3,60 (3,13; n = 4) vezes mais longo do que largo em *L.*

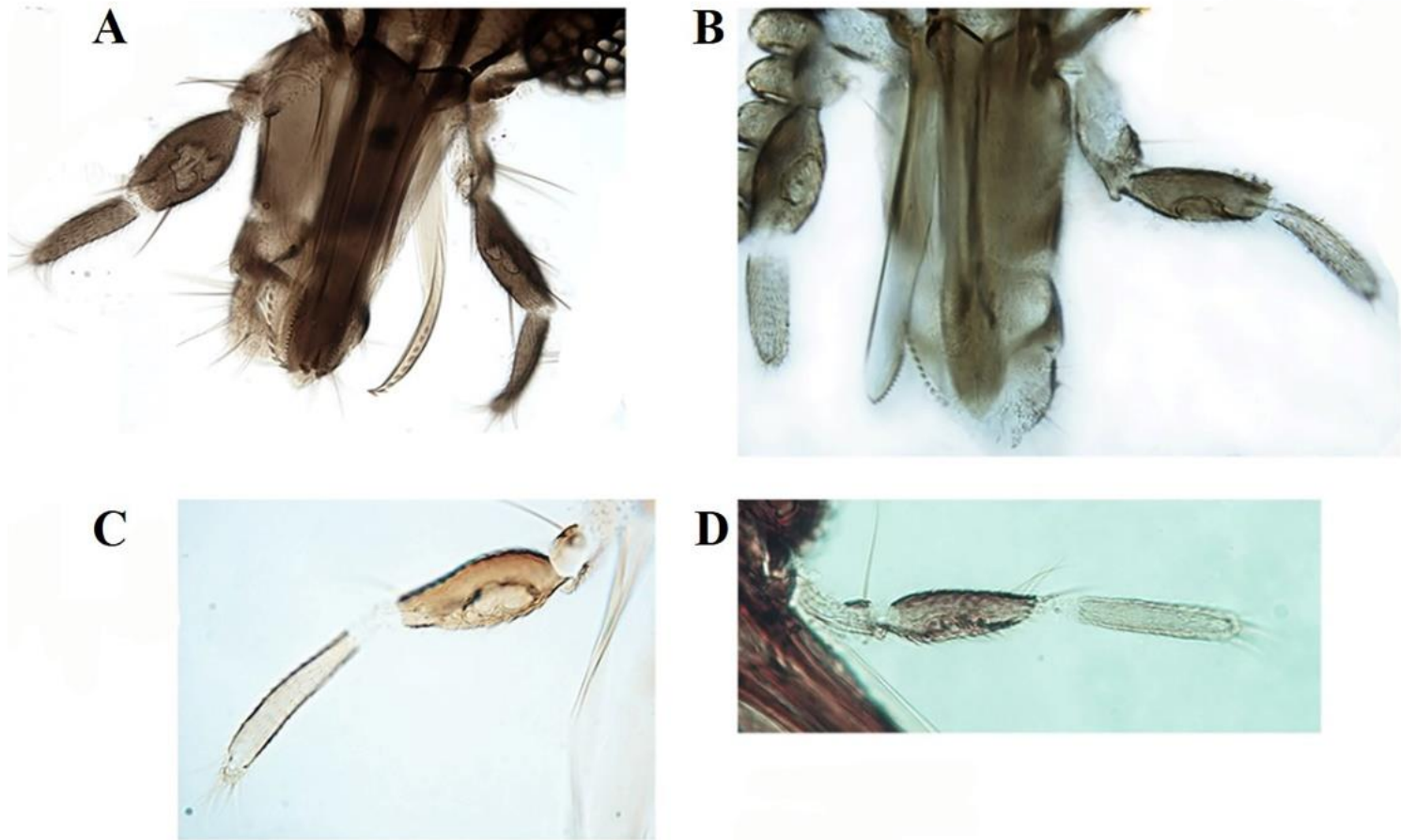
*brasiliensis* de Itaituba. Palpos (Figura 4) com quatro segmentos com fossas sensorial irregulares; o quarto segmento possui um anel basal pálido; terceiro segmento palpal 2,20 – 3,80 (3,20; n = 7) vezes mais longo do que largo em *L. brasiliensis* de Marapanim; 2,80 – 4,00 (3,31; n = 10) vezes mais longo do que largo em *L. brasiliensis* de Humaitá; e 2,50 – 3,43 (3,10; n = 5) em *L. brasiliensis* de Itaituba. Asa (Figura 5), com veias longitudinais adjacentes à margem da asa hialina esbranquiçada sem macrotríquias; veia cruzada r-m ausente e células radiais fundidas em estigma dilatado; comprimento da asa 0,77 – 0,82 mm (0,79; n = 7) e razão costal 0,40 – 0,50 (0,47; n = 7) em *L. brasiliensis* de Marapanim; 0,72 – 0,81 (0,76; n = 10) mm e razão costal 0,44 – 0,50 (0,48; n = 10) em *L. brasiliensis* de Humaitá; e 0,67 – 0,80 (0,75; n = 6) mm e razão costal 0,44 – 0,51 (0,48; n = 6) em *L. brasiliensis* de Itaituba.

As variações populacionais baseadas na morfologia podem ser influenciadas pelas variações ecotípicas, mas também ao sofrerem influência da carga genética do indivíduo, admite-se a possibilidade de que essas variações sejam utilizadas para reconhecer processos microevolutivos <sup>(51)</sup>, ou pode estar ocorrendo uma plasticidade fenotípica em resposta às variações no ambiente <sup>(52)</sup>.

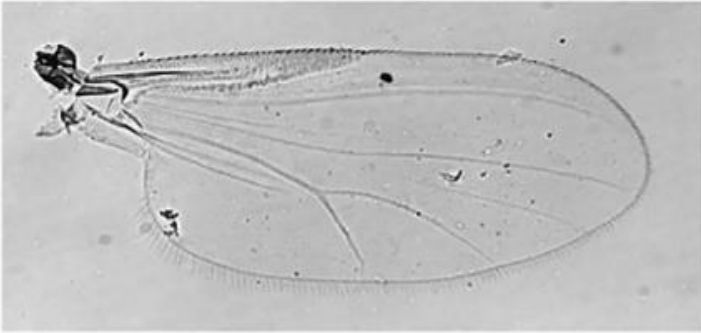
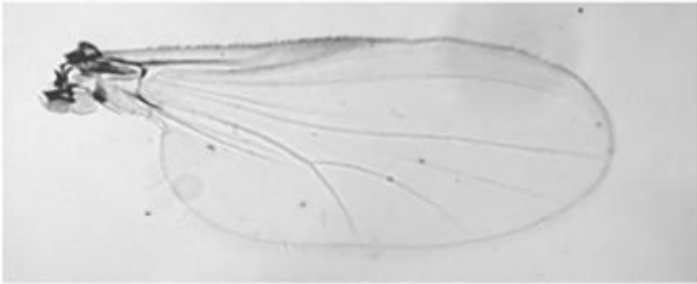
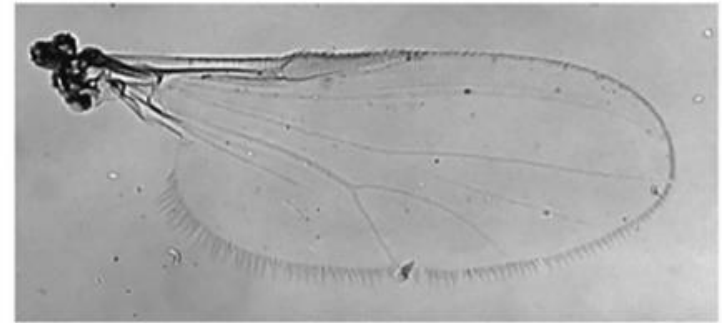


**Figura 3.** Fêmea de *Leptoconops brasiliensis*. Antena, A-C: **A.** População de Itaituba, Pará; **B.** população de Marapanim, Pará; **C.** População de Humaitá, Amazonas.





**Figura 4 (36).** Fêmea de *Leptoconops brasiliensis*. Palpo, A-D: **A.** População de Itaituba, Pará; **B.** população de Marapanim, Pará; **C-D.** população de Humaitá, Amazonas.

**A****B****C**

**Figura 5 (37).** Fêmea de *Leptoconops brasiliensis*. Asa, A-C: **A.** População de Itaituba, Pará; **B.** População de Marapanim, Pará; **C.** População de Humaitá, Amazonas.

### 3.2 Redescricao da fêmea de *Leptoconops brasiliensis* e descricao do macho

*Leptoconops brasiliensis* Lutz

Figuras. 6 A – G; 7 A – D; 8 A – E; 9 A – G; 10 A – C; 11 A – F

**Diagnose proposta: Fêmea:** vértice com 8 cerdas irregularmente alinhadas; separação dos olhos aproximadamente de 8 – 10 omatídeos; flagelômero apical alongado, cerca de 2.20 – 3.90 vezes mais longo que largo; relação palpal 2.20 – 3.80; mandíbula com 13 – 18 dentes; cerco grande, alongado com lamelas genitais longas e estreitas; 9º esternito com escavação oval e profunda, aparentemente formando braço para o gonóporo. Abertura do átrio mais largo que longo, delimitada por uma faixa pigmentada em forma de arco trilobado, apresentando e em sua parte central dois pares de cerdas muito fortes, individualmente implantadas em um mamilo proeminente. Duas espermatecas ovoides, subiguais. **Macho:** Abdome: Semelhante a fêmea, com diferenças na genitália, Gonocoxito 2.5 – 2.9 vezes mais longo do que largo, com o lobo basal, apódema gonocoxal muito evidente. Gonóstilo marrom escuro; inchado na metade basal, estreitado da base ao ápice; com dois espinhos mediais e um no ápice. Parâmeros/edeago sobrepostos, complexo, tendo no edeago em cada lado, uma pequena expansão lameliforme altamente pigmentada, direcionada ventralmente. Os ramos distais dos parâmetros consistem em estruturas estreitas, curvando-se na mesma direção e parcialmente sobrepostas em uma de suas extremidades.

**Fêmea. Cabeça** marrom (Figura 6A): vértice com 8 cerdas irregularmente alinhadas; fronte com um par de cerdas muito alinhadas; relação da largura da cabeça dividido pelo comprimento da parte bucal com 1.90 – 2.20 (2.03; n = 8). Olhos compostos nus, amplamente separados (Figura 6D); separação aproximadamente de 8 – 10 (9.5; n = 8) omatídeos; facetas omatidiaias de 0.31– 0.38 (0.35; n = 8) da largura total da cabeça. Antena (Figura 6B) com escapo claro, pedicelo marrom-escuro; flagelômero marrom-escuro, com 12 segmentos; flagelômero apical alongado, cerca de 2.20 – 3.90 (2.70; n = 7) vezes mais longo que largo;

segmentos flagelares com comprimentos na proporção de 15 (13 – 19): 8 (7 – 9): 8 (7 – 9): 8 (7 – 9): 8 (7 – 9): 8 (7 – 9): 8 (7 – 9): 8 (7 – 9): 8 (7 – 9): 8 (7 – 9): 8 (7 – 9): 8 (7 – 9): 8 (8 – 9): 8 (8 – 9): 27 (25 – 30). Palpo (Figura 6E – G) marrom médio, com quatro segmentos palpais, ápices do 1º e 2º segmentos e base estreita do branco do 4º segmento, com um 3º segmento palpar subigual ao quarto, que apresenta um anel basal pálido; palpo maxilar com 3º segmento ligeiramente inchado, com fosseta sensorial que ocupa de 1/3 a 2/4 de todo o comprimento da margem interna (dependendo da posição do palpo). Relação palpal 2.20 – 3.80 (3.20; n = 7). Mandíbula com 13 – 18 (14; n = 8) dentes (Figura 13G). **Tórax:** cor marrom, mais escuro no dorso (Figura 7B). Mesonoto com cerdas curtas espalhadas, com três faixas longitudinais ligeiramente mais claras. Escutelo com 4 cerdas longas e poucas cerdas curtas. Asa branca leitosa (Figura 7A), a maioria das veias distintas, longitudinalmente atingindo a margem da asa; veia cruzada r-m ausente e células radiais fundidas em estigma inchado; comprimento da asa 0.77 – 0.82 (0.79; n = 7). Razão costal 0.40 – 0.50 (0.47; n = 7). Pernas marrom-escuras, com tarsos marrom-médios (Figura 7D); pente tibial posterior com esporão bastante pequeno e quatro espinhos; 1º e 2º tarsômeros em todas as pernas com um par de espinhos apicais; 4º tarsômero subcilíndricos; garras tarsais curtas, com cerdas basais; empodia presente (Figura 7E). Halter claro com haste escura. **Abdome:** marrom escuro (Figura 8A); cerco grande, alongado com lamelas genitais longas e estreitas (Figura 8B); 9º esternito com escavação oval e profunda, aparentemente formando braço para o gonóporo. Abertura do átrio mais largo que longo, delimitada por uma faixa pigmentada em forma de arco trilobado, apresentando e em sua parte central dois pares de cerdas muito fortes, individualmente implantadas em um mamilo proeminente (Figura 8C-D). Duas espermatecas ovoides, subiguais, medindo 32.5 – 47.5 (38.7; n = 4)  $\mu\text{m}$  x 25.0 – 27.05 (25.5; n = 4)  $\mu\text{m}$ , ductos curtos medindo 5.0 (n = 1)  $\mu\text{m}$  (Figura 8E).

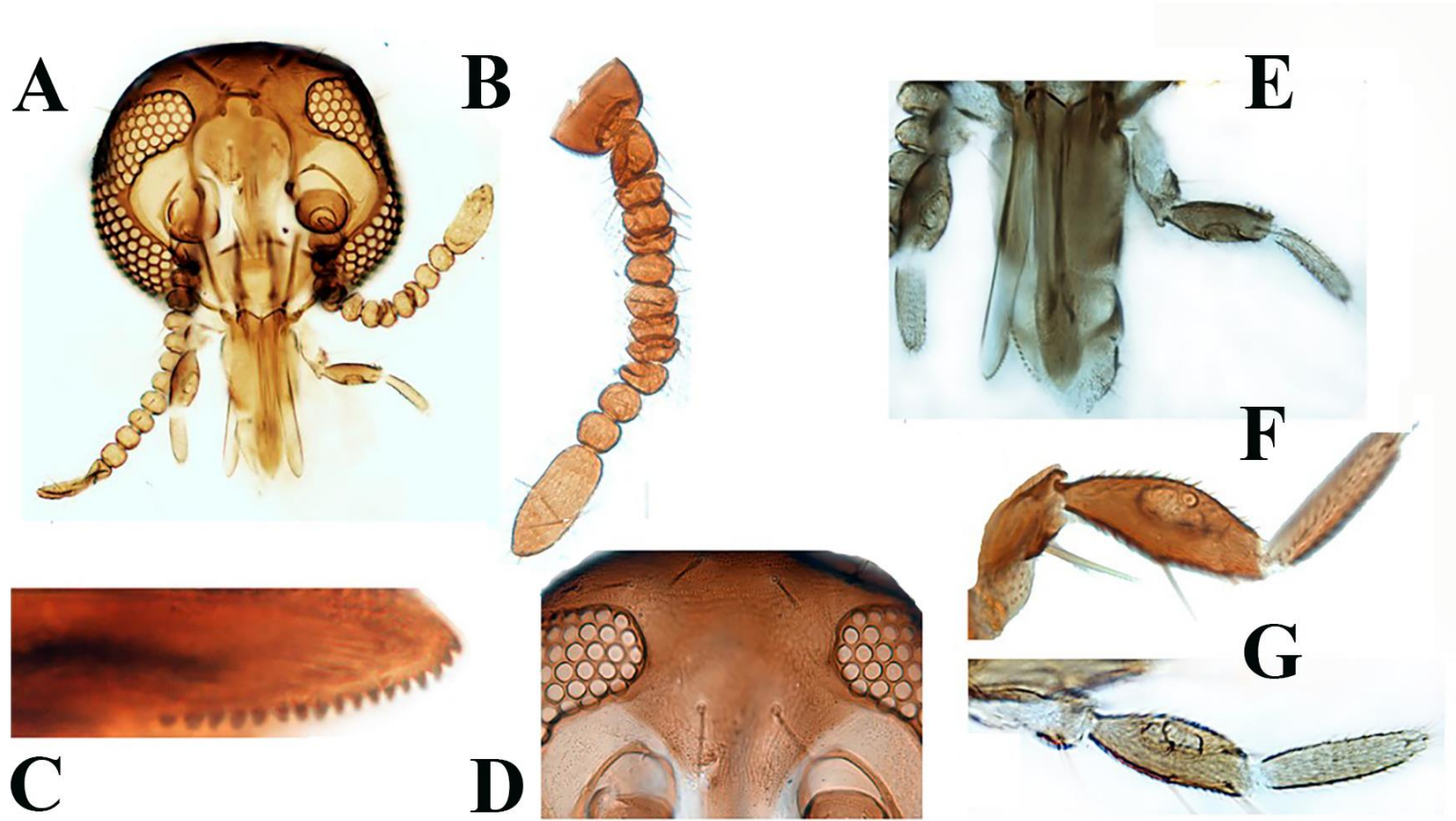
**Macho.** Marrom escuro. Semelhante à fêmea, com as seguintes diferenças. **Cabeça:** Marrom escuro (Figura 9A); relação da largura da cabeça dividido pelo comprimento da parte

bucal com 2.17 – 2.77 (2.48; n = 4). Olhos compostos nus, amplamente separados (Figura 9B); separação aproximadamente ao diâmetro de 10.0 – 10.8 (10.3; n = 4) omatídeos; facetas omatidiais de 0.32 – 0.46 (0.38; n = 4) da largura total da cabeça. Antena com segmentos flagelares com comprimentos na proporção de 25 (21–29): 10 (9–11): 10 (10–11): 10 (10–12): 10 (10–11): 10 (9–11): 10 (10–11): 11 (10–12): 11 (11–12): 13 (12–14): 14 (13–16): 22 (20–24): 53 (47–60). Palpo (Figuras 16D– E) com pequena fossa sensorial. Relação palpal 3.33 – 3.66 (3.52; n = 3). **Tórax:** Marrom escuro. Mesonoto como da fêmea (Figura 9E). Asa (Figura 9C) mais estreita em comparação com a fêmea; comprimento da asa 0.87–0.99 (0.91; n = 4) mm; largura 0.29 – 0.34 (0.31; n = 4) mm. Pernas como da fêmea (Figura 9G). Halter claro com haste escura. **Abdome:** Marrom escuro (Figura 10A). Esternito 9, estreito, curto, com margem proximal e distal levemente côncavo, com pequeno sulco na região proximal. Tergito 9 moderadamente alongado, arredondada, estendendo-se até próximo ao ápice do gonocoxito; apêndices apicolaterais muito largos na base e estreitando-se rapidamente até o ápice. Genitália marrom escura (Figura 10B – C); Gonocoxito 2.5 – 2.9 (2.7; n = 3) vezes mais longo do que largo, com o lobo basal, apodema gonocoxal muito evidente. Gonóstilo marrom escuro (Figura 11E – F); inchado na metade basal, estreitado da base ao ápice; com dois espinhos mediais e um no ápice. Parâmeros/edeago sobrepostos (Figuras 11A – D), tendo no edeago em cada lado, uma pequena expansão lameliforme altamente pigmentada, direcionada ventralmente. Os ramos distais dos parâmetros consistem em estruturas estreitas, curvando-se na mesma direção e parcialmente sobrepostas em uma de suas extremidades.

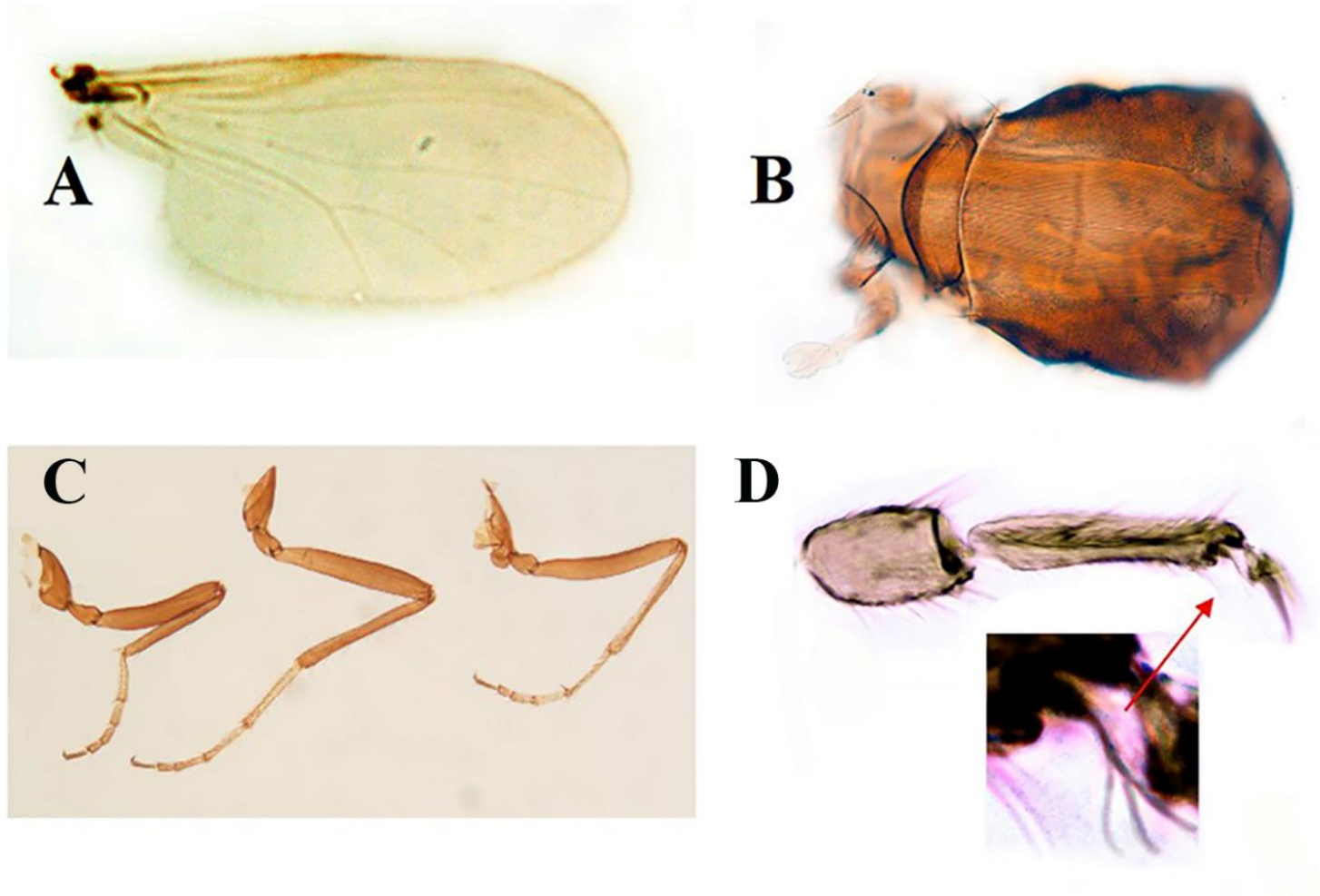
**Amostras examinadas.** 7 fêmeas e 4 machos. Todos provenientes do município de Marapanim, distrito Marudá, praia de Crispim, há 173 km de Belém – Pará, acesso pela BR 316, limita-se ao norte pelo oceano Atlântico, 00°43'03" 47°41'59". Col. Farias, Pessoa e Picelli.

**Distribuição e bionomia.** Lutz<sup>(43)</sup> descreveu *L. brasiliensis* (como *Tersethes brasiliensis*) para o baixo rio Tocantins, mas ele não identifica o estado. Borkent e Spinelli<sup>(53)</sup> com base na

localidade tipo, estabeleceram a presença de *L. brasiliensis* no estado do Amazonas. Trindade e Gorayeb <sup>(4)</sup> corrigiram a distribuição da espécie tipo restringindo *L. brasiliensis* para o estado do Pará. Pessoa et al. <sup>(5)</sup> assinalaram *L. brasiliensis* no estado do Acre, sudeste da Amazônia. Farias et al. <sup>(6)</sup> assinalaram *L. brasiliensis* para o estado do Amazonas, município de Tefé. Esta espécie também ocorre na Argentina e no Uruguai <sup>(2)</sup>. Em todos esses trabalhos, os espécimes foram encontrados em zonas costeiras e estuarina e ao litoral, e os machos eram desconhecidos. Os estágios anteriores ao adulto são desconhecidos, mas o oviscapto indica que os ovos não são postos superficialmente <sup>(44)</sup>.

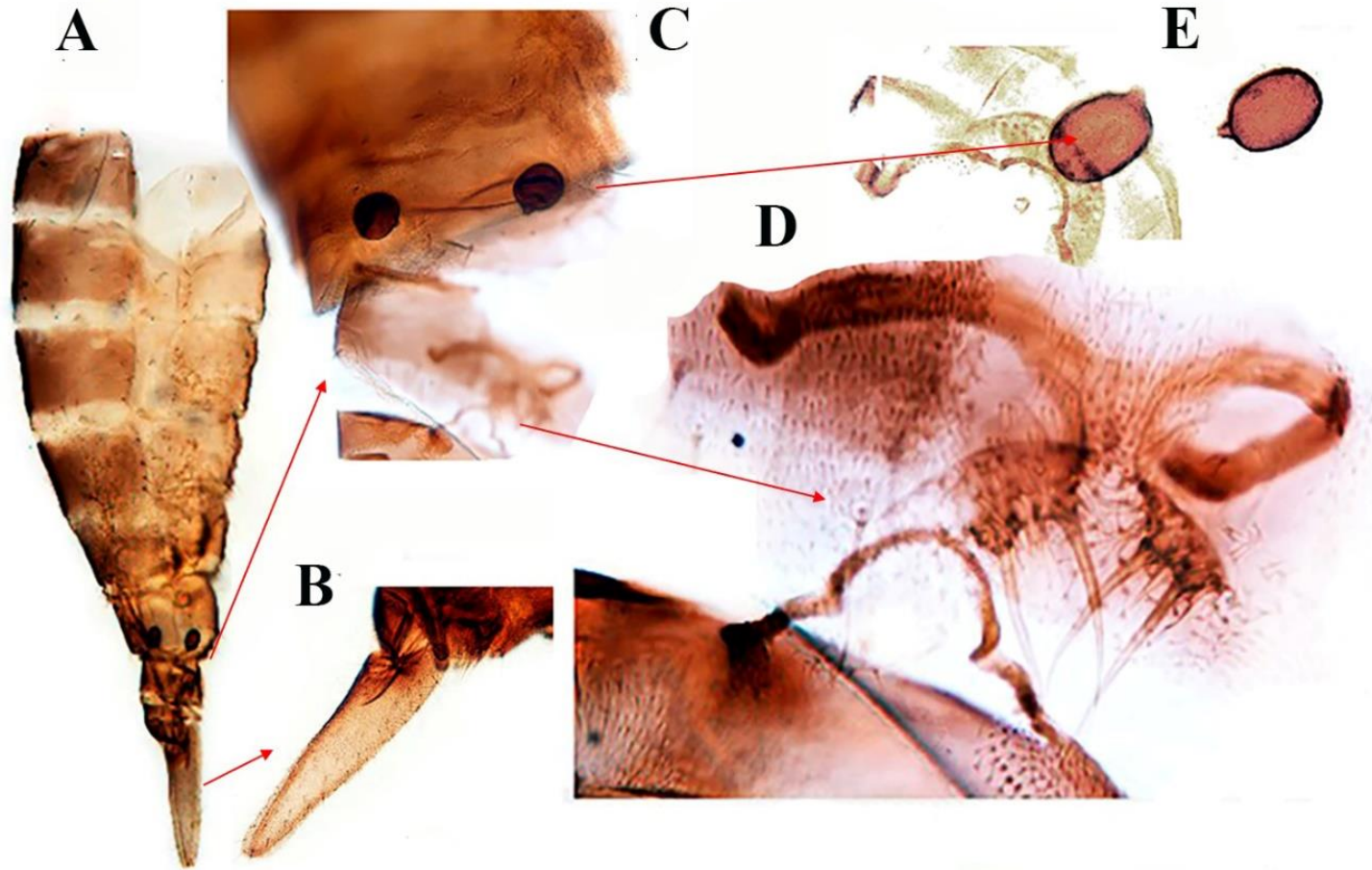


**Figura 6 (38).** *Leptoconops (L.) brasiliensis*, fêmea. **A.** Cabeça; **B.** Antena; **C.** Dentes na mandíbula; **D.** Separação dos olhos; **E– G.** Palpos, fossas sensoriais no 3º segmento.

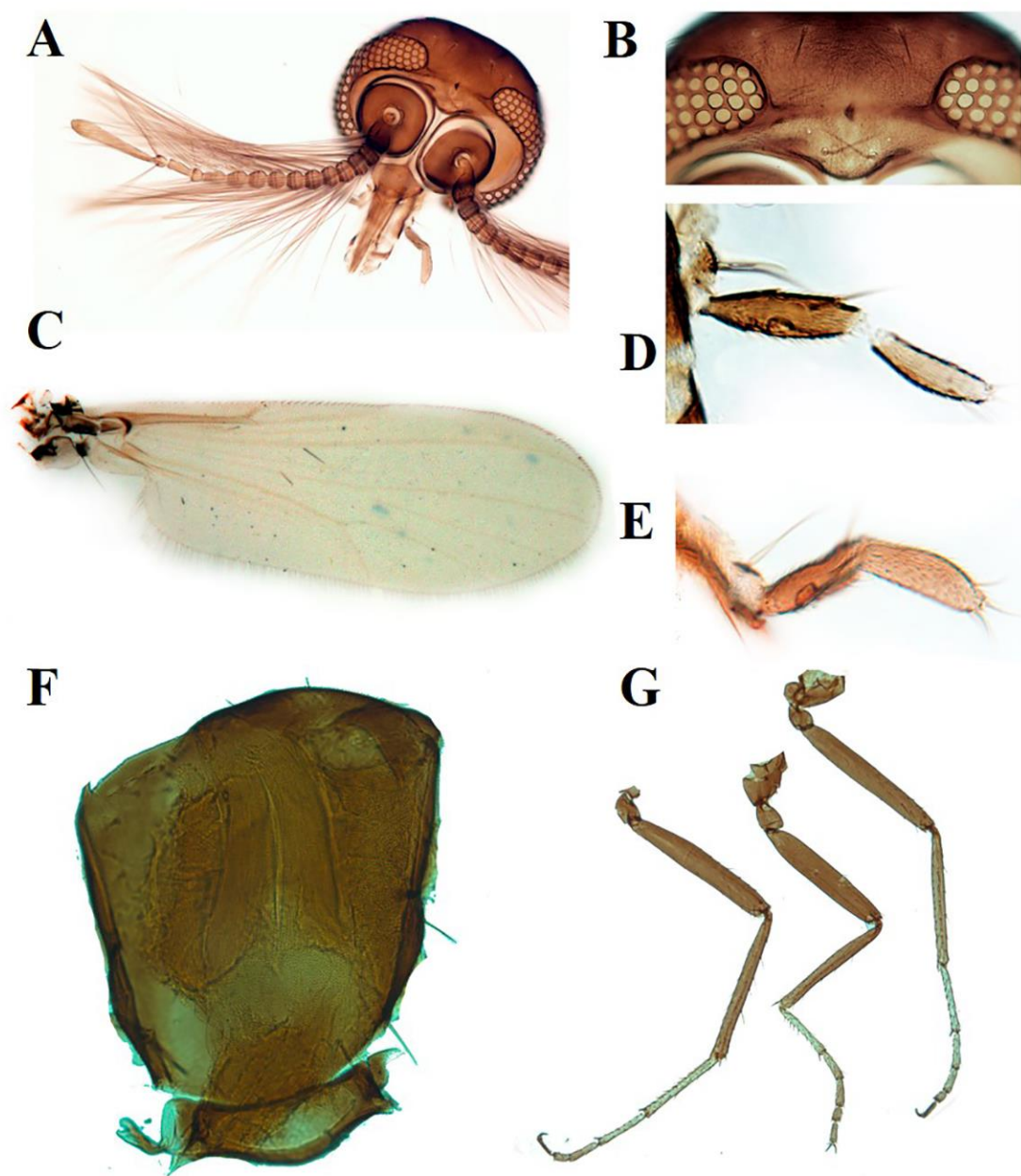


**Figura 7 (39).** *Leptoconops (L.) brasiliensis*, fêmea. **A.** Asa; **B.** Mesonoto, porção dorsal; **C.** Pernas; **D.** Empodia.

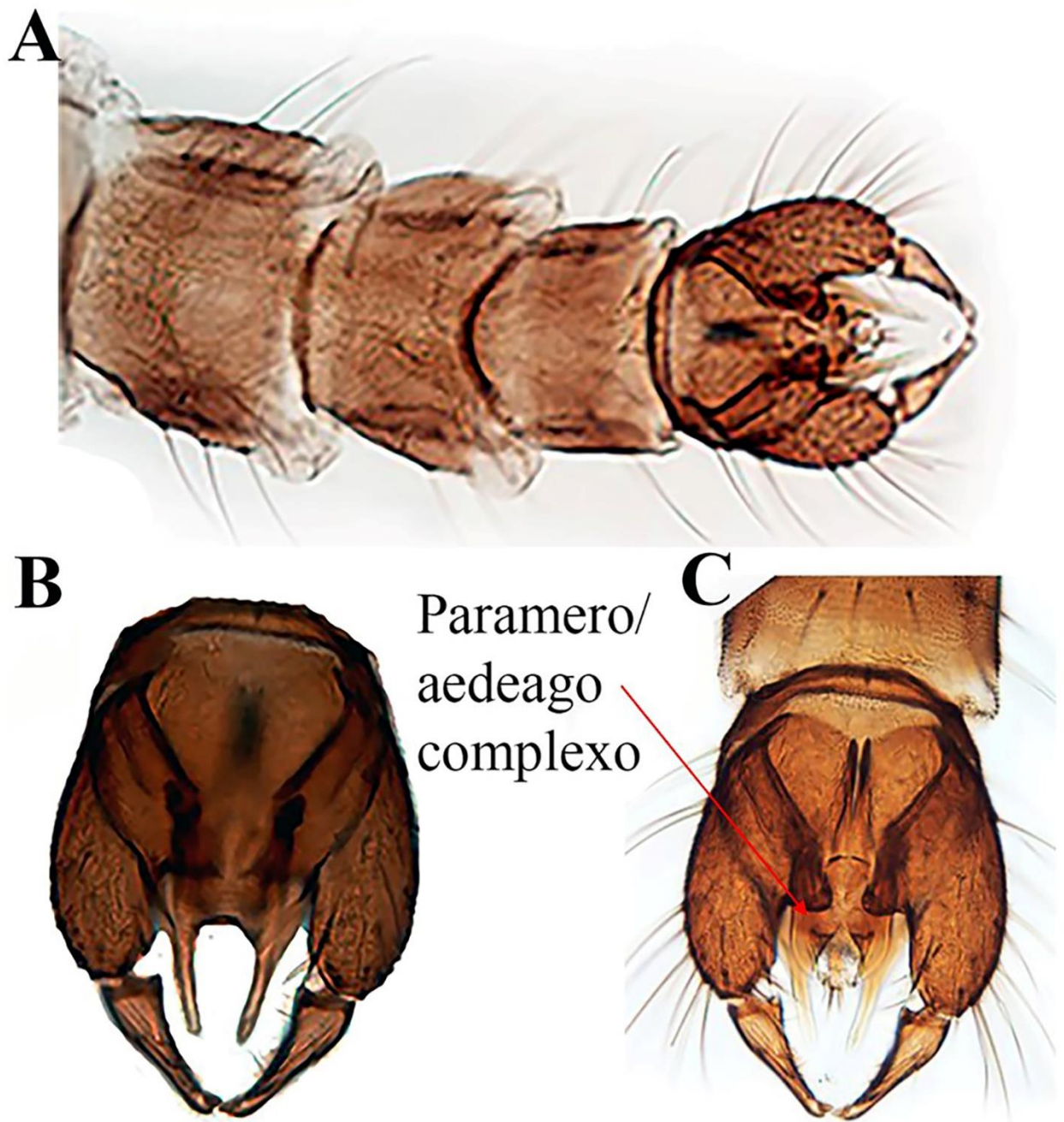




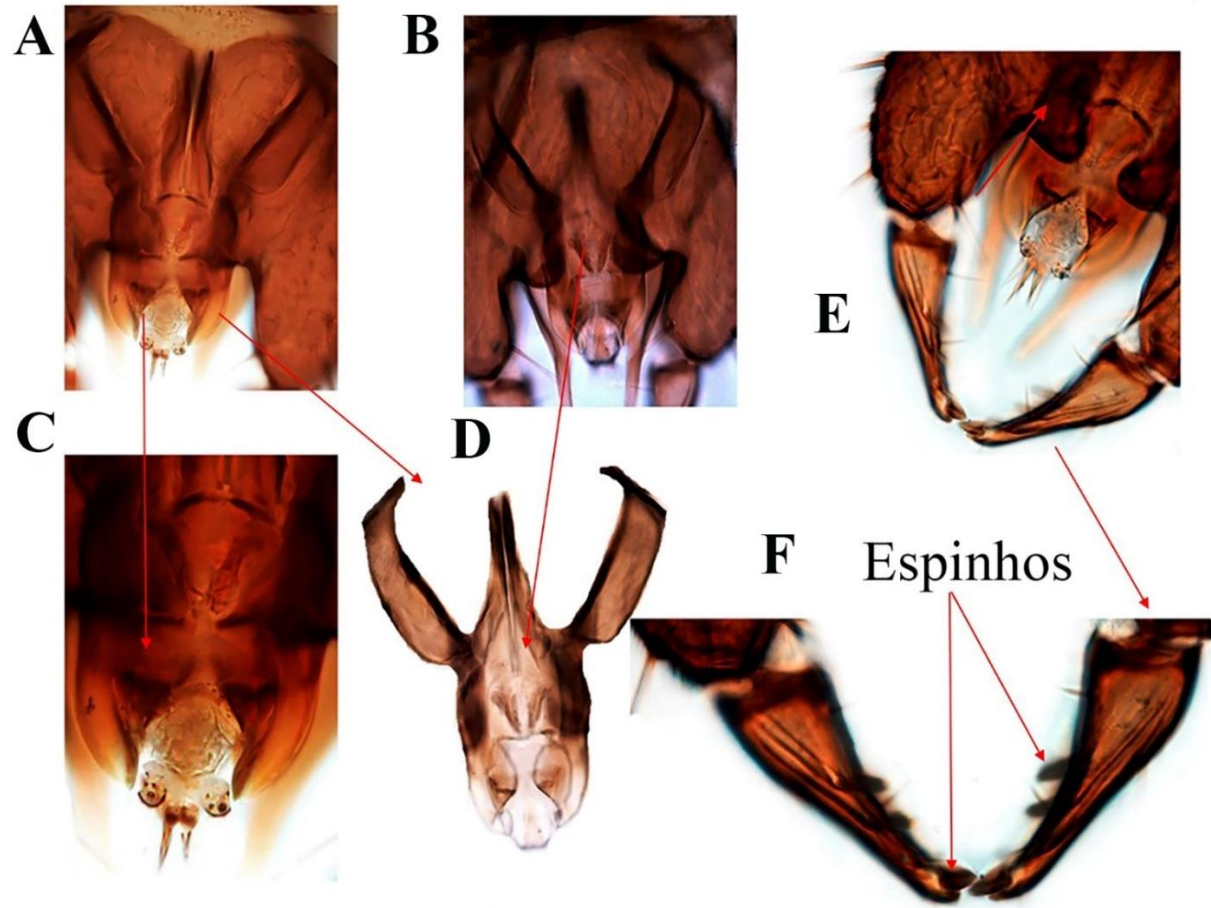
**Figura 8 (40).** *Leptoconops (L.) brasiliensis*, fêmea. **A.** Abdome, porção lateral; **B-D.** Abdome, abertura do átrio, braços laterais da placa ventral, arcabouço genital trilobado; **C.** Espermatecas. **E.** Cercus;



**Figura 9 (41).** *Leptoconops (L.) brasiliensis*, macho. **A.** Cabeça; **B.** Separação dos olhos; **C.** Asa; **D – E.** Palpos, fossas sensoriais; **F.** Mesonoto, porção dorsal; **G.** Pernas.



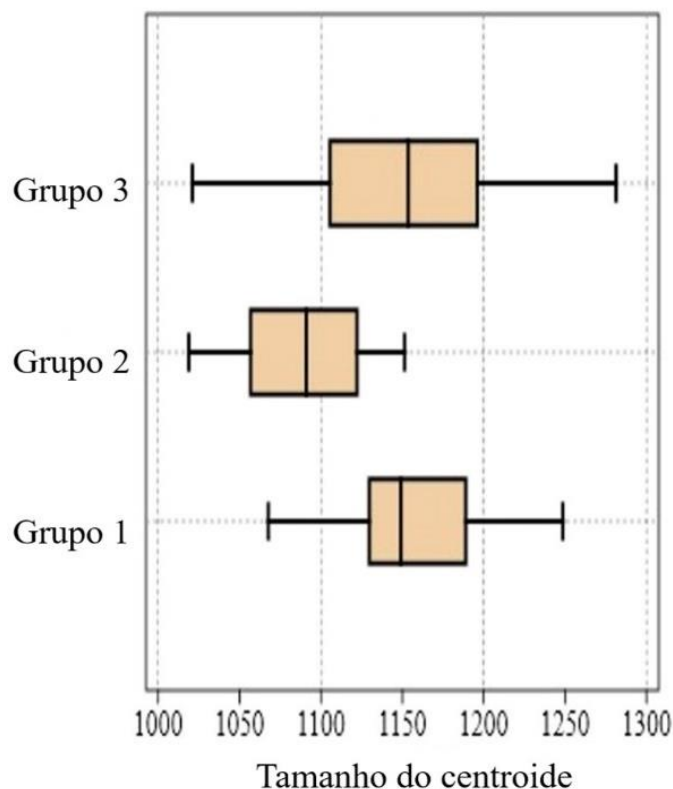
**Figura 10 (42).** *Leptoconops (L.) brasiliensis*, macho. A. Abdome, vista ventral; B. Genitália, vista dorsal; C. Genitália, vista ventral.



**Figura 11 (43).** *Leptoconops (L.) brasiliensis*, macho. A – D. Parâmeros/edeago; E – F. Gonóstilo.

### 3.3 Morfometria Geométrica de asa de fêmeas de três populações de *Leptoconops brasiliensis* da Região Amazônica brasileira

Para as três populações estudadas o teste ANOVA mostrou diferenças significativas para as medianas dos TCs entre as populações de *L. brasiliensis* estudadas ( $F = 9.689$ ;  $df = 2$   $p < 0,0002014$ ) e o teste de Tukey mostrou diferenças significativas entre as populações de: *L. brasiliensis* de Marapanim - *L. brasiliensis* de Humaitá ( $p < 0.0002436$ ); e entre as populações de *L. brasiliensis* de Humaitá - *L. brasiliensis* de Itaituba ( $p < 0.0001943$ ); já *L. brasiliensis* de Marapanim - *L. brasiliensis* de Itaituba, não apresentaram diferenças significativas. O gráfico de boxplot mostra a amplitude da variação do TC entre as três populações (Figura 12).



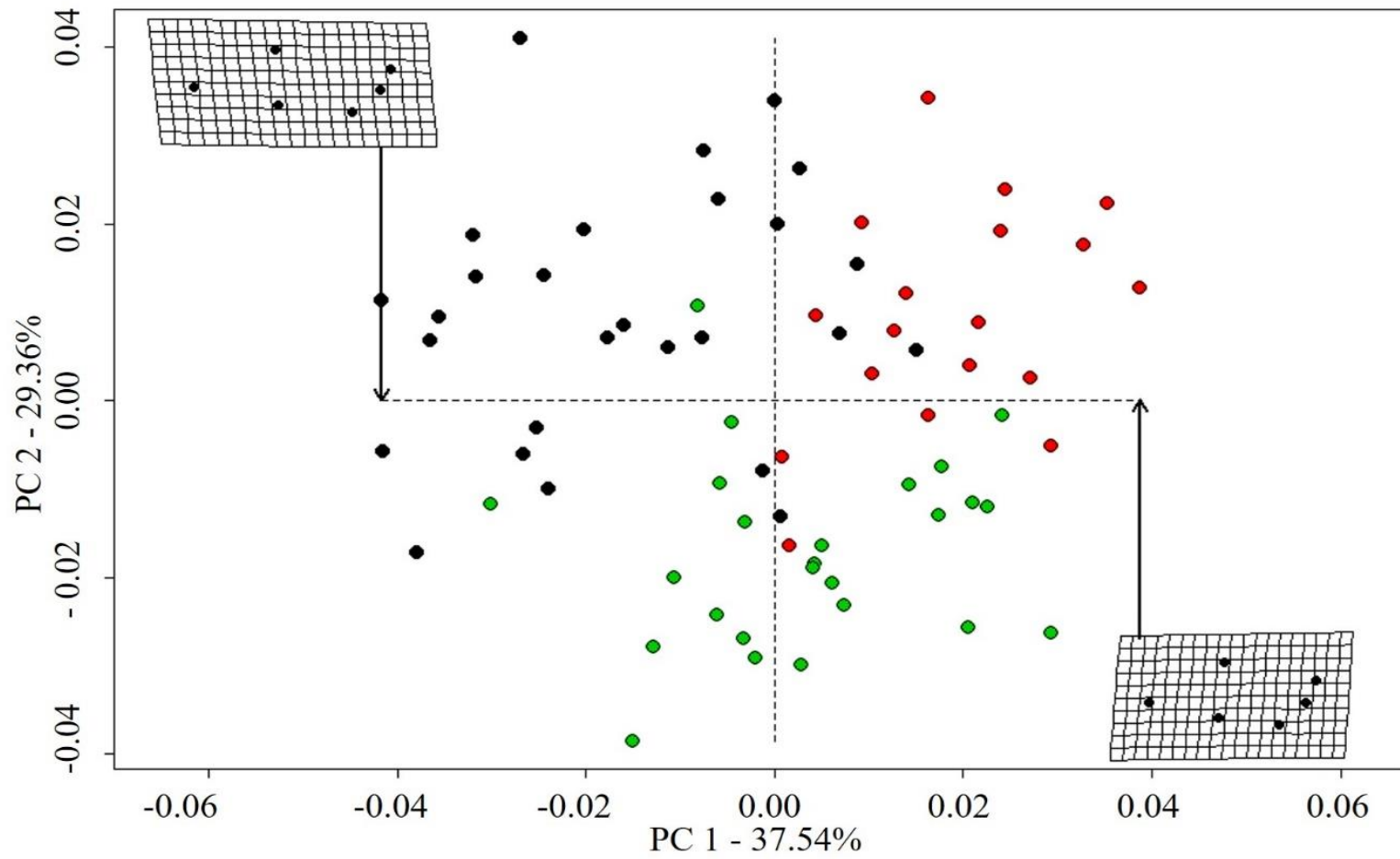
**Figura 12 (44).** Boxplot- inclui a informação do Intervalo de Confiança de 95% para a Mediana da variação do tamanho do centroide para as três populações de *Leptoconops brasiliensis*: grupo 1, população de Marapanim-PA; grupo 2, população de Humaitá-AM; e grupo 3, população de Itaituba-PA.

Após a sobreposição Procrustes, uma ACP baseada na matriz de covariância, apresentou variáveis de forma dentro das amostras das três populações e transformou essas variáveis em

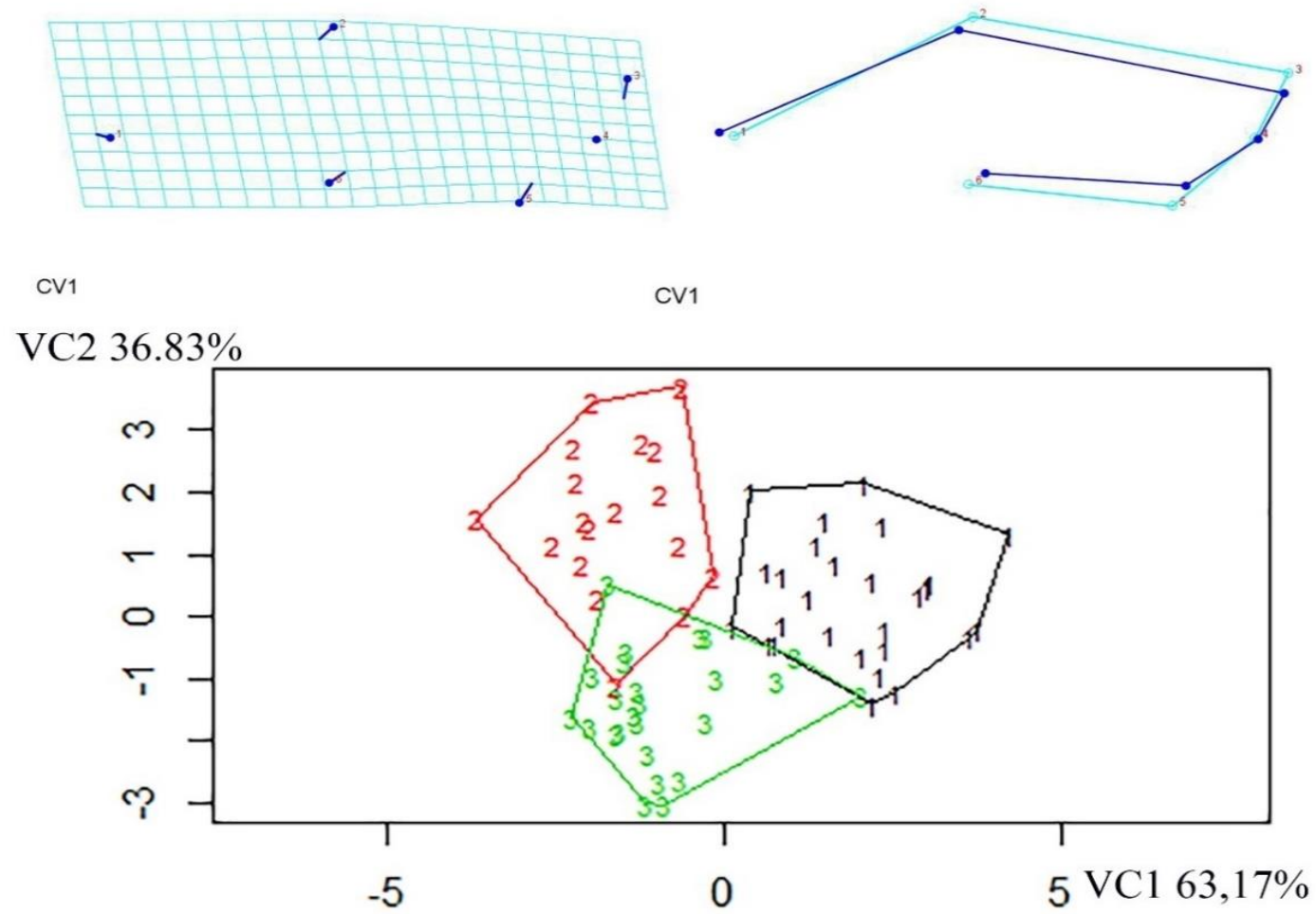
Componente Principal (CP). Os pontos de dados foram plotados em um espaço de forma representado pelos dois primeiros componentes principais, o que representa uma representação ótima em duas dimensões responsáveis pela quantidade máxima de variação entre as espécies<sup>(54)</sup>. Nesse sentido, o CP1 explica mais variações de forma do que o CP2 e sucessivamente, CP1 foi responsável por 37,54% da variação de forma e CP2 por 29,36% (Figura 13), 97,45% da variação de forma que estavam acumuladas nos CPs, concentravam-se nos seis primeiros eixos.

Para testar as diferenças de forma foi utilizada uma ANOVA de Procrustes (método para avaliar as quantidades relativas de variação entre indivíduos). A análise de Variância de Procrustes mostrou diferença significativa na forma das asas entre os indivíduos das três populações estudadas ( $F = 19,05$ ;  $df = 16$   $p < 0,0001$ ).

A AVC apresentou uma precisão da classificação geral de 88,60% para o padrão de agrupamento entre as populações. A AVC foi realizada sem os scores de regressão a fim de retirar os efeitos alométrico, que mesmo pequeno de 3,42%, apresentou diferenças significativas, com testes de permutação contra hipótese nula de independência com 10.000 rodadas, apontaram diferenças significativas ( $p = 0,0380$ ). Essas diferenças de forma, livre de alometria de origem ambiental, podem surgir entre populações conspecíficas de áreas eco geográficas distantes<sup>14</sup>. A AVC mostrou que 100% da variação da forma está acumulada nos dois primeiros eixos, VC1 63,17% e VC2 36,83%, apresentando diferenças significativas na MANOVA (Wilk's Lambda,  $p < 2,2e-16$ ) (Figura 14). Após a remoção da alometria, as três populações estudadas, mostraram-se morfometricamente distintas. Além disso, o morfoespaço das VC1 e VC2 derivadas da comparação da forma da asa entre as populações 1, 2 e 3 também indicou grande divergência entre as populações.



**Figura 13 (45).** Análise de componentes principais para o primeiro componente (CP1 – 37.53%) e segundo componente (CP2 – 29.36%), para as três populações de *Leptoconops brasiliensis*: Preto - grupo 1, população de Marapanim-PA; Vermelho - grupo 2, população de Humaitá - AM; e Verde- grupo 3, população de Itaituba-PA.



**Figura14 (46).** Análise de variável canônica para as três populações de *Leptoconops brasiliensis*: Preto - grupo 1, população de Marapanim-PA; Vermelho - grupo 2, população de Humaitá-AM; e Verde - grupo 3, população de Itaituba-PA.



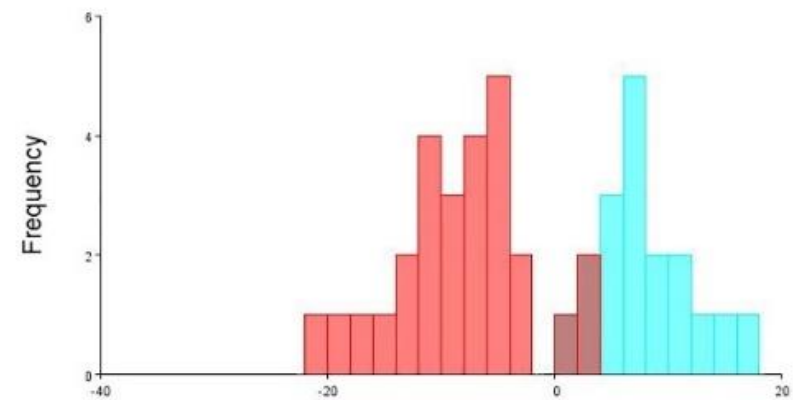
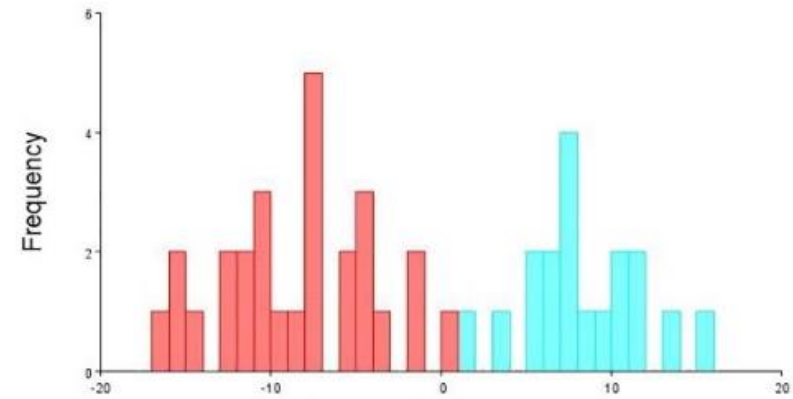
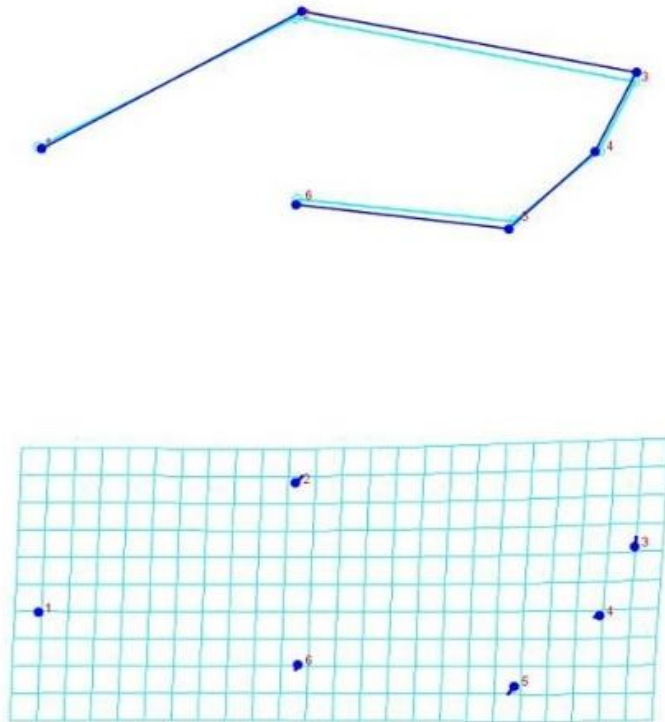
Na MG, as diferenças significativas entre as populações de *L. brasiliensis* estudadas foram detectadas nos dois componentes da forma, ou seja, tamanho e forma. A análise, mostrou diferenças significativas intra e interpopulacional, podendo indicar a existência de espécies crípticas sugerindo a presença de um complexo de espécies.

A Função Discriminante (FD) e a validação cruzada feitas para verificar se os espécimes eram da população em questão apresentaram diferenças significativa tanto na dM quanto na dP ( $p < .0001$ ). As análises discriminantes e os testes de Validação Cruzada (VaC) realizadas par a par retornaram os resultados expostos na tabela 1. As análises da FD (par a par) tiveram altos índices de resolução para diferenciar as populações, acima de 94%, uma margem de erro de 6%, com exceção de *L. brasiliensis* de Itaituba comparando com *L. brasiliensis* de Marapanim que foi de 88%. Na validação cruzada apenas *L. brasiliensis* de Humaitá quando comparado com *L. brasiliensis* Marapanim retornou à população correta com 100% de acerto, e o menor percentual de acertos foi entre a população de *L. brasiliensis* Humaitá, quando comparada com *L. brasiliensis* Itaituba com 79% (Tabela 1, figuras 15-17).

**Tabela 1 (4).** Resultados da Função Discriminantes (FD) e de Validação Cruzada (VaC). As linhas indicam a espécie à qual pertenciam os espécimes de *Leptoconops brasiliensis* analisados coletados em Marapanim e Itaituba, Pará e Humaitá, Amazonas e as colunas indicam os grupos aos quais os espécimes foram atribuídos.

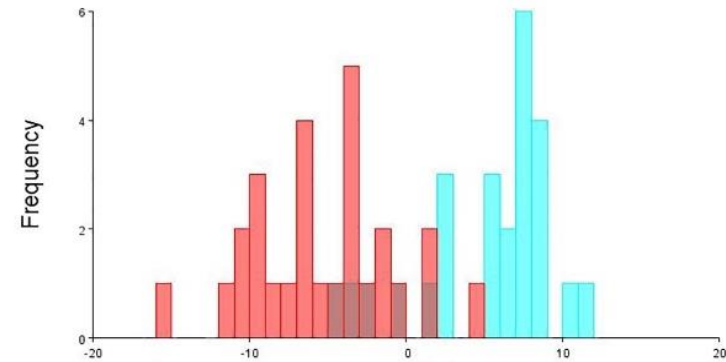
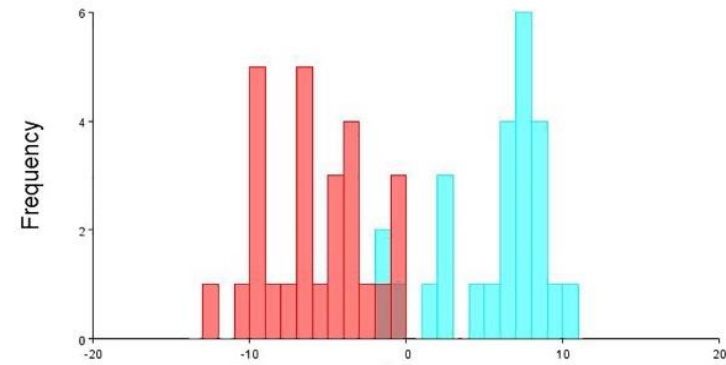
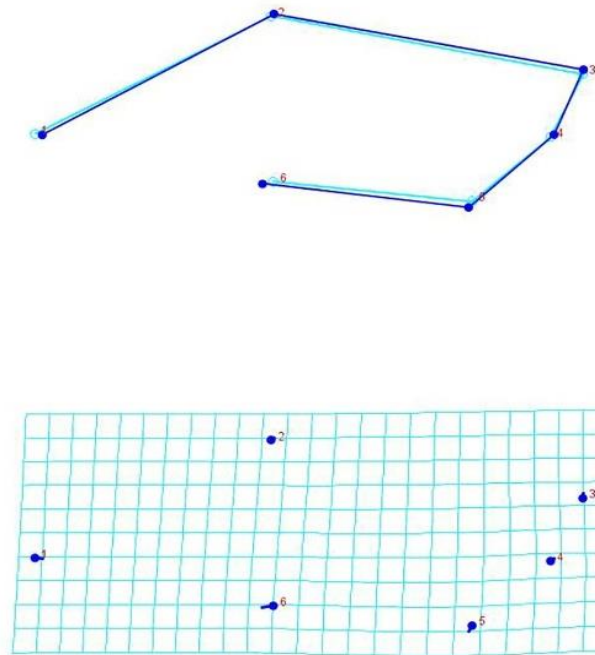
Comparação par-par		Grupo 1		Grupo 2	
Grupo 1	Grupo 2	FD %	VaC %	FD %	VaC %
<i>L. brasiliensis</i> Marapanim	<i>L. brasiliensis</i> Humaitá	96	88	100	100
<i>L. brasiliensis</i> Marapanim	<i>L. brasiliensis</i> Itaituba	100	89	88	84
<i>L. brasiliensis</i> Humaitá	<i>L. brasiliensis</i> Itaituba	94	79	96	92

*Leptoconops brasiliensis* Grupo 1 - Grupo 2



**Figura 15 (47).** Função Discriminantes (FD) e de Validação Cruzada (VC) par a par de todos os espécimes examinados de *Leptoconops brasiliensis*: Vermelho - grupo 1, população de Marapanim-PA; Azul - grupo 2, população de Humaitá-AM. Áreas de sobreposição indicam erros de discriminação e de validação cruzada. As elipses representam intervalo de confiança de 95%.

*Leptoconops brasiliensis* Grupo 1 - Grupo 3



**Figura 10 (48).** Função Discriminantes (FD) e de Validação Cruzada (VC) par a par de todos os espécimes examinados de *Leptoconops brasiliensis*: Vermelho- grupo 1, população de Marapanim-PA; Azul- grupo 3, população de Itaituba-PA. Áreas de sobreposição indicam erros de discriminação e de validação cruzada. As elipses representam intervalo de confiança de 95%.

*Leptoconops brasiliensis* Grupo 2 - Grupo 3

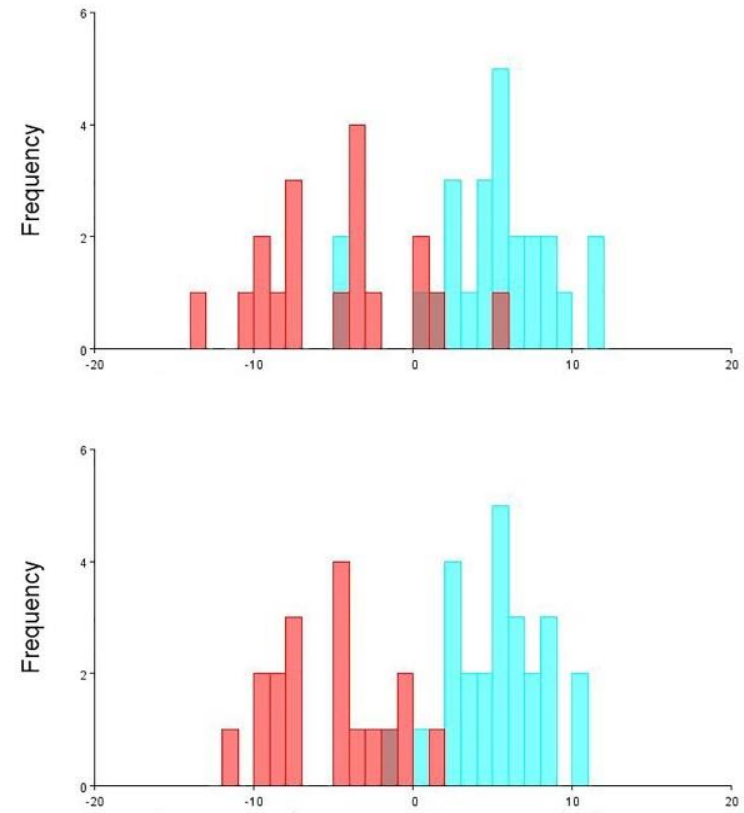
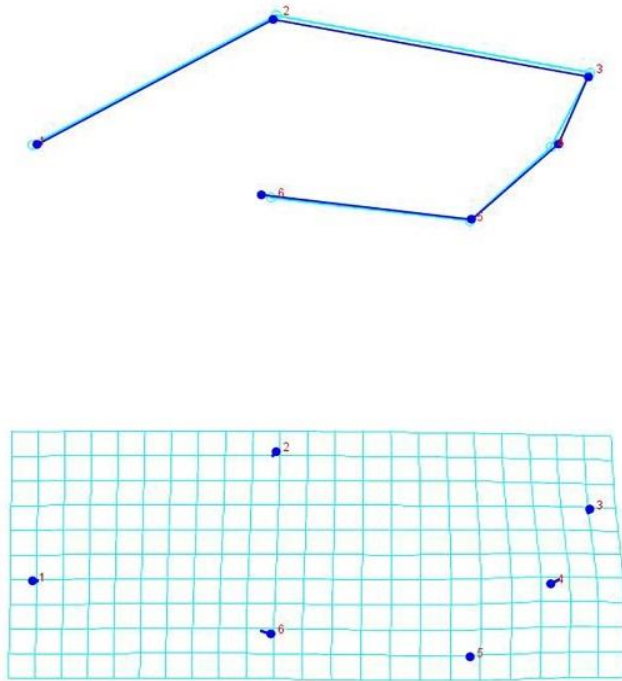


Figura 17 (49). Função Discriminantes (FD) e de Validação Cruzada (VC) par a par de todos os espécimes examinados de *Leptoconops brasiliensis*: Vermelho - grupo 2, população de Humaitá-AM; e azul - grupo 3, população de Itaituba-PA. Áreas de sobreposição indicam erros de discriminação e de validação cruzada. As elipses representam intervalo de confiança de 95%.

O dendrograma UPGMA usando a dP entre as populações de *L. brasiliensis* de Marapanim, Humaitá e Itaituba indicaram que as populações Humaitá e Itaituba como as mais semelhantes e a população de Marapanim como a mais divergentes em relação as outras duas populações (Figura 18). Todas as comparações pareadas entre as populações exibiram disparidade métrica significativa ( $p < 0,05$ ). Esses resultados indicam que as distâncias geográficas podem estar a segregar as três populações de *L. brasiliensis*. Esse fato pode ocorrer pela distância das populações devido a sua distribuição geográfica.

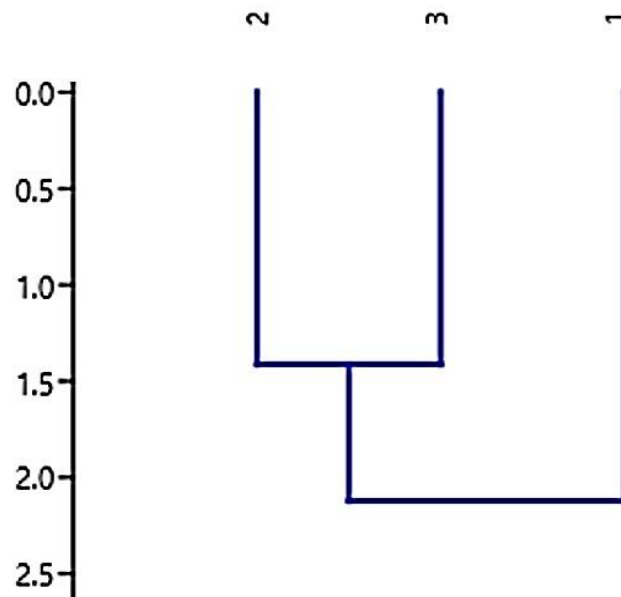


Figura 18 (50). Dendrograma UPGMA com base em distâncias euclidianas obtidas de dados morfométricos tradicionais, que descrevem divergências de forma para as três populações de *Leptoconops brasiliensis*: grupo 1, população de Marapanim-PA; grupo 2, população de Humaitá-AM; e grupo 3, população de Itaituba-PA. Todas as distâncias foram significativas ( $p < 0,0001$ ).

Arcanjo et al. <sup>(55)</sup> mostraram através de MG de populações de *Aedes aegypti* Linnaeu (Culicidae) que as barreiras naturais e antrópicas foram capazes de segregar a população de mosquitos em uma mesma cidade, e associaram que tanto as barreiras naturais quanto as antrópicas foram capazes de influenciar a dinâmica de *A. aegypti* em uma mesma área urbana. Também, é possível que a vicariação ecológica tenha contribuído para a segregação dessas

populações, principalmente por meio de mudanças geológicas e climáticas, como visto entre outros organismos na região amazônica <sup>(56)</sup>.

Muñoz-Muñoz et al. <sup>(57)</sup> apontaram que as mudanças na forma das asas entre populações coespecíficas distantes de *Culicoides* (Ceratopogonidae), não foram resultado da variação de tamanho, e sugeriram que diferenças genéticas poderiam surgir como adaptação espécie-específica a ambientes particulares, exemplo a variação da forma de populações conspecíficas ao longo de clines latitudinais e dos fatores ambientais subjacentes, além de modelar a forma da asa em espécies de *Culicoides* com ampla distribuição geográfica particulares.

#### **3.4 Análise genética para três populações de *Leptoconops brasiliensis* da Região Amazônica brasileira**

O DNA Barcode foi obtido de nove espécimes de *L. brasiliensis*, sendo: cinco espécimes do Município de Marapanim; três espécimes do município de Itaituba, ambas para o Estado do Pará; e uma sequência do município de Assis Brasil, Acre. Mais sequências estão sendo aguardadas da plataforma de sequenciamento, sendo esse um resultado preliminar.

Estudos mostram capacidade discriminatória do DNA Barcode para diferenciar espécies, populações e complexos de espécie, exemplo, na análise taxonômica do complexo *Lutzomyia umbratilis* (Psychodidae), Freitas et al. <sup>(17)</sup> mostraram que o marcador COI utilizado apresentou alta capacidade discriminatória; demonstrando assim a presença de dois clados nas populações da Amazônia Central e do Nordeste.

A análise intrapopulacional apresentou alta diversidade haplotípica (0,66667) e baixa diversidade nucleotídica (0,00136) para população de Itaituba. A população de Marapanim não apresentou diversidade haplotípica e nucleotídica (Tabela 2). Os valores de diversidade nucleotídica e haplotípica podem variar entre 0 e 1. O maior número de haplótipos foi observado

nas populações de Itaituba, o que mostra que essas populações possuem maior nível de diversidade genética.

Com relação às análises interpopulacionais, foi observado valores significativos para divergência genética entre os grupos (Tabela 3). Os valores do  $F_{st}$  (0,98837) obtidos demonstram bem o nível de diferença existente entre as populações de *L. brasiliensis* de Itaituba versus Marapanim (Tabela 3). Outro índice que reforça a ideia de divergência interpopulacional está relacionado aos números de sítios fixados e sítios compartilhados para cada uma das populações. Entre as populações *L. brasiliensis* de Marapanim e Itaituba foram obtidos valores significativos para o número de sítios fixados (Tabela 3), sugerindo uma divergência interpopulacional.

Para a análise de distância genética foi incluída uma amostra do Acre, essa análise revelou valores significativos (0,057-0,186) para as populações de *L. brasiliensis* de Marapanim, Itaituba e Acre (Tabela 4). Ao serem transformados estes valores em porcentagem indicam que exista entre 5.7% a 18.6% de diferença entre as populações, sendo que a população de Itaituba foi a única a apresentar uma pequena diferença intrapopulacional na distância genética (0,002) (Tabela 4). Na literatura tem sido sugerido que valores de distância genética superiores a 3% são indicativos de divergência entre as espécies de insetos quando usada a metodologia sugerida para o DNA Barcode.

**Tabela 2 (5).** Medidas de diversidade genética intrapopulacional das duas populações de *Leptoconops brasiliensis*, coletadas nos municípios de Itaituba e Marapanim, ambas no estado do Pará.

População	S	NS	H	$\pi$	Hd
Itaituba/PA	3	1	2	0,00136	0,66667
Marapanim/PA	5	0	1	0,00000	0,00000

S: Número de sequências; H: Número de haplótipo; NS: Número de locais segregadores; Hd: Diversidade haplotípica;  $\pi$ : Diversidade nucleotídica.

**Tabela 3 (6).** Variação genética entre as duas populações de *Leptoconops brasiliensis*, coletadas nos municípios de Itaituba e Marapanim, ambas no estado do Pará.

População	<i>F</i> <sub>st</sub>	Dxy	Da	Ss	Sf
Itaituba/PA X Marapanim/PA	0,98837	0,05862	0,05794	0	28

*F*<sub>st</sub>: Diferenciação genética em pares; Dxy: Número médio de substituições de nucleotídeos por sítios entre populações; Da: Número total de substituições de nucleotídeos por sítios entre populações; SS: Número de polimorfismos compartilhados entre as populações pareadas; Sf: Número de diferenças fixadas entre as populações pareadas.0

A análise de distância genética feitas com DNA Barcode, apesar de poucas amostras, foram congruentes com os resultados de MG, de asa, para as populações de *L. brasiliensis* de Itaituba e Marapanim, onde a AVC formou um claro agrupamento e a distância genética entre essas duas populações foi de aproximadamente 6%. As populações de Itaituba e Marapanim estão distantes geneticamente da amostra do Acre (aproximadamente 18%). Um número maior de amostras sequenciadas e uso de outros marcadores moleculares poderão contribuir e esclarecer a existência de espécies crípticas nas populações estudadas, e confirmar a presença de novas espécies, como consequência de processos como dispersão e/ou vicariância, surgidos pelas distâncias geográficas, onde os rios amazônicos servem como barreiras geográficas que diminuem consideravelmente o fluxo gênico entre populações.

Os *L. brasiliensis* de Humaitá, Itaituba e Acre foram coletados próximos a grandes rios como rio Madeira, rio Tapajós e rio Acre, respectivamente. Os rios Madeira, Tapajós e Tocantins (Localidade da espécie tipo de *L. brasiliensis*), bem como, os rios Negro, Xingu, Juruá, Trombetas, Jari, Purus, Araguaia, entre vários outros, contribuíram para a formação do eixo Solimões – Amazonas, tornando-o o maior rio em extensão e volume de água do planeta. A população *L. brasiliensis* de Marapanim foi coletado em área costeira, banhada pelo oceano atlântico. A região é caracterizada como uma zona estuarina, com importantes ambientes



relacionados, exemplo dos manguezais, que por sua vez estão sendo influenciados pela dinâmica tanto do fluxo fluvial, quanto de correntes de maré <sup>(58)</sup>.

Freitas et al. <sup>(17)</sup> em estudo com populações de flebotomíneos, mostraram com a análise das variáveis canônicas do formato da asa e estudos genéticos, que a população de *Lu. umbratilis* de Rio Preto da Eva (Amazonas) está significativamente mais próxima da população de Recife (Pernambuco), e ambas as populações estavam geneticamente distantes de Manacapuru (Amazonas), sugerindo a existência de um complexo de espécies de *Lu. umbratilis* nas regiões Norte e Nordeste.

Em *Culicoides*, a caracterização do DNA fornece um meio ímpeto para entender a disparidade morfológica e funcional dentro do gênero, e quando usadas em conjunto com a morfologia, essas técnicas podem ajudar a resolver complexos de espécies e investigar a plasticidade fenotípica <sup>(59,60)</sup>.

**Tabela 4 (7).** Distância genética para duas populações de *Leptoconops brasiliensis*, coletadas nos municípios de Itaituba e Marapanim, ambas no estado do Pará.

Espécimes	1	2	3	4	5	6	7	8	9
LepA61.Marapanim	0,000								
Lep12.Marapanim	0,000	0,000							
Lep26.Itaituba	0,059	0,059	0,000						
LepA60.Marapanim	0,000	0,000	0,059	0,000					
Lep33.Itaituba	0,059	0,059	0,000	0,059	0,000				
Lep42.Marapanim	0,000	0,000	0,059	0,000	0,059	0,000			
LepA55.Acre	0,186	0,186	0,180	0,186	0,180	0,186	0,000		
LepA57.Marapanim	0,000	0,000	0,059	0,000	0,059	0,000	0,186	0,000	
LepA62.Itaituba	0,057	0,057	0,002	0,057	0,002	0,057	0,178	0,057	0,000

#### 4. CONCLUSÃO

A MG indicou que as populações de Humaitá e Itaituba como as mais semelhantes e a população de Marapanim como as mais divergentes em relação as outras duas populações, sendo que ACP mostra as populações de *L. brasiliensis* de Humaitá e Itaituba se sobrepõem, em parte, no morfoespaço.

A análise de distância genética feitas com DNA Barcode foram congruentes com os resultados de MG, de asa, para as populações de *L. brasiliensis* de Itaituba e Marapanim, onde a AVC formou um claro agrupamento e a distância genética sugere um possível complexo de espécie.

É possível que essas populações tenham passado por um processo de dispersão e/ou vicariância, surgidos pelas distâncias geográficas, onde os rios amazônicos servem como barreiras geográficas que diminuem consideravelmente o fluxo gênico entre populações.

Um número maior de amostras sequenciadas e uso de outros marcadores moleculares poderão contribuir e esclarecer a existência de um complexo de espécies nas populações estudadas, e confirmar a presença de novas espécies.

#### 5. REFERÊNCIAS

- 1- Downes JA, Wirth WW. Ceratopogonidae. In: Mcalpine JF, Peterson BV, Shewell GE, Teskey HJ, Vockeroth JR, Wood DM. Manual of Nearctic Diptera. Canada: Agriculture Canada.1981; 1. 674 p.

- 2- Borkent A, Spinelli GR. Neotropical Ceratopogonidae (Diptera: Insecta). In: Adis J, Arias JR, Rueda-Delgado G, Wantzen KM, editores. Aquatic biodiversity in Latin America. Moscow: Pensoft Publishers 2007; 198 p.
- 3- Trindade RL, Gorayeb IS. Atividade diária de maruins (Diptera: Ceratopogonidae) da zona costeira da Amazônia Oriental, Pará, Brasil. Bol Mus Para Emilio Goeldi Cienc Na. 2005a;1(3): 213-221.
- 4- Trindade RL, Gorayeb IS. Maruins (Ceratopogonidae: Diptera) do estuário do rio Pará e do litoral do Estado do Pará, Brasil. Entomol Vectores [Internet]. 2005 [citado em 14 de julho de 2021]; 12(1): 61-74. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0328-03812005000100005>
- 5- Pessoa FAC, Castellón EG, Medeiros JF, Camargo LMA. First occurrence of the human biting midge *Leptoconops brasiliensis* (Lutz) (Diptera: Ceratopogonidae) in the triple border of Brazil, Peru, and Bolivia. Rev Soc Bras Med Trop [Internet]. 2012 [citado em 14 de julho de 2021]; 45(1): 138–139. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0037-86822012000100030>
- 6- Farias ES, Pereira-Júnior AM, Almeida JF, Pessoa FAC, Medeiros JF. Hematophagous biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) from Tefé municipality, Amazonas state, Brazil. Check List [Internet]. 2015 [citado em 14 de julho de 2021]; 11(4):1676. Disponível em: <https://doi.org/10.15560/11.4.1676>
- 7- Santarém MC, Felipe-Bauer ML. Brazilian species of biting midges - espécies de maruins do Brasil (Diptera: Ceratopogonidae) 2021. [citado em 14 de julho de 2021]. [https://portal.fiocruz.br/sites/portal.fiocruz.br/files/documentos/brazilian\\_species\\_of\\_biting\\_midges\\_2021\\_0.pdf](https://portal.fiocruz.br/sites/portal.fiocruz.br/files/documentos/brazilian_species_of_biting_midges_2021_0.pdf)
- 8- Carrieri M, Montemurro E, Valentino SV, Bellini R. Study on the flying height of *Leptoconops noei* and *Leptoconops irritans* in southern Italy. Bull Insectology. 2007; 60(1): 83-87.
- 9- González MA, López S, Goldarazena A. New record of the biting midge *Leptoconops noei* in northern Spain: notes on its seasonal abundance and flying height preference. J Insect Sci [Internet] 2013 [citado em 14 de julho de 2021]; 13:45. Disponível em: <https://doi.org/10.1673/031.013.4501>

- 10- Lowrie RC, Raccurt CP, Eberhard ML, Katz SP. Assessment of *Leptoconops bequaerti* as a potential vector of *Mansonella ozzardi* in Haiti. Am J Trop Med Hyg [Internet]. 1983 [citado em 14 de julho de 2021]; 32(5): 1013-1015. Disponível em: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1983.32.1013>
- 11- Carrieri M, Montemurro E, Valentino SV, Bellini R. Study on the flying height of *Leptoconops noei* and *Leptoconops irritans* in southern Italy. Bull Insectology. 2007; 60(1): 83-87.
- 12- Rohlf FJ, Marcus LF. A revolution in morphometrics. Trends Ecol Evol [Internet]. 1993 [citado em 15 de julho de 2021]; 8(4): 129-132. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(93\)90024-J](https://doi.org/10.1016/0169-5347(93)90024-J)
- 13- Hernández-Triana LM, Crainey JL, Hall A, Fatih FA, Mackenzie-Dodds J, Shelley AJ et al. DNA barcodes reveal cryptic genetic diversity within the blackfly subgenus *Trichodagmia* Enderlein (Diptera: Simuliidae: *Simulium*) and related taxa in the New World. Zootaxa [Internet]. 2012 [citado em 15 de julho de 2021]; 3514: 43–69. Disponível em: <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3514.1.3>
- 14- Gómez GF; Jaramillo L, Correa MM. Wing Geometric morphometry and molecular assessment of members in the *Albitarsis* Complex from Colombia. Mol Ecol Resour [Internet]. 2013 [citado em 15 de julho de 2021]; 1082–1092. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12126>
- 15- Augot D, Sauvage F, Jouet D, Simphal E, Veuille M, Couloux A, et al. Discrimination of *Culicoides obsoletus* and *C. scoticus*, potential bluetongue vectors, by morphometrical and mitochondrial cytochrome oxidase subunit I analysis. Infect Genet Evol [Internet]. 2010 [citado em 15 de julho de 2021]; 10 (5): 629–637. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.03.016>
- 16- Henni HL, Sauvage F, Ninio C, Depaquit J, Augot D. Wing geometry as a tool for discrimination of *Obsoletus* group (Diptera: Ceratopogonidae: *Culicoides*) in France. Infect Genet Evol [Internet]. 2014 [citado em 18 de julho de 2021]; 21: 110-117. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.10.008>
- 17- Freitas MTS, Ríos-Velasquez CM, Costa CRJr, Figueiredo CA, Aragão NC, et al. Phenotypic and genotypic variations among three allopatric populations of *Lutzomyia umbratilis*, main vector of *Leishmania guyanensis*. Parasit Vectors [Internet]. 2015 [citado

- em 18 de julho de 2021]; 8(1):448. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1051-7>
- 18- Pinto IS, Chaga BD, Rodrigues AAF, Ferreira AL, Rezende HR, Bruno RV, et al. DNA Barcoding of Neotropical Sand Flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): Species Identification and Discovery within Brazil. PLoS One [Internet]. 2015 [citado em 18 de julho de 2021]; 10(10): e0140636. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140636>
- 19- Sumruayphol S, Apiwathnasorn C, Ruangsittichai J, Sriwichai P, et al. DNA barcoding and wing morphometrics to distinguish three *Aedes* vectors in Thailand. Acta Trop [Internet]. 2016 [citado em 18 de julho de 2021]; 159: 1–10. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.03.010>
- 20- Lawing AM, Polly PD. Geometric Morphometrics: Recent Applications to the Study of Evolution and Development. J Zool [Internet]. 2009 [citado em 18 de julho de 2021]; 280 (1): 1 -7. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2009.00620.x>
- 21- Dujardin JP. Morphometrics applied to medical entomology. Infect Gent Evol [Internet]. 2008 [citado em 18 de julho de 2021]; 8(6):875-890. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2008.07.011>
- 22- Lyra M, Hatadani L, Azeredo- Espin AML, Klaczko LB. Wing morphometry as a tool for correct identification of primary and secondary New World screwworm fly. Bull Entomol Res [Internet] 2010 [citado em 18 de julho de 2021]; 100: 19-26. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0007485309006762>
- 23- Calle DA, Quinones ML, Erazo HF, Jaramil-Lo NO. Morphometric Discrimination of females of five species of *Anopheles* of the subgenus *Nyssohrynychus* from Southern and Northwest Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz [Internet]. 2002 [citado em 19 de julho de 2021]; 97(8): 1191-1195. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000800021>
- 24- Hall M, MacLeod N, Wardhana AH. Use of wing morphometrics to identify populations of the Old-World screwworm fly, *Chrysomya bezziana* (Diptera: Calliphoridae): a preliminary study of the utility of museum specimens. Acta Trop [Internet] 2014 [citado em 19 de julho de 2021]; 138, 49-55. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.03.023>

- 25- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, Dewaard JR. Biological identifications through DNA Barcodes. *Proc Biol Sci* [Internet]. 2003 [citado em 19 de julho de 2021]; 270 (1512): 313-321. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- 26- Stur E, Borkent A. When DNA barcoding and morphology mesh: Ceratopogonidae diversity in Finnmark, Norway. *ZooKeys* [Internet]. 2014 [citado em 19 de julho de 2021]; 463:95-131. Disponível em: <https://doi.org/10.3897/zookeys.463.7964>
- 27- Wallace AR. On the monkeys of the Amazon. *J Nat Hist* [Internet]. 1852 [citado em 19 de julho de 2021]; 20: 107-110. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/037454809494374>
- 28- Fernandes AM, Wink M, Sardelli C, Aleixo A. Multiple speciation across the Andes and throughout Amazonia: the case of the spot-backed antbird species complex (*Hylophylax naevius*/*Hylophylax naevioides*). *J Biogeogr* [Internet]. 2014 [citado em 19 de julho de 2021]; 41(6): 1094–1104. Disponível em: <http://doi.org/10.1111/jbi.12277>
- 29- Freitas MTS, Ríos-Velasquez CM, Costa CRL, Figueirêdo CAS, Aragão NC, et al. Phenotypic and genotypic variations among three allopatric populations of *Lutzomyia umbratilis*, main vector of *Leishmania guyanensis*. *Parasit Vectors* [Internet]. 2015 [citado em 19 de julho de 2021]; 8(1):448. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1051-7>
- 30- Strickman D, Wirtz R, Lawyer P, Glick J, Stockwell S, Perich A. Meteorological effects on the biting activity of *Leptoconops americanus* (Diptera: Ceratopogonidae). *J Am Mosq Control Assoc*. 1995; 1:15-20.
- 31- FAPESPA- Fundação Amazônica de Amparo a Estudos e Pesquisa. Estatísticas Municipais Paraenses: Marapanim. Belém, Diretoria de Estatística e de Tecnologia e Gestão da Informação 2016 [citado em 19 de julho de 2021]. Disponível em: <http://www.fapespa.pa.gov.br/produto/estatisticamunicipal/98>
- 32- Berredo JF, Costa ML, Progene MPS. Efeitos das variações sazonais do clima tropical úmido sobre as águas e sedimentos de manguezais do estuário do rio Marapanim, costa nordeste do Estado do Pará. *Acta Amaz* [Internet]. 2008 [citado em 19 de julho de 2021]; 38(3): 473-82. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0044-59672008000300012>
- 33- SUDAM - Superintendência do Desenvolvimento da Amazônia (SUDAM). Atlas climatológico da Amazônia brasileira 1984; 125 p.

- 34- Martorano LG, Pereira LC, Cesar EGM, Pereira ICB. Estudos climáticos do Estado do Pará, classificação climática (Koppen) e deficiência hídrica (Thornthwhite, Mather). Belém, SUDAM, EMBRAPA 1993.
- 35- IDESP- Instituto de Desenvolvimento Econômico, Social e Ambiental do Pará. Estatística Municipal de Marapanim. [citado em 19 de julho de 2021]. Disponível em: <http://www.idesp.pa.gov.br/paginas/produtos/EstatisticaMunicipal/pdf/Marapanim.pdf>
- 36- Filho JST, Gomes JM, Merlotti F, Menezes JA, Cunha JM. Análise Da Composição Química das Precipitações Pluviométricas na Cidade De Humaitá/Am. Revista Educa Amazônia 2014; 12: 113-126.
- 37- Costa JBS, Bemerguy RL, Hasui Y, Borges MS. Tectonics and paleogeography along the Amazon River. J South Am Earth Sci [Internet]. 2001 [citado em 20 de julho de 2021]; 14 (4): 335-347. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0895-9811\(01\)00025-6](https://doi.org/10.1016/S0895-9811(01)00025-6)
- 38- Rossetti DF, Toledo PM, Góes AM, 2005. New geological framework for Western Amazonia (Brazil) and implications for biogeography and evolution. Quat Res [Internet]. 2005 [citado em 20 de julho de 2021]; 63 (1): 78-89. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.yqres.2004.10.001>
- 39- Quesada CA, Lloyd J, Anderson LO, Fyllas NM, Schawarz M, Czimczik CI. Soils of Amazonia with particular reference to the RAINFO sites. Biogeosciences [Internet]. 2011 [citado em 20 de julho de 2021]; 8: 1415-1440. Disponível em: <https://doi.org/10.5194/bg-8-1415-2011>
- 40- Carvalho AM. Caracterização física, química e mineralógica dos solos do município de Humaitá-AM [Tese]. Botucatu: Universidade do Estado de São Paulo; 1986. 166p.
- 41- ICMBio- Instituto Chico Mendes De Conservação Da Biodiversidade. Plano De Manejo Das Florestas Nacionais De Itaituba I E De Itaituba II. Volume I – Diagnóstico 2014 [citado em 20 de julho de 2021]; 129 p. Disponível em: [https://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/docs-planos-de-manejo/flona\\_itaitubaleII\\_pm\\_v1-1.pdf](https://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/docs-planos-de-manejo/flona_itaitubaleII_pm_v1-1.pdf)
- 42- Wirth WW, Marston N. Method for mounting small insects on microscope slides in Canada balsam. Ann Entomol Soc Am. 1968; 61(3): 783–784.



- 43- Clastrier J, Wirth WW. The *Leptoconops kerteszi* complex in North América (Díptera: Ceratopogonidae). United States Department of Agriculture Technical 1978. Bulletin Number, 1573, 58 p.
- 44- Lutz A. Contribuição para o estudo das Ceratopogoninas hematófagas encontradas no Brasil. Mem Inst Oswaldo Cruz [Internet]. 1912 [citado em 24 de julho de 2021]; 4 (1): 1-33. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0074-02761912000100001>
- 45- Ronderos MM, Spinelli GR. A key to the Neotropical *Leptoconops* (Diptera: Ceratopogonidae), with the description of the new species from Argentina. Rev Soc Entomol Argent.1992; 51: 41-45.
- 46- Cêtre-Sossah C, Baldet T, Delécolle JC, Mathieu B, Perrin A, Grillet C, et al. Molecular detection of *Culicoides* spp. and *Culicoides imicola*, the principal vector of bluetongue (BT) and African horse sickness (AHS) in Africa and Europe. Vet Res [Internet]. 2004 [citado em 24 de julho de 2021]; 35(3): 325-37. Disponível em: <https://doi.org/10.1051/vetres:2004015>
- 47- Augot D, Mathieu B, Hadj-Henni L, Barriel V, Mena SZ, Smolis S, et al. Molecular phylogeny of 42 species of *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae) from three continents. Parasite [Internet]. 2017 [citado em 24 de julho de 2021]; 24:23. Disponível em: <https://doi.org/10.1051/parasite/2017020>
- 48- Staden R. The Staden sequence analysis package. Mol Biotechnol [Internet]. 1996 [citado em 24 de julho de 2021]; 5(3):233-41. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF02900361>.
- 49- Excoffier L, Lischer HE L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Mol Ecol Resour [Internet]. 2010 [citado em 24 de julho de 2021]; 10 (3): 564-567. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
- 50- Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. Bioinformatics [Internet]. 2003 [citado em 24 de julho de 2021]; 19: 2496-2497. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg359>
- 51- Dujardin JP. Modern Morphometrics of Medically Important Arthropods, in: Genetics and Evolution of Infectious Diseases: Second Edition [E-book na Internet]. Amsterdam:

- Elsevier; 2017 [citado em 25 de julho de 2021]. 285– 311 p. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799942-5.00013-5>
- 52- Fordyce, JA. The evolutionary consequences of ecological interactions mediated through phenotypic plasticity. *J Exp Biol* [Internet]. 2006 [citado em 25 de julho de 2021]; 209: 2377–2383. Disponível em: <https://doi.org/10.1242/jeb.02271>
- 53- Borkent A, Spinelli GR. Catalog of the new world biting midges south of the United States of America (Diptera: Ceratopogonidae). *Contribution on Entomology, International* 2000; 4(1):1-107.
- 54- Klingenberg CP e Gidaszewski NA. Testing and quantifying phylogenetic signals and homoplasy in morphometric data. *Syst Biol* [Internet]. 2010 [citado em 25 de julho de 2021]; 59 (3): 245 – 261. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/sysbio/syp106>
- 55- Arcanjo DBMC, Vidal PO, Santos JYG, Venancio LPR, Suesdek L, Amorim JH. 1, Brazil. *Rev Bras Entomol* [Internet]. 2020 [citado em 25 de julho de 2021]; 64 (1): e201960. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1806-9665-rbent-2019-60>
- 56- Gascon C, Williamson GB, Fonseca GAB. Receding forest edges and vanishing reserves. *Science* [Internet]. 2000 [citado em 25 de julho de 2021]; 288 (5470): 1356-8. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.12.018>
- 57- Muñoz-Muñoz F, Talavera S, Carpenter S, Nielsen SA, Werner D, Pagès N. Phenotypic differentiation and phylogenetic signal of wing shape in western European biting midges, *Culicoides* spp., of the subgenus *Avaritia*. *Med Vet Entomol* [Internet]. 2014 [citado em 25 de julho de 2021]; 28(3):319–329. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/mve.12042>
- 58- Borba TAC. Morfodinâmica e hidrodinâmica de praias do litoral Nordeste Paraense, Brasil [Trabalho de Conclusão de Curso]. Belém: Faculdade de Oceanografia da Universidade Federal do Pará 2011 [citado em 26 de julho de 2021]; 1-39 p. Disponível em: <https://bdm.ufpa.br:8443/jspui/handle/prefix/1867>
- 59- Pagès N, Muñoz-Muñoz F, Talavera S, Sarton V, Lorca C, Núñez JI. Identification of cryptic species of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in the subgenus *Culicoides* and development of species-specific PCR assays based on Barcode regions. *Vet Parasitol* [Internet]. 2009 [citado em 26 de julho de 2021]; 165: 298-310. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.07.020>

60-Harrup LE, Bellis GA, Balenghien T, Garros C. *Culicoides* Latreille Diptera: (Ceratopogonidae) taxonomy: Current challenges and future directions. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2015 [citado em 26 de julho de 2021]; 30:249–66. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.12.018>

### CAPÍTULO III

#### **TAXONOMIA INTEGRATIVA PARA DISCRIMINAÇÃO DE ALGUMAS ESPÉCIES DE *Culicoides* (DIPTERA: CERATOPOGONIDADE) NA AMAZÔNIA**

Emanuelle de Sousa Farias<sup>1,2</sup>, Sanmya Silva dos Santos<sup>1,3</sup>, Jokebede Melynda dos Santos Paulino-Rosa<sup>1,5</sup>, Luiz de Souza Coelho<sup>5</sup>, Ana Carolina Vicente<sup>6</sup>, Claudia María Ríos-Velásquez<sup>1</sup>, Felipe Arley Costa Pessoa<sup>1</sup>

1. Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ. Laboratório de Ecologia e Doenças Transmissíveis na Amazônia, Manaus, Amazonas, Brasil.
2. Instituto Oswaldo Cruz-IOC/FIOCRUZ. Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.
3. Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ. Programa de Bolsa de Iniciação Científica – PIBIC/CNPq
4. Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Interação Patógeno Hospedeiro, Manaus, Amazonas, Brasil.
5. Instituto Nacional de Pesquisa na Amazônia- INPA, Laboratório de Inventário Florístico e Botânica Econômica, Manaus, Amazonas.
6. Instituto Oswaldo Cruz – IOC. Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos

#### **Autor correspondente**

Correspondente para Emanuelle de Sousa Farias, Instituto Leônidas e Maria Deane - FIOCRUZ Amazônia, Laboratório de Ecologia e Doenças Transmissíveis na Amazônia, Rua Terezina, 476, Adrianópolis, Manaus, Amazonas, CEP 69.057-070, Brasil. Telefone (92) 984125634. E-mail: emanuellefarias82@gmail.com

## RESUMO

O gênero *Culicoides* é o mais conhecido da família Ceratopogonidae, as fêmeas são hematófagas e alimentam-se de sangue de animais vertebrados. Suas picadas podem causar reações alérgicas e/ou podem transmitir agentes patogênicos como vírus, protozoários e filárias. Esta classificação é exclusivamente com base em semelhanças morfológicas. Em patógenos transmitidos biologicamente por vetores, as características fenotípicas e genéticas do vetor desempenham um papel fundamental na determinação da epidemiologia da transmissão. Diferenças sutis na biologia e ecologia de espécies intimamente relacionadas podem exercer efeitos significativos sobre a probabilidade de transmissão, os mais importantes dos quais são a competência vetorial e a preferência de hospedeiros. Estudos realizados em diversas famílias de dípteros vetores através da taxonomia integrada com o uso de caracteres morfológicos, morfométricos e genéticos têm sido importantes para elucidar diversidade biológica oculta. O presente estudo visa o uso da taxonomia integrada para delimitar espécies do gênero *Culicoides* da Amazônia, bem como, subgêneros/grupos e populações de espécies vetores como *C. insignis* e *C. paraensis*. Para isso usou-se a morfometria geométrica que é uma ferramenta que permite analisar a variação da forma das estruturas, retirando o efeito do tamanho, orientação e posição. Foi usado também a ferramenta molecular DNA Barcode. As análises filogenéticas por Neighbor-Joining e Máxima Verossimilhança mostraram-se igualmente eficazes para a diferenciação das 12 espécies de maruins amazônicos, revelando valores de bootstrap para os clados entre 80-100%. A árvore filogenética baseada em Neighbor-Joining obteve 100% de suporte para todos os clados, demonstrando uma maior eficácia deste método perante as espécies analisadas. O resultado obtido a partir da reconstrução filogenética por Neighbor-Joining e Máxima Verossimilhança foi reforçado pela morfometria geométrica de asas realizada nessas espécies, sugerindo divergência entre estes grupos de maruins amazônicos avaliados neste estudo.

**PALAVRAS-CHAVE:** Taxonomia integrada; DNA Barcode; landmarks; *Culicoides*.

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Culicoides* é o mais importante da família Ceratopogonidae, as fêmeas são hematófagas e alimentam-se de sangue de animais vertebrados. São conhecidas 1.399 espécies de *Culicoides* em todo o mundo (52 espécies extintas), 299 espécies ocorrem na região Neotropical, 151 no Brasil e 123 espécies ocorrem na Bacia Amazônica brasileira <sup>(1,2)</sup>. Transmitem uma variedade de patógenos para vertebrados, inclusive ao homem <sup>(3-5)</sup>.

A classificação do gênero *Culicoides* inclui 32 subgêneros e 38 grupos, com 13% das espécies não agrupadas <sup>(6)</sup>. Esta classificação é exclusivamente com base em semelhanças morfológicas clássicas. No gênero *Culicoides* as asas possuem veia r-m cruzada, 1-2 células radiais e um segundo ramo do raio termina no meio da asa. Como a maioria das espécies apresentam asas com manchas claras ou escuras, com algumas exceções, hialinas, a identificação precisa dos adultos é amplamente baseada em variações sutis de tamanho, forma e posição das manchas que formam os padrões das asas <sup>(7,8)</sup>.

Variantes atípicas em padrões de asas são comumente observadas em várias espécies, por exemplo, *Culicoides newsteadi* Austen variantes N1, N2 e N3 <sup>(9)</sup>, *C. jurbergi* Felipe-Bauer <sup>(10)</sup>, *C. peruvianus* Felipe-Bauer <sup>(11)</sup>, bem como, algumas espécies relatadas no capítulo II: *C. leopoldoi* e *C. ruizi*, também apresentam variantes no padrão das manchas das asas.

Segundo Harrup et al. <sup>(12)</sup>, os principais desafios enfrentados pelos taxonomistas de *Culicoides* incluem o pequeno tamanho dos espécimes, uma classificação subgenérica mal definida, a falta de descrições para fases de vida e sexos conspecíficos, a falta de dados filogenéticos, variação intraespecífica em caracteres morfológicos diagnósticos, a identificação

e resolução de espécies potencialmente sinônimas e uma falta de consenso sobre a definição de distâncias genéticas intraespecíficas apropriadas.

A importância médica dos *Culicoides* é devido ao hábito hematofágico que pode causar reações alérgicas, provocadas pela picada, assim como, pela transmissão de agentes patogênicos como vírus, protozoários e filárias <sup>(4,5)</sup>. São vetores biológicos de vários protozoários hemossporídeos e estudos indicam que espécies de *Culicoides* podem estar envolvidas na transmissão da *Leishmania* Ross <sup>(13-15)</sup>.

*Culicoides* transmitem diferentes espécies de filárias, que tem como hospedeiro, anfíbios e mamíferos <sup>(16)</sup>. Na América do Sul, os *Culicoides* e simulídeos estão incriminados na transmissão das filárias *Mansonella ozzardi* Manson, *M. perstans* Manson e *M. streptocerca* Macfie & Corson ao homem e outros primatas <sup>(16,17)</sup>. A *M. perstans* tem sido encontrada em altas prevalências na África Ocidental e Central tanto em espécimes de *Culicoides* como em populações <sup>(18-20)</sup>, e na Amazônia <sup>(21)</sup>.

Na Região Neotropical, espécies de *Culicoides* são incriminadas na transmissão de vários arbovírus, o vírus da Língua Azul em animais e o vírus do Oropouche (OROV) no homem são os mais estudados <sup>(4)</sup>. Também são incriminadas, em outras regiões, na transmissão do Vírus Akabane, Vírus da Peste Equina Africana, Vírus Schmallerberg, vírus da Língua Azul (VLA) ou Bluetongue virus (BTV) entre outros <sup>(4,22,23)</sup>.

Nesse trabalho, duas espécies são vetores de patógenos, o *C. paraensis*, sendo essa espécie até o momento a única incriminada como a humanos como o OROV no Panamá, Peru e Brasil <sup>(24)</sup> e incriminada como vetor de nematoide *M. ozzardi*, na Argentina <sup>(25)</sup>. O OROV é uma das infecções por arbovírus humanos mais comuns no Brasil e mais de 30 surtos importantes e meio milhão de casos foram relatados desde que foi isolado pela primeira vez em 1955 em Trinidad e Tobago <sup>(26)</sup>. Isso torna esta doença viral uma séria ameaça à saúde pública

em áreas tropicais e subtropicais da América Central e do Sul <sup>(27)</sup>. *Culicoides paraensis* causam um incômodo significativo devida abundância da população, hábitos diurnos e suas atividades persistentes de picadas <sup>(28,29)</sup>, é a espécie mais difundida no Novo Mundo. Ocorre no sudeste dos Estados Unidos, no extremo norte da Pensilvânia e Wisconsin, e ao sul através da América Central e do Sul até o Uruguai (Salto) <sup>(11)</sup>.

*Culicoides insignis* é o principal vetor do BTV na Região Neotropical para ruminantes domésticos e selvagens <sup>(30)</sup>, e tem se mostrado um vetor competente dos sorotipos BTV 2 e BTV 11 em áreas Neotropicais <sup>(31)</sup>. Estudos apontam maior abundância de *C. insignis* na pastagem, em áreas de pecuária, sugerindo que os ambientes de pastagem associados a pecuária possuem características que favorecem a presença desta espécie <sup>(32-34)</sup>, podendo atuar como vetor para a expansão de sorotipos do Caribe, América Central e sul da Flórida e mais ao norte e para a expansão de sorotipos do norte dos EUA para o sul <sup>(35)</sup>. Além de seu papel como vetor de BTV, *C. insignis* picam por enxames, sendo, numerosas e são conhecidas por causar dermatite alérgica em cavalos e ovelhas <sup>(32,36)</sup>.

Em patógenos transmitidos biologicamente por vetores, as características fenotípicas e genéticas do vetor desempenham um papel fundamental na determinação da epidemiologia da transmissão <sup>(12)</sup>. Diferenças sutis na biologia e ecologia de espécies intimamente relacionadas podem exercer efeitos significativos sobre a probabilidade de transmissão, os mais importantes dos quais são a capacidade de se infectar e transmitir patógenos (competência vetorial) e o grau de associação com fontes de repasto sanguíneo <sup>(12)</sup>. A identificação correta das espécies é, portanto, essencial para a compreensão da epidemiologia da transmissão de doenças <sup>(12)</sup>.

Segundo Kipling et al. <sup>(37)</sup> o futuro real de ponta para a pesquisa sistemática e da biodiversidade é taxonomia integrativa, que usa um grande número de caracteres, incluindo DNA e muitos outros tipos de dados, para delimitar, descobrir e identificar espécies naturais e táxons significativos em todos os níveis. Utilizar técnicas de taxonomia integrada pode resolver



questões que dificultam a correta identificação das espécies, principalmente aqui na região amazônica, onde estudos faunísticos encontram um número elevado de morfótipos que não são identificados a nível de espécie, como por exemplo Farias et al. <sup>(38)</sup> encontraram 84 espécies, sendo 45 espécies válidas, e 39 morfótipos que apresentavam variações morfológicas. As tentativas de resolver essas questões podem ser alcançadas através do banco de dados de asa e banco de dados genéticos que somem a morfologia clássica.

A morfometria geométrica é uma ferramenta que permite analisar a variação da forma das estruturas, retirando o efeito do tamanho, orientação e posição. A análise se baseia no uso de coordenadas cartesianas de marcos anatômico e métodos de superposição (Análise Generalizada de Procrustes-AGP) <sup>(39)</sup>. Os pontos anatômicos (PARs ou Landmarks) de diferentes espécimes são sobrepostos por AGP, permitindo extrair o tamanho centróide, e, dessa forma, analisando separadamente a forma e o tamanho <sup>(40)</sup>. Os caracteres morfométricos podem ser analisados quanto ao tamanho e quanto à forma, sendo que possuem duas fontes principais de variação: uma de origem ambiental, principalmente relacionada ao tamanho; e outra de origem genética, relacionada à forma <sup>(40,41)</sup>.

As técnicas de MG têm sido muito aplicadas em diversos estudos envolvendo insetos de interesse médico como os mosquitos do gênero *Anopheles* <sup>(42,43)</sup>, *Aedes* <sup>(44,45)</sup> triatomíneos <sup>(40,46)</sup>, flebotomíneos <sup>(47-50)</sup> e *Culex* <sup>(51)</sup>. A MG é uma ferramenta robusta que corrobora os suportes moleculares para diferenciação de diversas espécies crípticas. Estudos com *Culicoides* utilizando morfometria geométrica baseada em marcos anatômicos tem sido utilizado em alguns poucos estudos <sup>(52-55)</sup>.

A caracterização do DNA fornece um novo meio para entender a disparidade morfológica e funcional dentro do gênero *Culicoides* <sup>(12)</sup>. Na Europa, tem crescido os estudos com o DNA <sup>(55-57)</sup>, regiões ribossomais (DNAr), como espaçador interno transcrito 1 (ITS1) <sup>(57-59)</sup> e espaçador interno transcrito 2 (ITS2) <sup>(60,61)</sup>, dentre outros em *Culicoides*. O uso dessa

ferramenta foi acelerado pela demanda de estudos em ecologia de vetores, por causa do surgimento de arbovírus zoonóticos em novas regiões, exigindo uma rápida caracterização da fauna local para responder a questões epidemiológicas na ausência de conhecimentos taxonômicos clássicos <sup>(62)</sup>.

O sistema de identificação molecular por Barcode foi proposto por Hebert et al. <sup>(63)</sup>. A técnica de DNA Barcode é uma ferramenta de apoio molecular à sistemática, baseando-se na sequência do gene *Citocromo Oxidase subunidade I* localizado no DNA mitocondrial. O surgimento do DNA Barcode e a falta de especialistas em taxonomia, possibilitaram a identificação rápida de espécies de *Culicoides* <sup>(9,15,55,64-67)</sup>. Nos últimos anos, o DNA Barcode ajudou substancialmente na identificação de *Culicoides*, revelando espécies potencialmente novas e "complexos de espécies" com grande variabilidade genética <sup>(56,68-70)</sup>. Estudos realizados com DNA Barcode demonstraram-se adequados para a discriminação de espécies de alguns subgêneros e grupos do gênero *Culicoides*, como por exemplos em: espécies de *Culicoides* do subgênero *Avaritia* <sup>(56,66,71)</sup>, *Culicoides* do subgênero *Culicoides* <sup>(56,69)</sup> e *Culicoides* do grupo *immaculatus* <sup>(72)</sup>.

O presente estudo visa o uso da taxonomia integrada para delimitar espécies do gênero *Culicoides*, bem como, subgêneros/grupos e populações de espécies vetores como *C. insignis* e *C. paraensis*.

## **2. METODOLOGIA**

### **2.1 Coletas de campo e triagem**

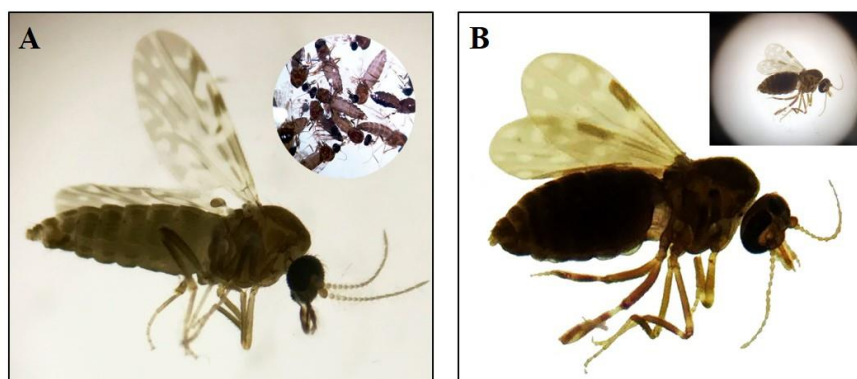
As coletas foram realizadas em diferentes áreas na Amazônia entre 2016 e 2018 em oito pontos nos estados do Amazonas, Pará e Rondônia (Figura 2). No estado do Amazonas foram dois pontos: municípios de Presidente Figueiredo, Rio Pardo (-1°49'01.0"S 60°19'03.7"W); e Tefé (3°19'34.2"S 64°42'39.0"W). No estado do Pará foram cinco pontos: Pedra Branca,

município de Itaituba (4°07'28.1"S 55°47'30.6"W); Serra da Escama, município de Óbidos (1°54'57.4"S 55°30'22.7"W); Boca do Figueiredo, rio Nhamundá, Oriximiná (1°53'21.7"S 56°05'33.9"W); comunidade Ícatu, Lago Sapucuá, Oriximiná (1°43'59.5"S 56°06'14.9"W); área urbana no município de Oriximiná (1°46'21.8"S 55°51'34.7"W). Um ponto no estado de Rondônia, município de Porto Velho (8°37'44.5"S 63°42'34.7"W).

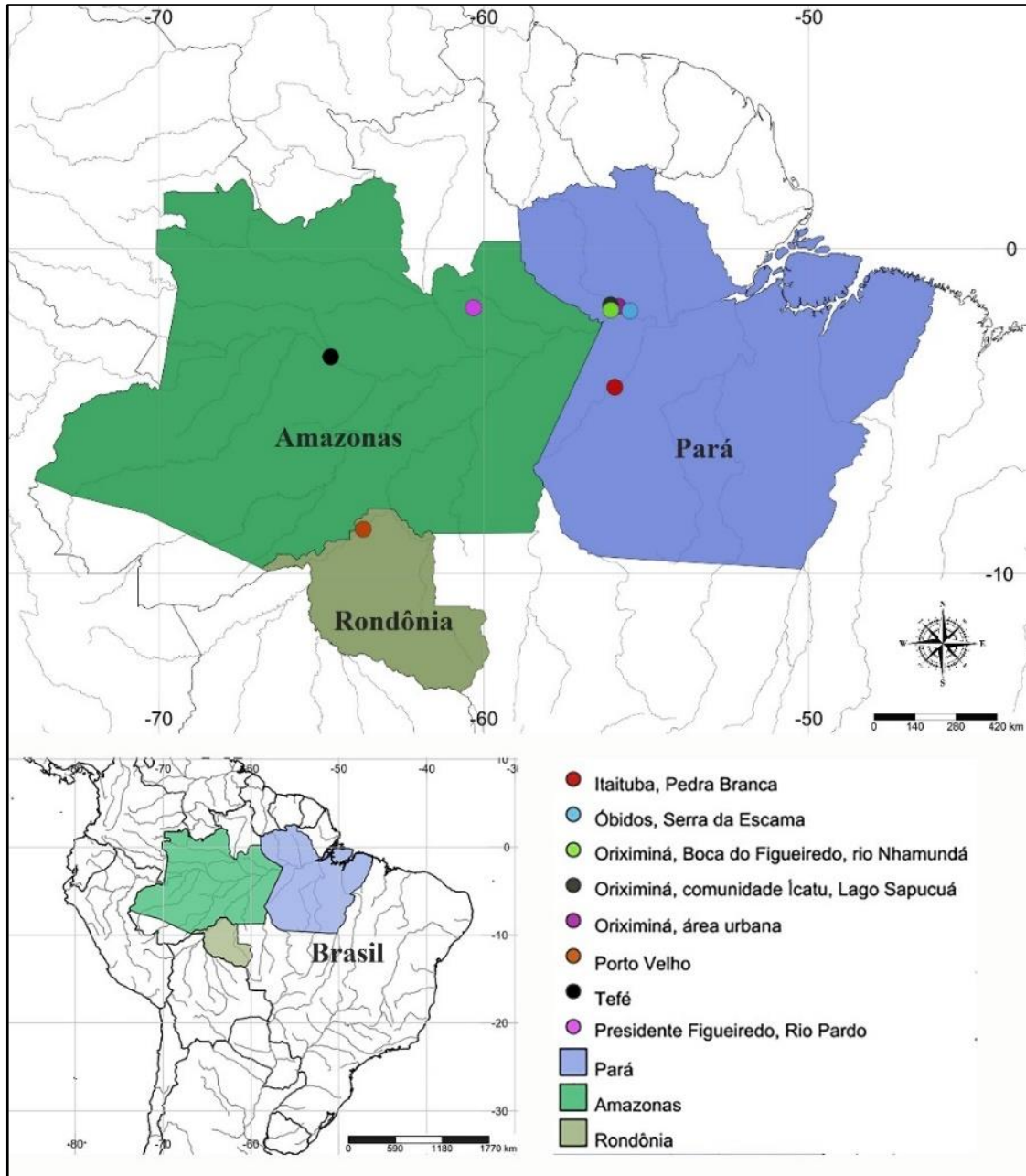
Após as coletas os *Culicoides* (Figura 1A-B) foram trados, separados por morfótipos e armazenados em tubos com álcool absoluto. O mapa foi confeccionado no simpleMapp (Http://www.simplemappe.net) e modificado no Adobe Photoshop 2020.

## 2.2 Preparação de lâminas para microscopia

Alguns exemplares de cada morfótipo foram processados individualmente no procedimento de dissecação para a montagem em lâmina para análise microscópica e identificação morfológica e análise de morfometria geométrica. Estruturas geminadas do lado direito como pernas e asa, posição ventral do inseto, e parte do abdome, foram armazenados em álcool absoluto e refrigeradas a -20°C para posterior extração de DNA. A asa esquerda, lado ventral do inseto, foi montada entre lâmina e lamínula sem tratamento com KOH, para identificação morfológica e marcação dos marcos anatômicos (Landmarks), as demais estruturas tratadas com KOH, foram montadas entre lâmina e lamínula em método fenol-bálsamo, conforme metodologia descrita por Wirth e Marston <sup>(73)</sup>.



**Figura 1 (51).** Fêmeas adultas de- A- *Culicoides insignis*; B- *C. paraensis*.



**Figura 2 (52).** Os mapas mostram a posição do estado do Amazonas, Pará e Rondônia, no Brasil, locais de coletas dos *Culicoides* utilizados nesse estudo.

### 2.3 Morfometria geométrica das asas

As imagens das asas foram sendo obtidas através de câmera digital JVC KY-F55B acoplada ao microscópio ótico, em aumento 10x, sendo selecionados oito pontos anatômicos de referência (PARs ou Landmarks), 1, 2 e 8 do tipo I (encontro entre dois tecidos) e 3-7 do tipo II (característica pontual) (Figura 3A-B). Os PARs estão nas seguintes posições da asa: (1)

entre a bifurcação do árculo basal com a veia radial, (2) entre a bifurcação da r-m com R1, (3) corresponde ao ápice costal, (4) veia M1, (5) veia M2, (6) veia na CuA1, (7) veia na CuA2, (8) entre a bifurcação da CuP com a veia CuA.

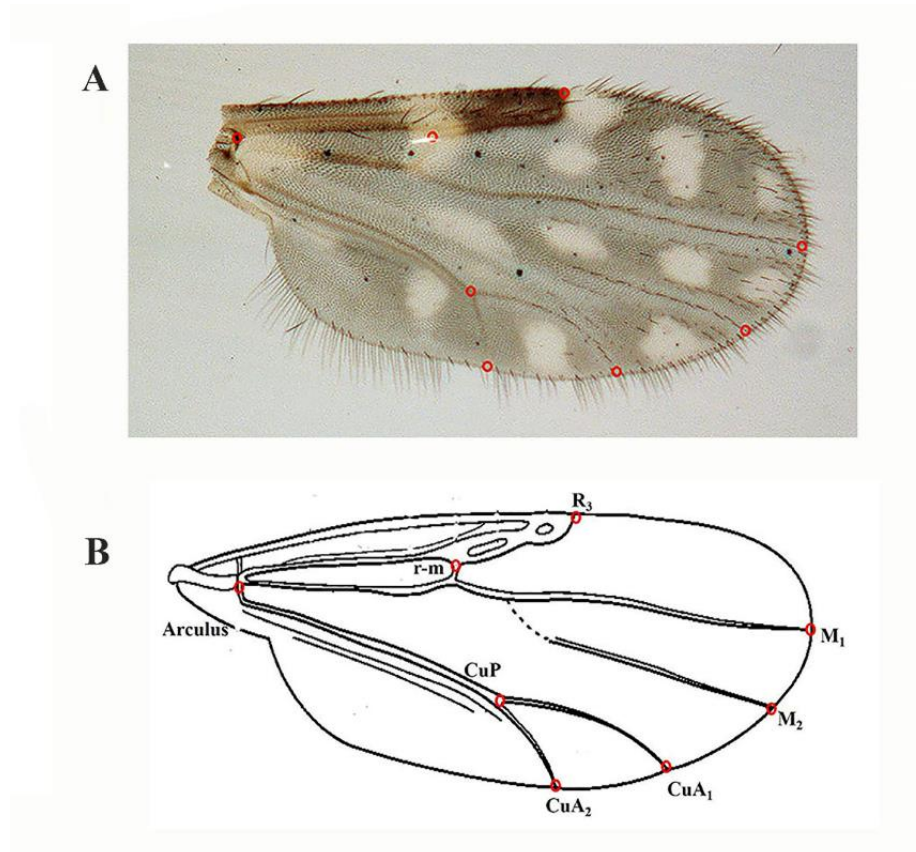


Figura 3 (53). Asas de fêmeas de a de *Culicoides paraensis*; modificada. Círculos em vermelho mostram os oito pontos anatômicos de referência-PARs.

A Morfometria Geométrica (MG) foi realizada comparando as 12 espécies do gênero *Culicoides* agrupadas em 17 grupos (Tabela 1), pois para as espécies vetores *C. paraensis* foi utilizada quatro populações de diferentes localidades e *C. insignis* foi utilizada três populações de diferentes localidades. Para todos os 17 grupos foram marcados oito PARs em duas dimensões. O conjunto de dados contiveram 328 observações, das quais todas foram incluídas para análises. A análise do Tamanho do Centróide (TC) da asa, foi estimada a partir das coordenadas dos PARs. Os valores de TC foram extraídos da matriz de coordenadas da asa de

cada indivíduo. Foi realizada uma ANOVA e um teste de Tukey, para mostrar as diferenças de TC e variação de forma entre 17 grupos de *Culicoides* estudados.

Foi realizada Análise Generalizada de Procrustes (GPA), seguida de Análise de Componentes Principais (CPA) com o teste ANOVA, e após confirmação das significâncias das diferenças, foi feita a análise classificatória usando de Análise de Variáveis Canônicas (ACV) (comparação entre os grupos) e comparações pareadas utilizando Funções Discriminantes (FD). Para avaliar a diferença entre os pares de espécies foi utilizada a análise discriminante com 1.000 testes de permutação, para medir acurácia. Para identificar se as diferenciações das populações são significativas, foi realizada uma MANOVA, que testa a igualdade dos vetores médios das populações multivariadas, e a significância das distâncias de Mahalanobis (dM) e distâncias de Procrustes (dP) após os testes de permutação.

As análises foram feitas com o auxílio de programas da série TPS, da série IMP (Integrated Morphometrics Package) de David Sheets, o software MorphoJ de C. Klingenberg e a linguagem de programação R (<http://www.r-project.org/>). Os dados referentes ao TC foram exportados do Tpsrelw32 e analisados utilizando análise de variância (ANOVA) com Teste de Tukey no programa Past 4.06.

#### **2.4 Extração de DNA, PCR e Sequenciamento**

As amostras de *Culicoides* foram preservados em álcool etílico absoluto 99,5% a 4° C, submetidos à extração individual seguindo o protocolo do Kit de extração (DNeasy® Blood & Tissue da QIAGEN)”.  
Tissue da QIAGEN)”.

O DNA extraído dos espécimes foi submetido à amplificação por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR – Polymerase Chain Reaction) usando a enzima GoTaq® DNA Polymerase (Promega), em um volume final de 25 µL, sendo usado 1 µL do DNA. Foram utilizados os primers LepF ATT CAA CCA ATC ATA AAG ATA TTG G; LepR TAA ACT TCT GGA TGT CCA AAA AAT CA direcionado ao DNA Barcode contido no gene

mitocondrial *Citocromo Oxidase subunidade I* (COI) <sup>(15,55,65-67)</sup>. A PCR foi feita nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94° C, 3 min; 5 ciclos de desnaturação a 94° C, 30 s; anelamento a 45° C, 1 min e 30 s; extensão a 68° C, 1 min; seguidos por 35 ciclos de desnaturação a 94° C, 30 s; anelamento a 51° C, 1 min e 30 s; Extensão a 68° C, 1 min; Extensão final a 68° C, 10 min; final 4° C ∞.

No intuito de avaliar o resultado da PCR os produtos foram visualizados em gel de agarose 2,0 % contendo 1 µL de Gel Red. Em seguida, os amplicons foram purificados usando o kit Wizard® SV Gel e PCR Clean-Up System kit (Promega® Fitchburg, Wisconsin, USA) quantificados em NanoDrop® e posteriormente diluídos para 10ng/ul. Após as reações de amplificação, o produto da PCR foi sequenciamento, utilizando-se o kit BigDye™ Terminator Cycle Sequencing v. 3.1 – Applied Biosystems.

Cada sequência gerada para o fragmento correspondente ao DNA Barcode foi avaliada quanto ao grau de confiabilidade de seus nucleotídeos usando um valor de PHRED igual ou acima de 30, através do pacote de programas Staden <sup>(74)</sup>. Todas as novas sequências criadas neste estudo serão depositadas no banco de dados GenBank (NCBI).

## 2.5 Análises filogenéticas

As sequências nucleotídicas correspondentes ao fragmento DNA Barcode foram alinhadas e editadas usando o software MEGA v. 5.0 <sup>(75)</sup>. Um alinhamento múltiplo foi realizado utilizando o programa Muscle <sup>(76)</sup>. As relações filogenéticas entre os haplótipos foram feitas através do método probabilístico de Máxima Verossimilhança utilizando o software PhyML <sup>(77)</sup>. O modelo evolutivo GTR +I + G foi o mais adequado ao conjunto de dados de acordo com o software jModelTest <sup>(78)</sup>. Também foi construída uma árvore filogenética através do método Neighbor-Joining <sup>(79)</sup>, usando a correção de Kimura 2 Parâmetros (K2P) <sup>(80)</sup>, incorporada ao software MEGA v.5.0 <sup>(75)</sup>. As espécies *Atrichopogon* sp. (HM431965.1) e *Forcipomyia* sp. (KX450776.1) foram selecionadas como outgroup para os métodos de

reconstrução filogenética. Nas duas abordagens filogenéticas foi utilizado o teste estatístico de suporte bootstrap com valor de 1.000 réplicas. Por fim, as sequências obtidas neste estudo foram submetidas a uma comparação por distância genética para cada uma das espécies. A dissimilaridade genética pode variar entre 0 e 1, sendo que quanto mais próximo de 1 mais distantes geneticamente são as espécies analisadas.

## 2.6 Diversidade genética

A diversidade genética intrapopulacional foi avaliada em termos de diversidade de haplótipos ( $H_d$ ), diversidade nucleotídeos ( $\pi$ ), número de sítios segregantes (NS) e número de haplótipos ( $h$ ); a diversidade foi mensurada usando Arlequin v. 3.5<sup>(81)</sup>. Análises quanto ao nível de diferenciação genética foram feitas com base no índice de fixação  $F_{ST}$  de forma pareada entre as populações usando o software Arlequin v. 3.5<sup>(81)</sup>. O número médio de substituições por sítios entre as populações ( $D_{xy}$ ), o número total de substituições por sítios entre as populações ( $D_a$ ), número de polimorfismos compartilhados entre as populações pareadas ( $S_s$ ) e o número de diferenças fixadas entre as populações pareadas ( $S_f$ ) foram calculados no software DnaSP v. 4.0<sup>(82)</sup>. Os valores do parâmetro diversidade haplotípica podem variar entre 0 e 1, sendo que quanto mais próximo de 1, maior a diversidade entre os haplótipos analisados.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para testar a identificação integrativa (morfologia clássica, morfometria geométrica e Barcode), utilizamos 12 espécies de *Culicoides* (diagnose no cap 2), sendo seis espécies para o subgênero *Hoffmania* Fox: *C. foxi* Ortíz, *C. fusipalpis* Wirth e Blanton, *C. insignis* Lutz, *C. plaumanni* Spinelli, *C. pseudodiabolicus* Fox e *C. ruizi* Forattini; quatro espécies para o subgênero *Haematomyidium* Goeldi: *C. debilipalpis* Lutz, *C. glabrior* Macfie, *C. jurutiensis*



Felippe-Bauer, *C. paraensis* Goeldi; e uma espécie não agrupada em subgênero, do grupo *reticulatus*: *C. paucienfuscatus* Barbosa.

A seleção de espécimes em estudos taxonômicos integrativos quase sempre é baseada inicialmente no exame morfológico. Os *Culicoides* adultos são notáveis por seu padrão característico de pigmentação das asas e distribuição de macrotríquias das asas, que em certas espécies pode ser usado como a principal característica diagnóstica <sup>(12)</sup>. No entanto, a identificação baseada na morfologia tem limitações e garante a integração dos dados moleculares e de morfometria geométrica. A identificação das espécies de *Culicoides* com base em morfologia clássica é difícil devido ao tamanho dos espécimes, dificuldade de montagem, perda de estruturas na montagem, pouca captura do macho, presença de complexo de espécies e espécies crípticas, bem como, a ocorrência de plasticidade fenotípica.

Das 12 espécies estudadas aqui, 11 são pela primeira vez sequenciadas no Brasil, sendo apenas *C. insignis* já sequenciada por Rios et al. <sup>(83)</sup>, e teve 87% de percentual de identidade com as sequências de *C. insignis* desse estudo (Blastn). Usando o DNA Barcode, nosso estudo apresenta a primeira análise de biologia molecular para o gênero *Culicoides* na região Amazônica brasileira. Essa região apresenta uma fauna de 9% das espécies válidas conhecidas no mundo, número baixo considerando a biodiversidade da região, mas quando se trata de Brasil, a fauna representa 81% das espécies válidas. O conhecimento da biodiversidade é importante, não apenas no campo da conservação, mas também quando as espécies têm um impacto econômico e de saúde, como os insetos envolvidos na transmissão de patógenos <sup>(84)</sup>.

### **3.1 Morfometria Geométrica de asa de fêmeas de *Culicoides* da Região**

#### **Amazônica brasileira**

Na MG consideramos 17 grupos, pois para as espécies de vetores: *C. paraensis* utilizamos quatro populações de diferentes localidades; e *C. insignis* utilizamos três populações

de diferentes localidades (Tabela 1). Para todos os 17 grupos foram marcados oito PARs em duas dimensões, contendo 328 observações.

**Tabela 1 (8).** Espécies de *Culicoides*, coletados em diferentes municípios na região Amazônica, distribuídos em 17 grupos para análise de morfometria geométrica - MG.

Grupos	Espécies	Nº de amostras	Localidade
1	<i>C. foxi</i>	19	Amazonas, Presidente Figueiredo, Rio Pardo
2	<i>C. fusipalpis</i>	23	Amazonas, Presidente Figueiredo, Rio Pardo
3	<i>C. hylas</i>	27	Amazonas, Presidente Figueiredo, Rio Pardo
4	<i>C. insignis</i>	10	Pará, Oriximiná, comunidade Nhamundá
5	<i>C. insignis</i>	13	Pará, Óbidos
6	<i>C. insignis</i>	23	Pará, Oriximiná, comunidade Sapucuí
7	<i>C. plaumanni</i>	14	Amazonas, Presidente Figueiredo, Rio Pardo
8	<i>C. pseudodiabolicus</i>	34	Amazonas, Presidente Figueiredo, Rio Pardo
9	<i>C. ruizi</i>	26	Pará, Oriximiná, comunidade Sapucuí
10	<i>C. debilipalpis</i>	16	Amazonas, Presidente Figueiredo, Rio Pardo
11	<i>C. glabrior</i>	29	Amazonas, Presidente Figueiredo, Rio Pardo
12	<i>C. jurutiensis</i>	5	Amazonas, Presidente Figueiredo, Rio Pardo
13	<i>C. paraensis</i>	10	Pará, Itaituba
14	<i>C. paraensis</i>	21	Pará, Oriximiná
15	<i>C. paraensis</i>	13	Rondônia, Porto velho
16	<i>C. paraensis</i>	19	Amazonas, Presidente Figueiredo, Rio Pardo
17	<i>C. paucienfuscatus</i>	26	Amazonas, Presidente Figueiredo, Rio Pardo

Na sobreposição Procrustes, primeiramente as imagens foram escalonadas para unidades do TC, então as coordenadas foram movidas para que o centroide permanecesse na posição (0,0) e finalmente na configuração ele foi girado em torno do centroide e obtido o melhor ajuste (Figura 4). A MG da variação das asas entre as espécies do subgênero *Culicoides* indicou que existem diferenças significativas nos dois componentes da forma, ou seja, tamanho e forma para os 17 grupos.

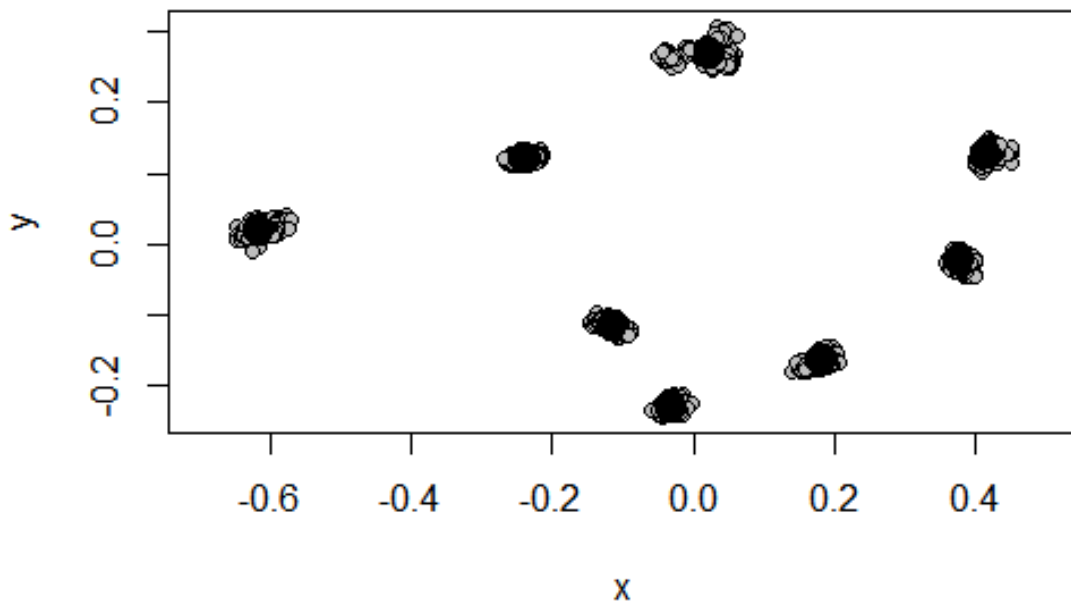
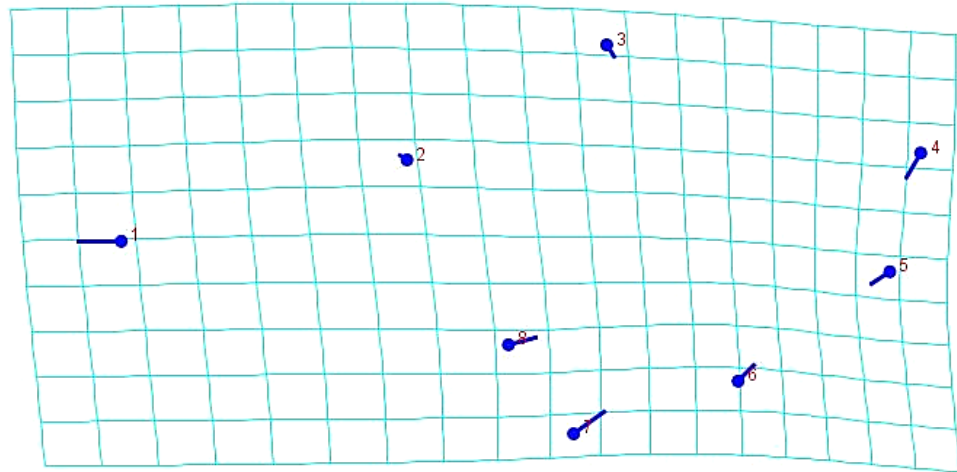


Figura 4 (54). Posições dos pontos de referência- PARs e a dispersão deles, de fêmeas das 12 espécies de *Culicoides* (17 grupos). Axis 1 vs 2.

Nos 17 grupos estudados aqui (Tabela 1), a análise do TC foi estimada a partir das coordenadas dos PARs. Os valores de TC foram extraídos da matriz de coordenadas PARs das asas de cada indivíduo. A ANOVA mostrou que as diferenças para o TC foram significativas entre os grupos ( $F = 197.8$ ;  $df = 16$ ,  $p = 2.731E-152$ ) e o teste de Tukey indicou que as variações ocorreram entre a maioria das espécies, sendo que algumas comparações entre grupos não apresentaram diferenças significativas (Tabela 2). O gráfico de boxplot mostra a amplitude da variação do TC entre os 17 grupos (Figura 6).

Para a variação de forma, após a sobreposição Procrustes, uma CPA baseada na matriz de covariância apresentou variáveis de forma dentro das amostras (17 grupos) e transformou essas variáveis em CP. Ao analisar as modificações na forma das asas nos CP, podemos observar que CP1 explica mais variações de forma com 61%, grande parte da variação ocorreu nos PARs  $1 > 7 > 4 > 8$  (1- entre a bifurcação do árculo basal com a veia radial, 7- veia na  $CuA_2$ , 4- veia  $M_1$  e 8- entre a bifurcação da  $CuP$  com a veia  $CuA$ , e, respectivamente) que sofreu

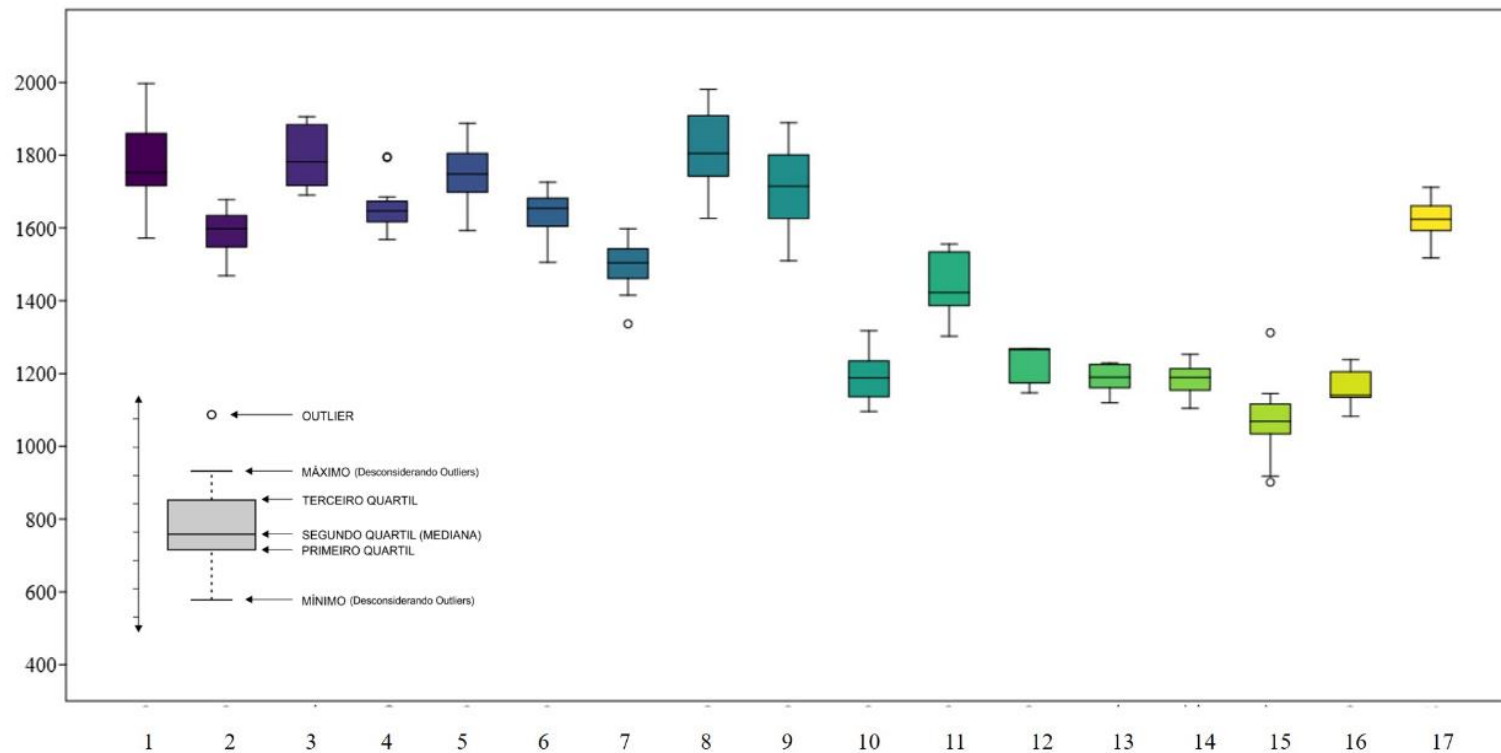
acentuado deslocamento (Figura 5), mostrando a importância desse marco anatômico para separar os subgêneros e espécies.



PC1

**Figura 5 (55).** Grades de deformação da forma da asa de *Culicoides* em relação a eixos cartesianos estabelecidos pelo componente principal.

Muñoz-Muñoz, et al. <sup>(53)</sup> apontaram que fatores como a temperatura tenham afetado o tamanho da asa, o formato da asa apresentou uma variação específica mais estável, permitindo a classificação adequada de uma alta porcentagem de espécimes. O formato da asa divergiu significativamente entre as espécies, mas não entre os locais de coleta e não dependia de temperatura, sugerindo uma variação específica mais estável do que o tamanho da asa. Muñoz-Muñoz et al. <sup>(53)</sup> também apontaram que cuidados devem ser tomados ao comparar o tamanho entre as espécies, porque efeitos ambientais podem ser confundidos com divergências em nível de espécie, especialmente se os táxons possuem diferentes fenologias, nichos ou áreas de distribuição.



**Figura 6 (56).** Diagrama Boxplot para o TC das asas de fêmeas dos 17 grupos de 12 espécies de *Culicoides*, subgênero *Hoffmania* (Grupos 1 a 9) - 1 *C. foxi*, 2 *C. fusipalpis*, 3 *C. hylas*, 4 *C. insignis* NHA, 5 *C. insignis* SAP, 6 *C. insignis* RP, 7 *C. plaumanni*, 8 *C. pseudodiabolicus*, 9 *C. ruizi*. Subgênero *Haematomyidium* (Grupos 10 a 16) - 10 *C. debilipalpis*, 11 *C. glabrior*, 12 *C. jurutiensis*, 13 *C. paraensis* ITA, 14 *C. paraensis* ORIX, 15 *C. paraensis* PV, 16 *C. paraensis* RP; e uma espécie não agrupada em subgênero, do grupo *reticulatus* (Grupos 17) - 17 *C. paucienfuscatus*. As linhas horizontais representam as medianas, os retângulos representam o intervalo interquartil, enquanto as linhas verticais informam os intervalos de variação.

**Tabela 2 (9).** Teste de Turkey para o tamanho do centroide de 17 grupos de 12 espécies de *Culicoides*.

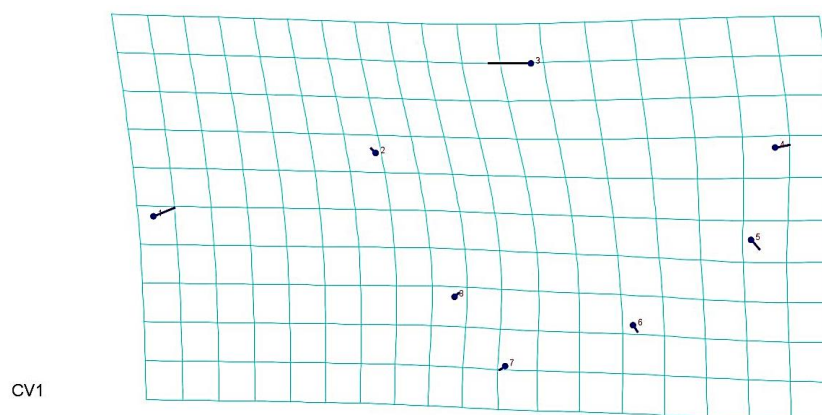
Espécies par a par	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1- <i>C. foxi</i>		7.66E-12	1	0.003541	0.9999	0.0002663	7.87E-13	0.8628	0.7399	7.87E-13	7.87E-13	7.87E-13	7.87E-13	7.87E-13	7.87E-13	7.87E-13	1.06E-07
2- <i>C. fuscipalpis</i>	11.17		7.01E-10	0.383	5.02E-10	0.7263	0.004154	9.29E-13	1.17E-07	7.87E-13	2.08E-08	9.39E-13	7.87E-13	7.87E-13	7.87E-13	7.87E-13	0.9085
3- <i>C. insignis</i> NHA	0.9833	10.15		0.003073	0.9816	0.000359	9.18E-13	1	0.5067	7.87E-13	7.88E-13	7.87E-13	7.87E-13	7.87E-13	7.87E-13	7.87E-13	1.44E-06
4- <i>C. insignis</i> OBD	5.983	3.771	6.033		0.05112	1	1.32E-07	2.02E-07	0.446	7.87E-13	1.35E-12	9.19E-13	7.87E-13	7.87E-13	7.87E-13	7.87E-13	0.9993
5- <i>C. insignis</i> SAP	1.438	10.23	2.191	4.922		0.006061	7.92E-13	0.1226	0.999	7.87E-13	7.87E-13	7.87E-13	7.87E-13	7.87E-13	7.87E-13	7.87E-13	6.62E-06
6- <i>C. plaumanni</i>	6.837	3.11	6.744	0.6606	5.789		1.20E-06	3.33E-09	0.1185	7.87E-13	4.95E-12	9.40E-13	7.87E-13	7.87E-13	7.87E-13	7.87E-13	1
7- <i>C. pseudodiabolicus</i>	17.67	5.926	15.14	8.92	17.1	8.358		7.87E-13	8.36E-13	7.87E-13	0.2721	1.44E-10	8.27E-13	7.87E-13	7.87E-13	7.87E-13	8.24E-08
8- <i>C. ruizi</i>	2.784	15.03	1.225	8.813	4.492	9.798	22.66		0.0009966	7.87E-13	7.87E-13	7.87E-13	7.87E-13	7.87E-13	7.87E-13	7.87E-13	9.44E-13
9- <i>C. hylas</i>	3.082	8.95	3.53	3.646	1.681	4.51	16.06	6.416		7.87E-13	7.87E-13	7.87E-13	7.87E-13	7.87E-13	7.87E-13	7.87E-13	0.000774
10- <i>C. debilipalpis</i>	31.66	22.37	27.6	23.01	31.63	22.78	18.74	36.46	31.13		9.37E-13	1	1	1	0.002252	0.9921	7.87E-13
11- <i>C. glabrior</i>	20.59	9.369	17.62	11.76	20.17	11.28	4.019	25.62	19.28	14.98		1.53E-06	9.53E-13	7.92E-13	7.87E-13	7.87E-13	9.55E-13
12- <i>C. jurutiensis</i>	20.09	13.44	19.13	15.09	19.56	14.76	10.51	22.39	18.84	1.265	8.296		0.9999	0.9986	0.0103	0.904	9.20E-13
13- <i>C. paraensis</i> ITA	27.84	19.57	25.18	20.74	27.54	20.45	16.16	31.49	26.89	0.3291	13.08	1.426		1	0.03151	0.9999	7.87E-13
14- <i>C. paraensis</i> ORIX	34.6	24.83	29.51	24.94	34.82	24.77	21.23	40.2	34.48	0.6381	17.02	1.728	0.2058		0.004494	0.9998	7.87E-13
15- <i>C. paraensis</i> PV	36.22	27.59	31.91	27.75	36.29	27.6	24.46	40.85	35.89	6.141	20.85	5.589	5.136	5.898		0.1274	7.87E-13
16- <i>C. paraensis</i> RP	35.22	25.69	30.23	25.77	35.42	25.61	22.22	40.65	35.08	2.015	18.12	2.65	1.411	1.491	4.471		7.87E-13
17- <i>C. paucienfuscatus</i>	8.974	2.633	8.311	1.633	7.905	0.9061	9.035	12.79	6.499	25.29	12.48	15.13	21.95	28.11	30.41	28.89	

Abaixo da diagonal, o valor de p é o mesmo acima da diagonal. As comparações significativas estão em cinza-Copenhaver-Holland 1988. NHA- população do Nhamundá, Oriximiná-PA; OBD- população de Óbidos -PA; SAP- população do Sapucaá, Oriximiná-PA; ITA- população do Itaituba-PA; ORIX- população de Oriximiná-PA, sede do município; PV- população de Porto Velho-RO; RP- população do Rio Pardo, Presidente Figueiredo-AM.

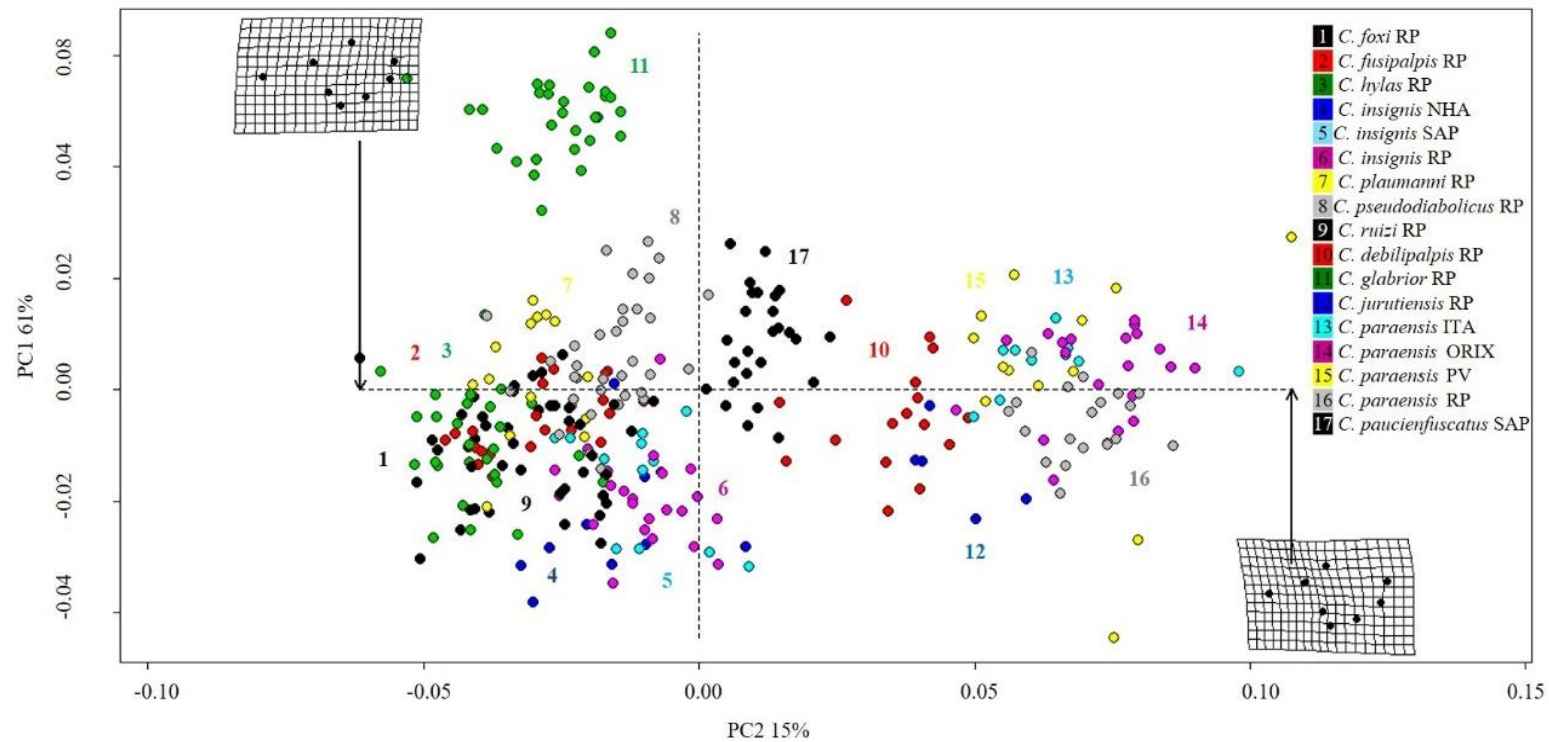
A ACP apresentou variância de forma acumulada de 76%, sendo CP1 com variância de 61% e CP2 com 15% (Figura 8). Nesse sentido o CP1 explica mais variações de forma do que o CP2 e sucessivamente, sendo que 95% de explicação da forma está nos 6 primeiros eixos de CPA. Para testar as diferenças de forma foi utilizada uma ANOVA de Procrustes. A análise de Variância de Procrustes mostrou diferença significativa na forma das asas entre os indivíduos de todas as espécies estudadas, bem como entre as populações de *C. paraensis* e *C. insignis* ( $F = 74,61$ ;  $df = 192$   $p < 0.0001$ ).

Após a retirada dos scores de regressão para retirar os efeitos alométricos, foi feita análise de variável canônica. Essa análise leva em consideração as diferenças no formato alar dentro dos grupos e entre os grupos que são subdivididos a priori (ao contrário da ACP). Por isso, podemos observar a separação mais nítida dos grupos.

Ao analisar as modificações na forma das asas na VC, podemos observar que VC1 explica mais variações de forma, e que grande parte da variação ocorreu nos marcos anatômicos 3 > 1 (MA 3- veia R3, MA 1- entre a bifurcação do árculo basal com a veia radial, respectivamente) que tiveram maior deslocamento (Figura 7), mostrando a importância desse marco anatômico para separar as espécies.



**Figura 7 (57).** Grades de deformação da forma da asa de *Culicoides* em relação a eixos cartesianos estabelecidos pelas variáveis canônicas.



**Figura 8 (58).** Análise de componentes principais para o primeiro componente (CP1 – 61%) e segundo componente (CP2 – 15%) dos 17 grupos de 12 espécies de *Culicoides*, subgênero *Hoffmania* (Grupos 1 a 9) - 1 *C. foxi*, 2 *C. fusipalpis*, 3 *C. hylas*, 4 *C. insignis* NHA, 5 *C. insignis* SAP, 6 *C. insignis* RP, 7 *C. plaumanni*, 8 *C. pseudodiabolicus*, 9 *C. ruizi*. Subgênero *Haematomyidium* (Grupos 10 a 16) - 10 *C. debilipalpis*, 11 *C. glabrior*, 12 *C. jurutiensis*, 13 *C. paraensis* ITA, *C. paraensis* ORIX, *C. paraensis* PV, *C. paraensis* RP; e uma espécie não agrupada em subgênero, do grupo *reticulatus* (Grupos 17) - *C. paucienfuscatus*. NHA- população do Nhamundá, Oriximiná-PA; OBD- população de Óbidos -PA; SAP- população do Sapucaá, Oriximiná-PA; ITA- população do Itaituba-PA; ORIX- população de Oriximiná-PA, sede do município; PV- população de Porto Velho-RO; RP- população do Rio Pardo, Presidente Figueiredo-AM.



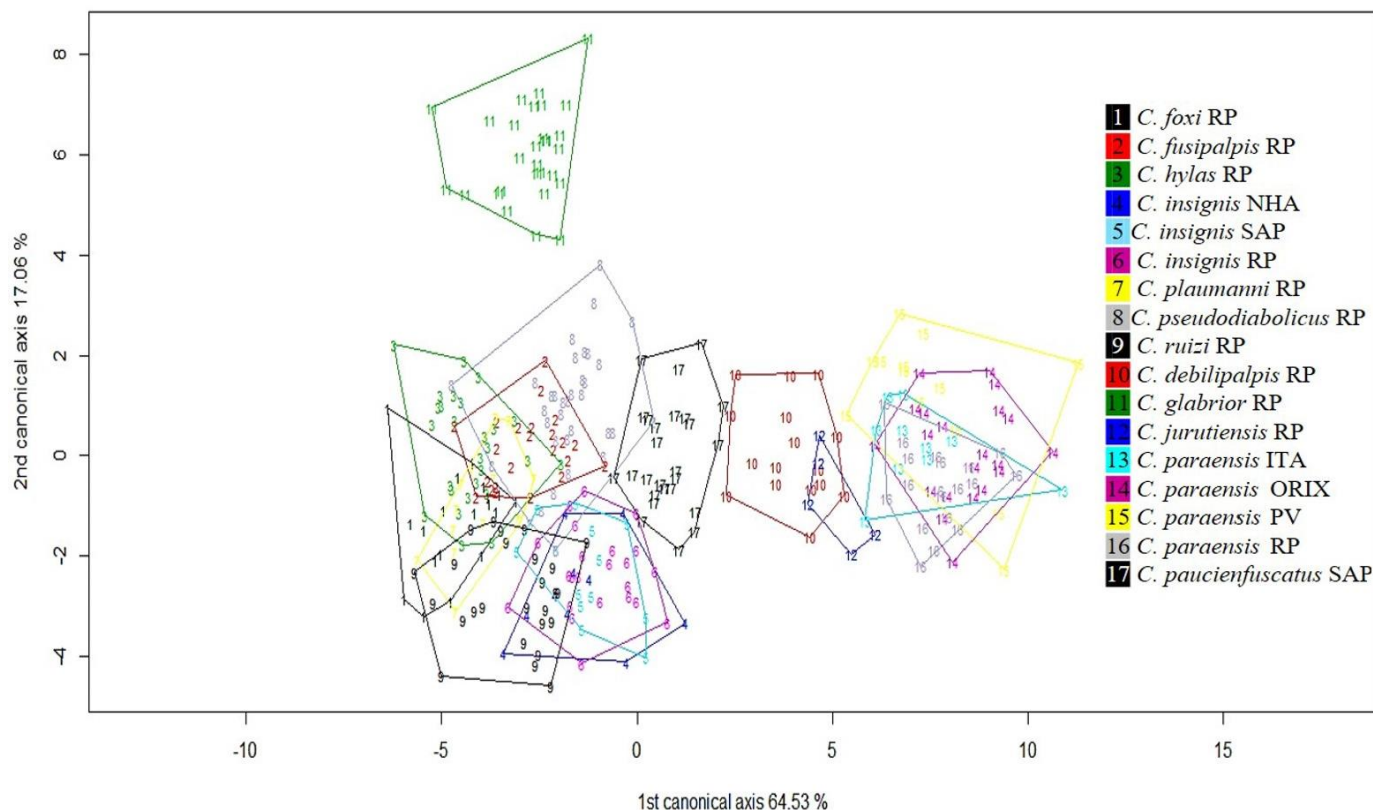
Na AVC, sem os scores de regressão, VC1 apresentou variância de 65% e VC2 de 17% (Figura 9). Os dois primeiros eixos da VC apresentaram uma variância de 82%, sendo que 95% da variação da forma acumulada estão acumuladas nos quatro primeiros eixos da VC. A AVC também foi realizada para separar os subgêneros/grupo, considerando *C. glabrior* fora do subgênero *Haematomyidium*, bem como, para separar as espécies dentro dos subgêneros *Hoffmania* e *Haematomyidium* e para as quatro populações de *C. paraensis* e três populações de *C. insignis*.

Tanto na ACP quanto na AVC observou-se um claro agrupamento da espécie *C. glabrior*, do Subgênero *Haematomyidium*, distante das demais espécies do subgênero. Henni et al. <sup>(55)</sup> usaram técnicas de taxonomia integrada em estudos com grupo *Obsoleto* na França, mostraram com a MG que a forma da asa de *C. scoticus* exibiu grande variabilidade específica; as análises morfométricas mostraram um alto grau de convergência da forma entre *C. obsoletus* e *C. scoticus*; e sugerimos que o grupo *Obsoletus* na Europa inclua apenas *C. obsoletus* e *C. scoticus*; e que *C. dewulfi* e *C. chiopterus* sejam excluídos.

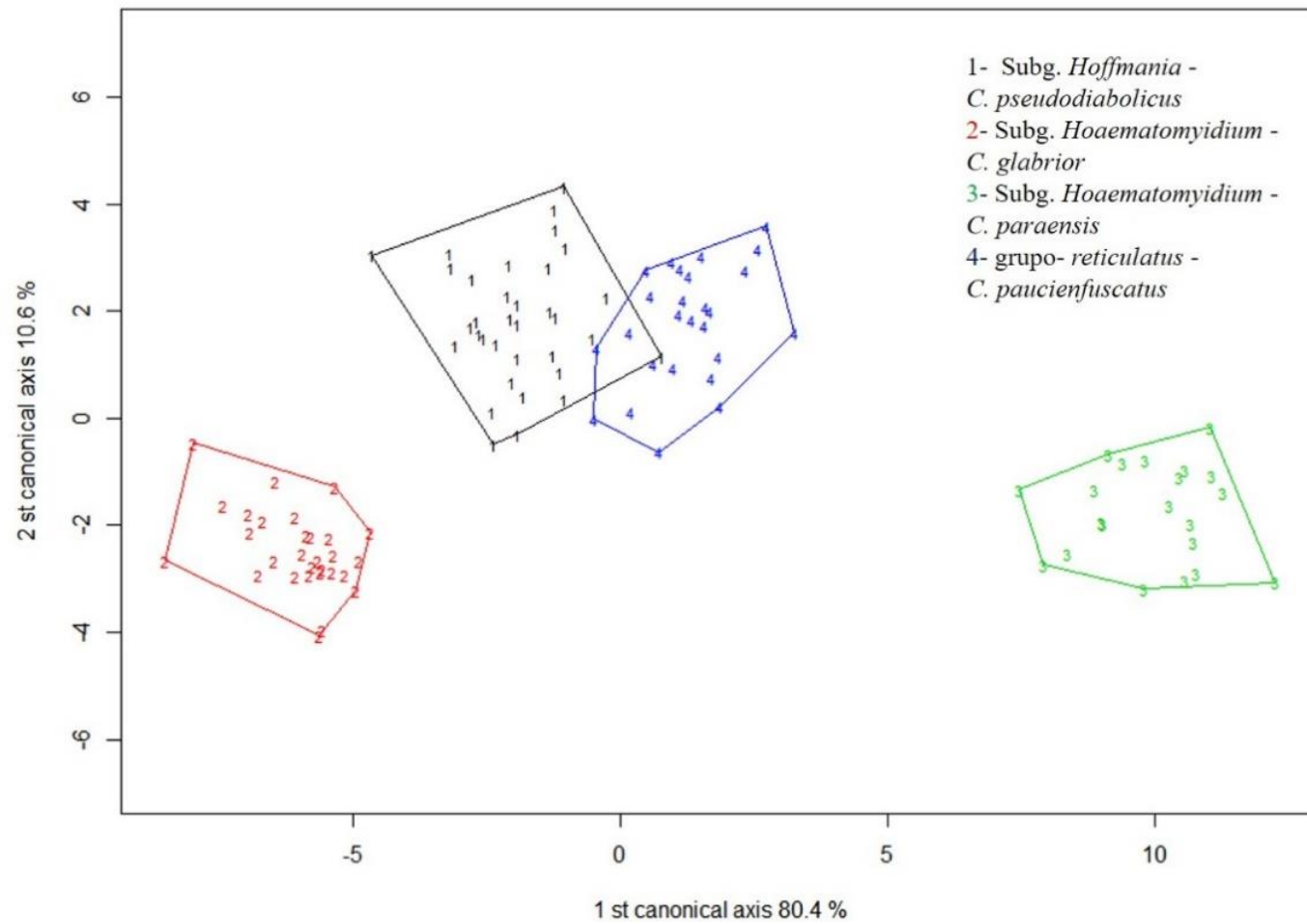
Sem os scores de regressão: comparando os subgêneros/grupo (*Haematomyidium*, *Hoffmania* e *reticulatus*), VC1 apresentou variância de 80% e VC2 de 11%, sendo que os dois primeiros eixos da VC apresentaram uma variância de 91% (Figura 10); comparando as espécies para o subgêneros *Hoffmania* VC1 apresentou variância de 36% e VC2 de 28%, sendo que os dois primeiros eixos da VC apresentaram uma variância de 64% (Figura 11); comparando as espécies para o subgêneros *Haematomyidium* VC1 apresentou variância de 93,21% e VC2 de 5,96%, sendo que os dois primeiros eixos da VC apresentaram uma variância de 99,17% (Figura 12); comparando três populações de *C. insignis* VC1 apresentou variância de 60% e VC2 de 40%, sendo que os dois primeiros eixos da VC apresentaram uma variância de 100% (Figura 13); comparando quatro populações de *C. paraensis* VC1 apresentou variância

de 52% e VC2 de 36%, sendo que os dois primeiros eixos da VC apresentaram uma variância de 88% (Figura 14).

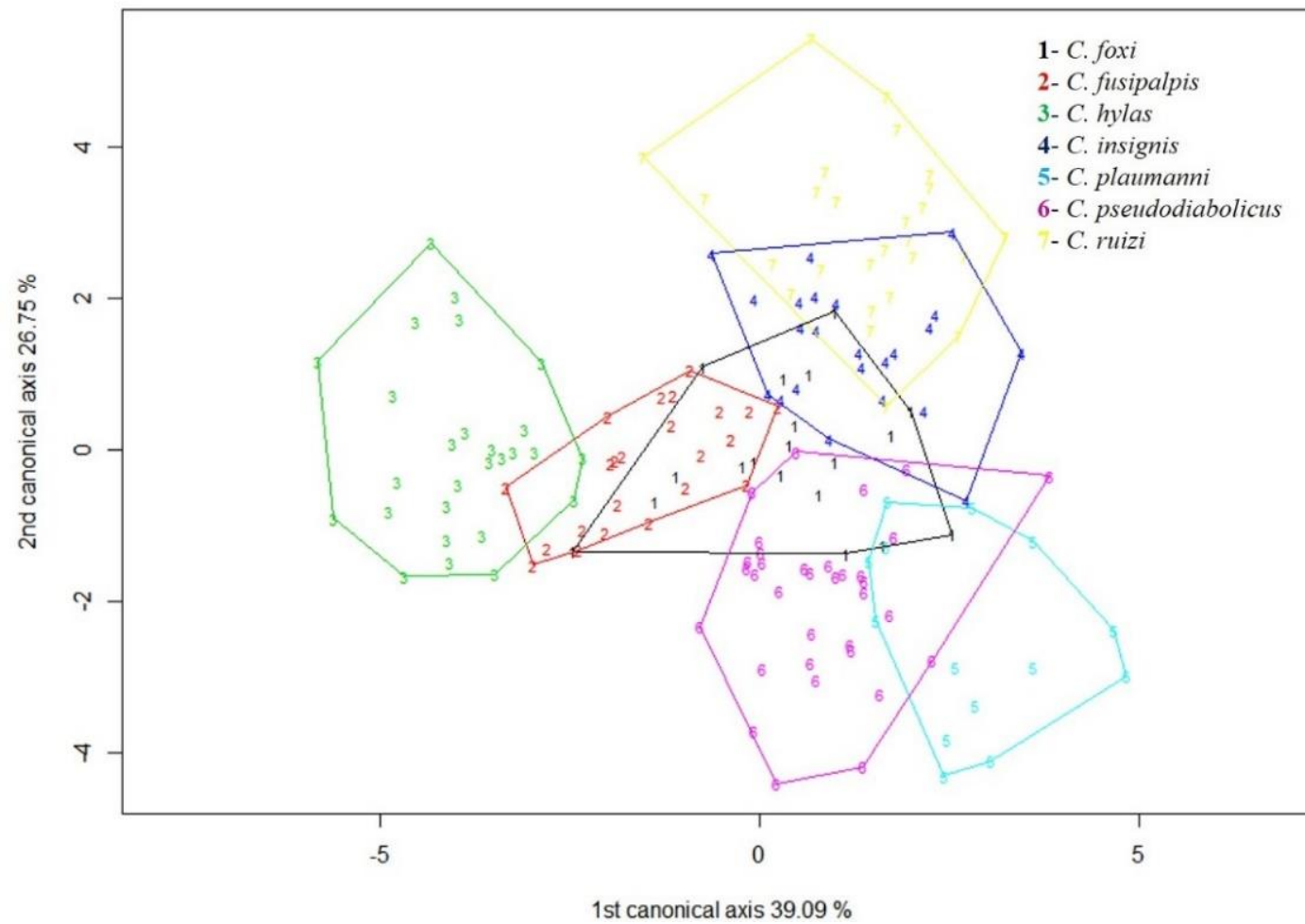
A precisão da classificação geral da AVC realizada para os 17 grupos estudados (Tabela1) foi de 88%. A precisão da classificação para os subgêneros/grupo (*Haematomydium*, *Hoffmania* e *reticulatus*) foi de 100%. A precisão da classificação na AVC para os subgêneros *Haematomydium* e *Hoffmania* foi de 88% e 86%, respectivamente. A precisão da classificação na AVC para as quatro populações de *C. paraensis* e três populações de *C. insignis* foi de 81% e 78%, respectivamente. A MANOVA (análise de regressão linear multivariada) indicou que os eixos canônicos foram estatisticamente significativos para os 17 grupos (Wilk's Lambda,  $p < 2.2e-16$ ).



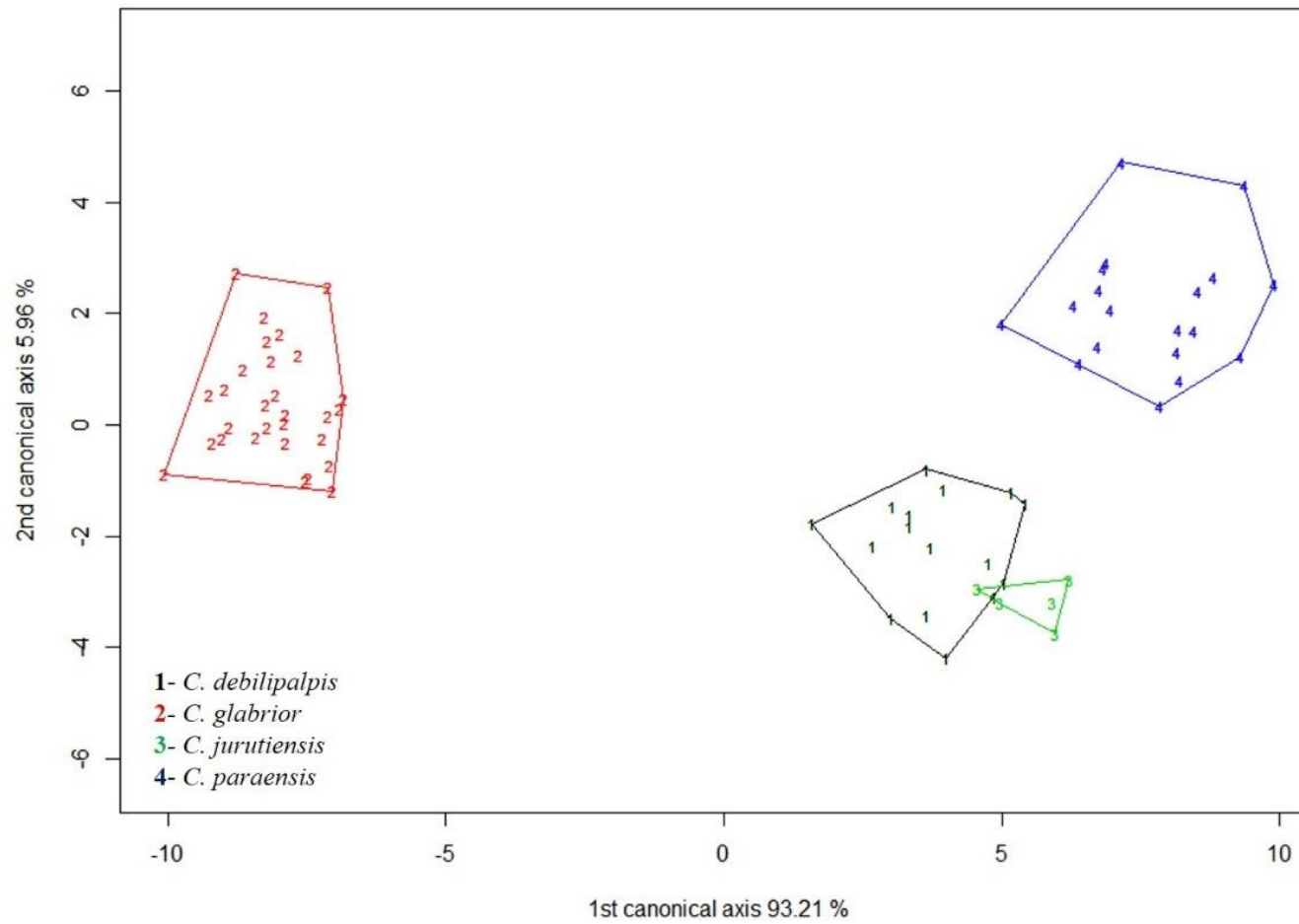
**Figura 9 (59).** Mapas fatoriais baseados nos dois fatores discriminantes da variação de forma de asas (CV1 e V2), mostrando os agrupamentos formado dos 17 grupos de 12 espécies de *Culicoides*, subgênero *Hoffmania* (Grupos 1 a 9) - 1 *C. foxi*, 2 *C. fusipalpis*, 3 *C. hylas*, 4 *C. insignis* NHA, 5 *C. insignis* SAP, 6 *C. insignis* RP, 7 *C. plaumanni*, 8 *C. pseudodiabolicus*, 9 *C. ruizi*. Subgênero *Haematomyidium* (Grupos 10 a 16) - 10 *C. debilipalpis*, 11 *C. glabrior*, 12 *C. jurutiensis*, 13 *C. paraensis* ITA, *C. paraensis* ORIX, *C. paraensis* PV, *C. paraensis* RP; e uma espécie não agrupada em subgênero, do grupo *reticulatus* (Grupos 17) - *C. paucienfuscatu*s. NHA- população do Nhamundá, Oriximiná-PA; OBD- população de Óbidos -PA; SAP- população do Sapucaá, Oriximiná-PA; ITA- população do Itaituba-PA; ORIX- população de Oriximiná-PA, sede do município; PV- população de Porto Velho-RO; RP- população do Rio Pardo, Presidente Figueiredo-AM.



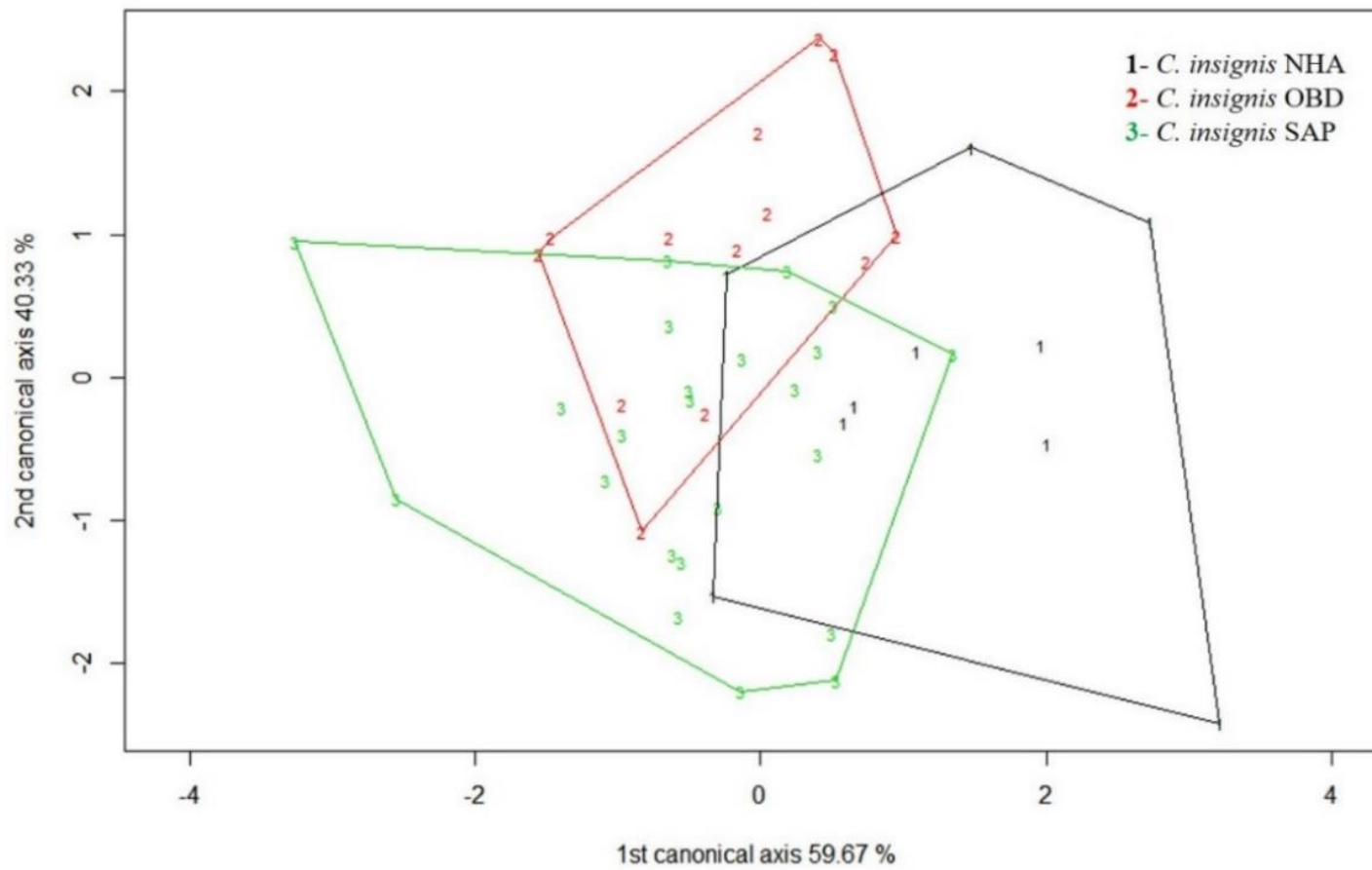
**Figura 10 (60).** Mapas fatoriais baseados nos dois fatores discriminantes da variação de forma de asas (CV1 e CV2), mostrando os agrupamentos formado pelos subgêneros/grupo.



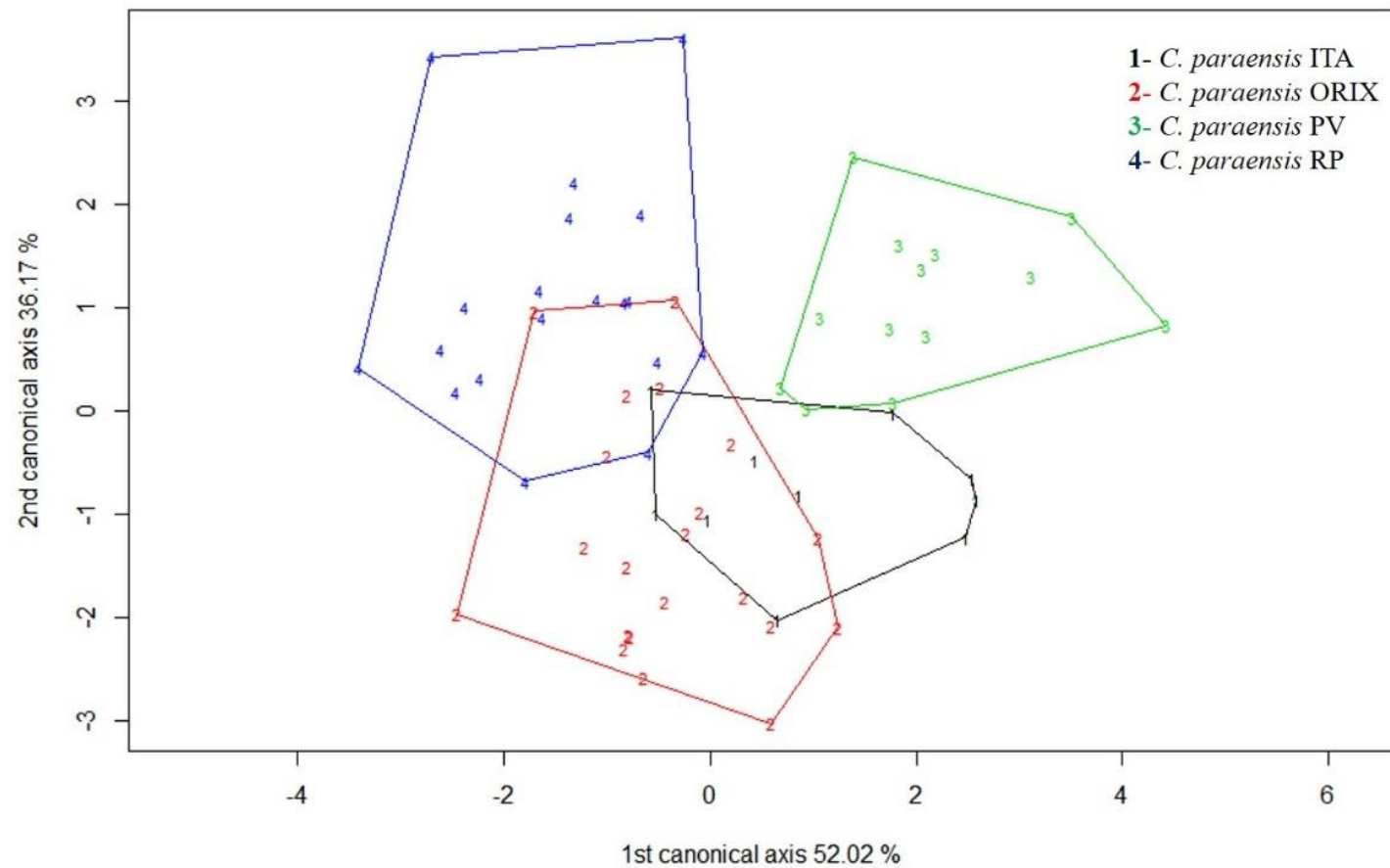
**Figura 11 (61).** Mapas fatoriais baseados nos dois fatores discriminantes da variação de forma de asas (CV1 e CV2), mostrando os agrupamentos formado por sete espécies do subgênero *Hoffmania*.



**Figura 12 (62).** Mapas fatoriais baseados nos dois fatores discriminantes da variação de forma de asas (CV1 e CV2), mostrando os agrupamentos formado por quatro espécies do subgênero *Haematomyidium*.



**Figura 13 (63).** Mapas fatoriais baseados nos dois fatores discriminantes da variação de forma de asas (CV1 e CV2), mostrando os agrupamentos formado por três populações de *Culicoides insignis* NHA - comunidade Nhamundá, município de Oriximiná; OBD - município de Óbidos; SAP - comunidade Sapucuá, município de Oriximiná.



**Figura 14 (64).** Mapas fatoriais baseados nos dois fatores discriminantes da variação de forma de asas (CV1 e CV2), mostrando os agrupamentos formado por quatro populações de *Culicoides paraensis* ITA- município de Itaituba; ORIX- município de Oriximiná; PV- município de Porto Velho; RP- comunidade do Rio Pardo, município de Presidente Figueiredo.



A AFD e a Validação Cruzada (VaC) feitas para verificar se os espécimes eram da espécie em questão, apresentaram diferenças significativa tanto na dM quanto na dP ( $P < 0,05$ ). Exceto para comparação entre algumas populações da mesma espécie como: *C. insignis* NHA - *C. insignis* SAP, *C. insignis* OBD - *C. insignis* SAP, não apresentaram diferenças significativa tanto na dM quanto na dP; *C. insignis* NHA - *C. insignis* OBD, apresentaram diferenças significativas apenas para dM; *C. paraensis* ITA - *C. paraensis* PV, apresentaram diferenças significativas apenas para dP.

A VaC feita par a par, para classificar os indivíduos dentro das espécies de *Culicoides* variou entre 30% e 100% de acertos na classificação (Tabela 3). Sendo que essas baixas porcentagens de acertos encontrada na VaC ocorrem, principalmente entre populações diferentes das mesmas espécies e entre *C. debilipalpis* e *C. jurutiensis* (ambas do subgênero *Haematomyidium*), possivelmente devido ao baixo número de amostras de *C. jurutiensis* (cinco amostras).

**Tabela 3 (10).** Função Discriminante (FD) e Validação Cruzada (VaC) feita par a par, para classificar os indivíduos dentro das espécies do gênero *Culicoides*.

Comparação par – par		Grupo 1		Grupo 2	
Grupo 1	Grupo 2	FD	VC	FD	VC
<i>C. debilipalpis</i> RP	<i>C. foxi</i> RP	100	100	100	100
<i>C. debilipalpis</i> RP	<i>C. fusipalpis</i> RP	100	94	100	100
<i>C. debilipalpis</i> RP	<i>C. glabrior</i> RP	100	100	100	100
<i>C. debilipalpis</i> RP	<i>C. hylas</i> RP	100	100	100	100
<i>C. debilipalpis</i> RP	<i>C. insignis</i> NHA	100	88	100	90
<i>C. debilipalpis</i> RP	<i>C. insignis</i> OBD	100	94	100	100
<i>C. debilipalpis</i> RP	<i>C. insignis</i> SAP	100	100	100	100
<i>C. debilipalpis</i> RP	<i>C. jurutiensis</i> RP	100	94	100	40
<i>C. debilipalpis</i> RP	<i>C. paraensis</i> ITA	100	100	100	100
<i>C. debilipalpis</i> RP	<i>C. paraensis</i> ORIX	100	100	100	100
<i>C. debilipalpis</i> RP	<i>C. paraensis</i> PV	100	81	100	85
<i>C. debilipalpis</i> RP	<i>C. paraensis</i> RP	100	100	100	95
<i>C. debilipalpis</i> RP	<i>C. paucienfuscatus</i> RP	100	94	100	100
<i>C. debilipalpis</i> RP	<i>C. plaumanni</i> RP	100	100	100	93
<i>C. debilipalpis</i> RP	<i>C. pseudodiabolicus</i> RP	100	94	100	100

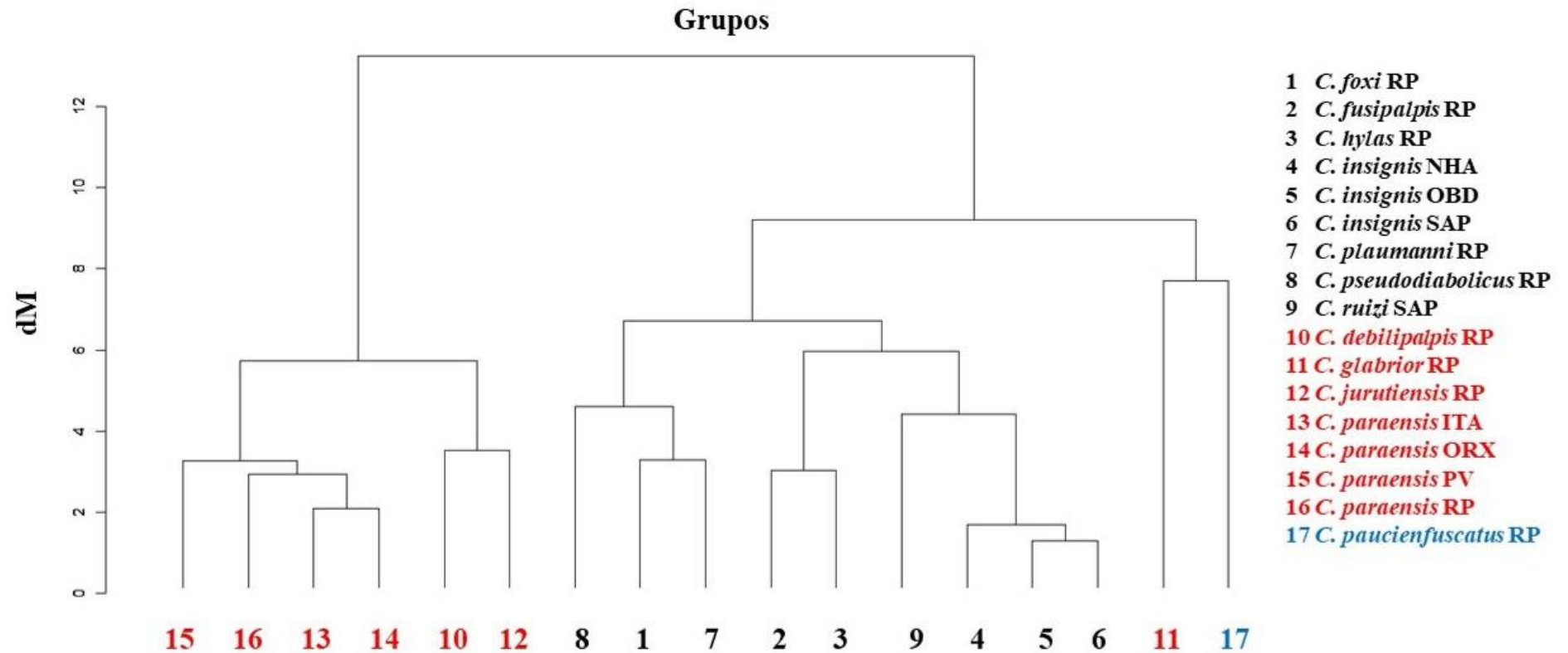
<i>C. debilipalpis</i> RP	<i>C. ruizi</i> SAP	100	94	100	100
<i>C. foxi</i> RP	<i>C. fusipalpis</i> RP	100	95	100	100
<i>C. foxi</i> RP	<i>C. glabrior</i> RP	100	100	100	100
<i>C. foxi</i> RP	<i>C. hylas</i> RP	100	95	100	100
<i>C. foxi</i> RP	<i>C. insignis</i> NHA	100	100	100	90
<i>C. foxi</i> RP	<i>C. insignis</i> OBD	100	95	100	100
<i>C. foxi</i> RP	<i>C. insignis</i> SAP	100	100	100	100
<i>C. foxi</i> RP	<i>C. jurutiensis</i> RP	100	100	100	100
<i>C. foxi</i> RP	<i>C. paraensis</i> ITA	100	100	100	100
<i>C. foxi</i> RP	<i>C. paraensis</i> ORIX	100	100	100	100
<i>C. foxi</i> RP	<i>C. paraensis</i> PV	100	100	100	100
<i>C. foxi</i> RP	<i>C. paraensis</i> RP	100	100	100	100
<i>C. foxi</i> RP	<i>C. paucienfuscatius</i> RP	100	100	100	100
<i>C. foxi</i> RP	<i>C. plaumanni</i> RP	100	90	100	86
<i>C. foxi</i> RP	<i>C. pseudodiabolicus</i> RP	100	95	97	91
<i>C. foxi</i> RP	<i>C. ruizi</i> SAP	100	95	100	92
<i>C. fusipalpis</i> RP	<i>C. glabrior</i> RP	100	100	100	100
<i>C. fusipalpis</i> RP	<i>C. hylas</i> RP	91	91	96	96
<i>C. fusipalpis</i> RP	<i>C. insignis</i> NHA	100	100	100	80
<i>C. fusipalpis</i> RP	<i>C. insignis</i> OBD	100	100	100	92
<i>C. fusipalpis</i> RP	<i>C. insignis</i> SAP	100	100	100	96
<i>C. fusipalpis</i> RP	<i>C. jurutiensis</i> RP	100	100	100	80
<i>C. fusipalpis</i> RP	<i>C. paraensis</i> ITA	100	100	100	100
<i>C. fusipalpis</i> RP	<i>C. paraensis</i> ORIX	100	100	100	100
<i>C. fusipalpis</i> RP	<i>C. paraensis</i> PV	100	100	100	100
<i>C. fusipalpis</i> RP	<i>C. paraensis</i> RP	100	100	100	100
<i>C. fusipalpis</i> RP	<i>C. paucienfuscatius</i> RP	100	100	100	100
<i>C. fusipalpis</i> RP	<i>C. plaumanni</i> RP	100	100	100	93
<i>C. fusipalpis</i> RP	<i>C. pseudodiabolicus</i> RP	100	100	97	94
<i>C. fusipalpis</i> RP	<i>C. ruizi</i> SAP	100	100	100	100
<i>C. glabrior</i> RP	<i>C. hylas</i> RP	100	100	100	100
<i>C. glabrior</i> RP	<i>C. insignis</i> NHA	100	100	100	100
<i>C. glabrior</i> RP	<i>C. insignis</i> OBD	100	100	100	100
<i>C. glabrior</i> RP	<i>C. insignis</i> SAP	100	100	100	100
<i>C. glabrior</i> RP	<i>C. jurutiensis</i> RP	100	100	100	100
<i>C. glabrior</i> RP	<i>C. paraensis</i> ITA	100	100	100	100
<i>C. glabrior</i> RP	<i>C. paraensis</i> ORIX	100	100	100	100
<i>C. glabrior</i> RP	<i>C. paraensis</i> PV	100	100	100	100
<i>C. glabrior</i> RP	<i>C. paraensis</i> RP	100	100	100	100
<i>C. glabrior</i> RP	<i>C. paucienfuscatius</i> RP	100	100	100	100
<i>C. glabrior</i> RP	<i>C. plaumanni</i> RP	100	100	100	100
<i>C. glabrior</i> RP	<i>C. pseudodiabolicus</i> RP	100	100	100	100
<i>C. glabrior</i> RP	<i>C. ruizi</i> SAP	100	100	100	100
<i>C. hylas</i> RP	<i>C. insignis</i> NHA	100	100	100	100
<i>C. hylas</i> RP	<i>C. insignis</i> OBD	100	100	100	100

<i>C. hylas</i> RP	<i>C. insignis</i> SAP	100	100	100	100
<i>C. hylas</i> RP	<i>C. jurutiensis</i> RP	100	100	100	100
<i>C. hylas</i> RP	<i>C. paraensis</i> ITA	100	100	100	100
<i>C. hylas</i> RP	<i>C. paraensis</i> ORIX	100	100	100	100
<i>C. hylas</i> RP	<i>C. paraensis</i> PV	100	100	100	100
<i>C. hylas</i> RP	<i>C. paraensis</i> RP	100	100	100	100
<i>C. hylas</i> RP	<i>C. paucienfuscatus</i> RP	100	100	100	100
<i>C. hylas</i> RP	<i>C. plaumanni</i> RP	100	100	100	100
<i>C. hylas</i> RP	<i>C. pseudodiabolicus</i> RP	100	100	100	100
<i>C. hylas</i> RP	<i>C. ruizi</i> SAP	100	100	100	100
<i>C. insignis</i> NHA	<i>C. insignis</i> OBD	90	40	85	54
<i>C. insignis</i> NHA	<i>C. insignis</i> SAP	80	30	83	61
<i>C. insignis</i> NHA	<i>C. jurutiensis</i> RP	100	80	100	100
<i>C. insignis</i> NHA	<i>C. paraensis</i> ITA	100	90	100	90
<i>C. insignis</i> NHA	<i>C. paraensis</i> ORIX	100	100	100	100
<i>C. insignis</i> NHA	<i>C. paraensis</i> PV	100	100	100	92
<i>C. insignis</i> NHA	<i>C. paraensis</i> RP	100	100	100	100
<i>C. insignis</i> NHA	<i>C. paucienfuscatus</i> RP	100	80	100	100
<i>C. insignis</i> NHA	<i>C. plaumanni</i> RP	100	100	100	100
<i>C. insignis</i> NHA	<i>C. pseudodiabolicus</i> RP	100	90	100	94
<i>C. insignis</i> NHA	<i>C. ruizi</i> SAP	90	90	100	92
<i>C. insignis</i> OBD	<i>C. insignis</i> SAP	77	46	74	65
<i>C. insignis</i> OBD	<i>C. jurutiensis</i> RP	100	100	100	100
<i>C. insignis</i> OBD	<i>C. paraensis</i> ITA	100	100	100	100
<i>C. insignis</i> OBD	<i>C. paraensis</i> ORIX	100	100	100	100
<i>C. insignis</i> OBD	<i>C. paraensis</i> PV	100	100	100	100
<i>C. insignis</i> OBD	<i>C. paraensis</i> RP	100	100	100	100
<i>C. insignis</i> OBD	<i>C. paucienfuscatus</i> RP	100	100	100	96
<i>C. insignis</i> OBD	<i>C. plaumanni</i> RP	100	100	100	93
<i>C. insignis</i> OBD	<i>C. pseudodiabolicus</i> RP	85	69	97	82
<i>C. insignis</i> OBD	<i>C. ruizi</i> SAP	100	100	100	92
<i>C. insignis</i> SAP	<i>C. jurutiensis</i> RP	100	100	100	80
<i>C. insignis</i> SAP	<i>C. paraensis</i> ITA	100	100	100	100
<i>C. insignis</i> SAP	<i>C. paraensis</i> ORIX	100	100	100	100
<i>C. insignis</i> SAP	<i>C. paraensis</i> PV	100	100	100	100
<i>C. insignis</i> SAP	<i>C. paraensis</i> RP	100	100	100	100
<i>C. insignis</i> SAP	<i>C. paucienfuscatus</i> RP	100	100	100	96
<i>C. insignis</i> SAP	<i>C. plaumanni</i> RP	100	100	100	100
<i>C. insignis</i> SAP	<i>C. pseudodiabolicus</i> RP	100	96	100	94
<i>C. insignis</i> SAP	<i>C. ruizi</i> SAP	100	81	100	100
<i>C. jurutiensis</i> RP	<i>C. paraensis</i> ITA	100	80	100	100
<i>C. jurutiensis</i> RP	<i>C. paraensis</i> ORIX	100	100	100	95
<i>C. jurutiensis</i> RP	<i>C. paraensis</i> PV	100	100	100	77
<i>C. jurutiensis</i> RP	<i>C. paraensis</i> RP	100	80	100	84
<i>C. jurutiensis</i> RP	<i>C. paucienfuscatus</i> RP	100	80	100	100

<i>C. jurutiensis</i> RP	<i>C. plaumanni</i> RP	100	100	100	100
<i>C. jurutiensis</i> RP	<i>C. pseudodiabolicus</i> RP	100	100	100	100
<i>C. jurutiensis</i> RP	<i>C. ruizi</i> SAP	100	100	100	100
<i>C. paraensis</i> ITA	<i>C. paraensis</i> ORIX	90	60	91	81
<i>C. paraensis</i> ITA	<i>C. paraensis</i> PV	100	80	85	62
<i>C. paraensis</i> ITA	<i>C. paraensis</i> RP	100	70	100	84
<i>C. paraensis</i> ITA	<i>C. paucienfuscatus</i> RP	100	100	100	100
<i>C. paraensis</i> ITA	<i>C. plaumanni</i> RP	100	100	100	100
<i>C. paraensis</i> ITA	<i>C. pseudodiabolicus</i> RP	100	100	100	100
<i>C. paraensis</i> ITA	<i>C. ruizi</i> SAP	100	100	100	100
<i>C. paraensis</i> ORIX	<i>C. paraensis</i> PV	95	91	100	69
<i>C. paraensis</i> ORIX	<i>C. paraensis</i> RP	86	67	95	74
<i>C. paraensis</i> ORIX	<i>C. paucienfuscatus</i> RP	100	100	100	100
<i>C. paraensis</i> ORIX	<i>C. plaumanni</i> RP	100	100	100	100
<i>C. paraensis</i> ORIX	<i>C. pseudodiabolicus</i> RP	100	100	100	100
<i>C. paraensis</i> ORIX	<i>C. ruizi</i> SAP	100	100	100	100
<i>C. paraensis</i> PV	<i>C. paraensis</i> RP	100	62	95	90
<i>C. paraensis</i> PV	<i>C. paucienfuscatus</i> RP	100	100	100	100
<i>C. paraensis</i> PV	<i>C. plaumanni</i> RP	100	100	100	100
<i>C. paraensis</i> PV	<i>C. pseudodiabolicus</i> RP	100	100	100	100
<i>C. paraensis</i> PV	<i>C. ruizi</i> SAP	100	100	100	100
<i>C. paraensis</i> RP	<i>C. paucienfuscatus</i> RP	100	100	100	100
<i>C. paraensis</i> RP	<i>C. plaumanni</i> RP	100	100	100	100
<i>C. paraensis</i> RP	<i>C. pseudodiabolicus</i> RP	100	100	100	100
<i>C. paraensis</i> RP	<i>C. ruizi</i> SAP	100	100	100	100
<i>C. paucienfuscatus</i> RP	<i>C. plaumanni</i> RP	100	100	100	100
<i>C. paucienfuscatus</i> RP	<i>C. pseudodiabolicus</i> RP	100	100	100	100
<i>C. paucienfuscatus</i> RP	<i>C. ruizi</i> SAP	100	100	100	96
<i>C. plaumanni</i> RP	<i>C. pseudodiabolicus</i> RP	100	86	97	88
<i>C. plaumanni</i> RP	<i>C. ruizi</i> SAP	100	100	100	10v 0
<i>C. pseudodiabolicus</i> RP	<i>C. ruizi</i> SAP	100	94	100	100

NHA- população do Nhamundá, Oriximiná-PA; OBD- população de Óbidos -PA; SAP- população do Sapucaá, Oriximiná-PA; ITA- população do Itaituba-PA; ORIX- população de Oriximiná-PA, sede do município; PV- população de Porto Velho-RO; RP- população do Rio Pardo, Presidente Figueiredo-AM.

O dendrograma usando a dM entre os 17 grupos (Figura 15), agrupou as espécies dentro dos seus respectivos subgêneros, com exceção das espécies *C. glabrior*. Também é possível observar que o agrupamento das populações de *C. paraensis*, seguem a proximidade geográfica entre as populações, sendo Oriximiná – Itaituba – Rio Pardo – Porto velho. O mesmo não ocorre na população de *C. insignis*, onde a proximidade geográfica segue Nhamundá – Óbidos – Sapucuá. Esperava-se Nhamundá – Sapucuá – Óbidos. As distâncias entre as populações de *C. paraensis* são maiores que entre as populações de *C. insignis*. Esses resultados indicam que as distâncias geográficas podem vir a segregar as populações de *C. paraensis* e *C. insignis*. Esse fato pode ocorrer pela distância das populações devido a sua distribuição geográfica.



**Figura 15 (65).** Dendrograma gerado da dM entre os 17 grupos de *Culicoides*. Em vermelho, estão as espécies do subgênero *Haematomyidium*; preto, subgênero *Hoffmania*; azul, espécie não agrupada em subgênero, grupo *reticulatus*. NHA- população do Nhamundá, Oriximiná-PA; OBD- população de Óbidos -PA; SAP- população do Sapucaá, Oriximiná-PA; ITA- população do Itaituba-PA; ORIX- população de Oriximiná-PA, sede do município; PV- população de Porto Velho-RO; RP- população do Rio Pardo, Presidente Figueiredo-AM.

### 3.2 Análise genética para 12 espécies de *Culicoides* da Região Amazônica brasileira

Neste estudo foi realizada análise genéticas onde os limites das espécies foram examinados para 12 espécies validas (Tabela 4). Estas sequências são correspondentes ao fragmento do DNA Barcode (381pb) que mostraram a presença de 216 (56,7%) sítios conservados e 165 (43,3%) sítios polimórficos. Entre os sítios polimórficos observou-se que 163 (98,8%) sítios parcimônia-informativos e dois (1,2%) singletons. Ao analisarmos as substituições dos nucleotídeos foram verificadas 59,5% de transições e 40,5% de transversões. Não foram observados Indels.

**Tabela 4 (11).** Relação das espécies de *Culicoides*, utilizadas na análise genética, coletadas nos municípios: de Itaituba, Oriximiná e Óbidos, no estado do Pará; Presidente Figueiredo e Tefé, no estado do Amazonas; Porto Velho, Amazonas.

Espécies	Nº de amostras	Localidade
<i>C. foxi</i>	2	Amazonas, Presidente Figueiredo, Rio Pardo
<i>C. fusipalpis</i>	3	Amazonas, Presidente Figueiredo, Rio Pardo
<i>C. hylas</i>	3	Amazonas, Presidente Figueiredo, Rio Pardo
<i>C. insignis</i>	1	Pará, Óbidos, Serra da Escama
<i>C. insignis</i>	4	Pará, Oriximiná, Nhamundá
<i>C. insignis</i>	3	Pará, Oriximiná, Sapucuí
<i>C. plaumanni</i>	3	Amazonas, Presidente Figueiredo, Rio Pardo
<i>C. pseudodiabolicus</i>	7	Amazonas, Presidente Figueiredo, Rio Pardo
<i>C. pseudodiabolicus</i>	1	Pará, Itaituba, Pedra Branca
<i>C. pseudodiabolicus</i>	1	Amazonas, Tefé
<i>C. ruizi</i>	7	Pará, Oriximiná, Sapucuí
<i>C. debilipalpis</i>	3	Amazonas, Presidente Figueiredo, Rio Pardo
<i>C. glabrior</i>	5	Amazonas, Presidente Figueiredo, Rio Pardo
<i>C. jurutiensis</i>	2	Amazonas, Presidente Figueiredo, Rio Pardo
<i>C. paraensis</i>	2	Rondônia, Porto Velho
<i>C. paucienfuscatus</i>	3	Pará, Oriximiná, Sapucuí

As análises filogenéticas por Neighbor-Joining e Máxima Verossimilhança mostraram-se igualmente eficazes para a diferenciação das 12 espécies de maruins amazônicos, revelando

valores de bootstrap para os cladogramas entre 80-100% (Figuras 16 e 17). Todavia, podemos observar que a árvore filogenética baseada em Neighbor-Joining obteve 100% de suporte para todos os cladogramas, demonstrando uma maior eficácia deste método perante as espécies analisadas. As identificações morfológicas de *Culicoides* por taxonomistas têm comumente se mostrado concordantes com estudos posteriores utilizando caracterização genética <sup>(60,85)</sup>.

As análises filogenéticas por Neighbor-Joining e Máxima Verossimilhança, apontam o grupo *guttatus* como irmão do grupo *hylas*, ambos do subgênero *Hoffmania* e que esse subgênero é monofilético e o subgênero *Haematomyidium* é parafilético. Augot et al. <sup>(67)</sup> com resultados da análise de inferência Bayesiana, mostraram que o subgênero *Hoffmania* (espécie do Equador) apresentou dois aglomerados com *C. batesi* e *C. guttatus* como grupo irmão do grupo *hylas* e que o subgênero *Hoffmania* e *Haematomyidium* eram monofiléticos.

O resultado obtido a partir da reconstrução filogenética por Neighbor-Joining e Máxima Verossimilhança foi reforçado pela morfometria geométrica de asas, realizada nessas espécies, sugerindo divergência entre estes grupos de maruins amazônicos avaliados neste estudo. Muñoz - Muñoz et al. <sup>(53)</sup> apontam que a concordância entre filogenias inferidas de dados moleculares e clusters fenéticos sugere a existência de um sinal filogenético na forma de asa, indicando o uso dessa característica fenotípica complexa não apenas para inferir relações genéticas entre espécies do subgênero *Culicoides*, mas também como uma ferramenta potencialmente poderosa para diferenciar espécies crípticas dentro do gênero.

A análise intraespecífica revelou uma alta diversidade haplotípica (0,66667-1,00000) na maior parte das espécies e uma baixa diversidade nucleotídica (0,00000-0,05433) (Tabela 5). A presença de espécies "isomórficas", isto é, espécies "irmãs" geneticamente distintas e morfologicamente indistinguíveis, que ocorrem frequentemente de forma simpátrica, também impede a identificação com base nas características morfológicas e requer a utilização de métodos moleculares para a separação <sup>(12)</sup>. O resultado molecular para algumas espécies o nosso



estudo, exige uma reavaliação, dada a divergência genética, insinuando a presença de espécies crípticas ou complexo de espécie. A coexistência de espécies irmãs em uma área geográfica sobreposta é uma das melhores evidências da existência de um complexo de espécies <sup>(86)</sup>.

Os valores de diversidade nucleotídica e haplotípica podem variar entre 0 e 1 (Tabela 6). Com relação, as análises interespecíficas pudemos observar valores significativos para divergência genética entre os grupos. Os valores do  $F_{st}$  (0,82646-0,99401) obtidos demonstram bem o nível de diferença existente entre as espécies de maruins. Outro índice que reforça a ideia de divergência interespecífica está relacionado aos números de sítios fixados e sítios compartilhados para cada uma das espécies. Foram obtidos valores significativos para o número de sítios fixados nas espécies sugerindo uma enorme diferença interespecífica. Já para o número de sítios compartilhados foi observado valores não significativos entre as espécies, estes valores refletem uma maior conservação genética intraespecífica em detrimento dos padrões interespecíficos.

A análise de distância genética revelou valores significativos (0,118-0,303) para diferenciação das espécies de maruins (tabela 7). Ao serem transformados estes valores em porcentagem indicaram a que existência entre 11,8% até 30,3% de diferença entre os grupos avaliados. Na literatura, tem sido sugerido que valores de distância genética superiores a 3% são indicativos de divergência entre as espécies de insetos quando usada a metodologia sugerida para o DNA Barcode <sup>(63)</sup>. Estudos de Tomazatos et al. <sup>(87)</sup> usando o *COX* para identificar *Culicoides* na Romênia encontrou uma divergência de 15,6-16,3% entre as espécies mais próximas identificadas e agrupadas em um clado monofilético.

Anders et al. <sup>(88)</sup> usaram o DNA Barcode para determinação de espécies de *Culicoides*, e gerou 37 clusters suportados, 31 dos quais estão de acordo com a determinação morfológica. No entanto, dois pares de espécies intimamente relacionadas não puderam ser separados usando a abordagem de código de barras de DNA, apresentando divergência intraespecífica

relativamente profunda (mais de 10 vezes a média), o que levou à criação de duas espécies crípticas dentro de duas espécies.

Gopurenko et al. <sup>(89)</sup> usaram taxonomia integrativa, morfologia e molecular, para investigar os limites das espécies de *Culicoides*, verificaram que algumas espécies eram geneticamente e morfologicamente uniformes nas distribuições amostradas, mas outras, continham duas ou mais populações geneticamente independentes de espécies crípticas, sendo que algumas eram simpátricas. Em vários estudos, ferramentas moleculares, utilizadas para a identificação, revelaram a presença de espécies crípticas e não descritas, especialmente dentro do complexo envolvendo espécies de vetores <sup>(9,89)</sup>.

Harrup et al. <sup>(90)</sup> utilizaram métodos de amostragem de DNA Barcode para detecção e identificação de *Culicoides* no sul da Índia, a fim de fornecer uma base informada para o monitoramento futuro de suas populações, as amostras no sul da Índia parecem relativamente robusto; no entanto, a potencial diversidade de espécies crípticas estava presente em alguns grupos que requerem mais investigação.

**Tabela 5 (12).** Medidas de diversidade genética intrapopulacional das 12 espécies de *Culicoides*. coletadas nos municípios: de Itaituba, Oriximiná e Óbidos, no estado do Pará; Presidente Figueiredo e Tefé, no estado do Amazonas; Porto Velho, Amazonas.

Espécies	S	NS	H	$\Pi$	Hd
<i>C. debilipalpis</i>	3	0	1	0,00000	0,00000
<i>C. glabrior</i>	5	50	4	0,05433	0,90000
<i>C. jurutiensis</i>	2	1	2	0,00263	1,00000
<i>C. paraensis</i>	2	1	2	0,00262	1,00000
<i>C. hylas</i>	3	2	3	0,00350	1,00000
<i>C. foxi</i>	2	4	2	0,01050	1,00000
<i>C. fusipalpis</i>	3	2	3	0,00350	0,66667
<i>C. insignis</i>	8	14	3	0,01612	0,71429
<i>C. plaumanni</i>	3	3	2	0,00525	0,66667
<i>C. pseudodiabolicus</i>	9	15	7	0,01772	0,94444
<i>C. ruizi</i>	7	1	2	0,00075	0,28571
<i>C. paucienfuscatus</i>	3	3	3	0,00612	1,00000

S: Número de seqüências; H: número de haplótipos; NS: número de sítios segregantes; Hd: diversidade de haplótipos;  $\pi$ : diversidade nucleotídeos.

**Tabela 6 (13).** Diferenciação genética entre as amostras das 12 espécies de *Culicoides*. coletadas nos municípios: de Itaituba, Oriximiná e Óbidos, no estado do Pará; Presidente Figueiredo e Tefé, no estado do Amazonas; Porto Velho, Amazonas.

Espécies	Fst	Dxy	Da	Ss	Sf
<i>C. jurutiensis</i> X <i>C. pseudodiabolicus</i>	0,96026	0,25591	0,24573	0	92
<i>C. jurutiensis</i> X <i>C. debilipalpis</i>	0,99401	0,21916	0,21785	0	83
<i>C. jurutiensis</i> X <i>C. foxi</i>	0,96711	0,19948	0,19291	0	74
<i>C. jurutiensis</i> X <i>C. fusipalpis</i>	0,98669	0,23010	0,22703	0	87
<i>C. jurutiensis</i> X <i>C. glabrior</i>	0,88245	0,24226	0,21378	0	77
<i>C. jurutiensis</i> X <i>C. hylas</i>	0,98368	0,18766	0,18460	0	70
<i>C. jurutiensis</i> X <i>C. insignis</i>	0,95671	0,21654	0,20716	0	80
<i>C. jurutiensis</i> X <i>C. paraensis</i>	0,98676	0,19816	0,19554	0	75
<i>C. jurutiensis</i> X <i>C. paucienfuscatus</i>	0,97959	0,21435	0,20997	0	80
<i>C. jurutiensis</i> X <i>C. plaumanni</i>	0,98276	0,22835	0,22441	0	86
<i>C. jurutiensis</i> X <i>C. ruizi</i>	0,99118	0,19123	0,18954	0	72
<i>C. pseudodiabolicus</i> X <i>C. debilipalpis</i>	0,95740	0,20793	0,19907	0	74
<i>C. pseudodiabolicus</i> X <i>C. foxi</i>	0,91058	0,15777	0,14366	2	52
<i>C. pseudodiabolicus</i> X <i>C. fusipalpis</i>	0,93350	0,15952	0,14981	1	52
<i>C. pseudodiabolicus</i> X <i>C. glabrior</i>	0,82646	0,20758	0,17156	4	53
<i>C. pseudodiabolicus</i> X <i>C. hylas</i>	0,93835	0,17206	0,16145	1	60
<i>C. pseudodiabolicus</i> X <i>C. insignis</i>	0,87831	0,13903	0,12211	2	40
<i>C. pseudodiabolicus</i> X <i>C. paraensis</i>	0,94875	0,19845	0,18828	0	70
<i>C. pseudodiabolicus</i> X <i>C. paucienfuscatus</i>	0,93835	0,19335	0,18143	2	66
<i>C. pseudodiabolicus</i> X <i>C. plaumanni</i>	0,92354	0,15019	0,13871	2	50
<i>C. pseudodiabolicus</i> X <i>C. ruizi</i>	0,93681	0,14611	0,13687	0	49
<i>C. debilipalpis</i> X <i>C. foxi</i>	0,97714	0,22966	0,22441	0	86

<i>C. debilipalpis</i> X <i>C. fusipalpis</i>	0,99213	0,22222	0,22047	0	84
<i>C. debilipalpis</i> X <i>C. glabrior</i>	0,88371	0,23360	0,20643	0	75
<i>C. debilipalpis</i> X <i>C. hylas</i>	0,99257	0,23535	0,23360	0	89
<i>C. debilipalpis</i> X <i>C. insignis</i>	0,96459	0,22769	0,21963	0	82
<i>C. debilipalpis</i> X <i>C. paraensis</i>	0,99329	0,19554	0,19423	0	74
<i>C. debilipalpis</i> X <i>C. paucienfuscatus</i>	0,98517	0,20647	0,20341	0	77
<i>C. debilipalpis</i> X <i>C. plaumanni</i>	0,98855	0,22922	0,22660	0	87
<i>C. debilipalpis</i> X <i>C. ruizi</i>	0,99815	0,20247	0,20210	0	77
<i>C. foxi</i> X <i>C. fusipalpis</i>	0,95455	0,15398	0,14698	0	56
<i>C. foxi</i> X <i>C. glabrior</i>	0,84639	0,21102	0,17861	2	63
<i>C. foxi</i> X <i>C. hylas</i>	0,95152	0,14436	0,13736	0	52
<i>C. foxi</i> X <i>C. insignis</i>	0,89958	0,13255	0,11924	1	43
<i>C. foxi</i> X <i>C. paraensis</i>	0,96403	0,18241	0,17585	0	67
<i>C. foxi</i> X <i>C. paucienfuscatus</i>	0,95701	0,19335	0,18504	0	70
<i>C. foxi</i> X <i>C. plaumanni</i>	0,94357	0,13955	0,13167	0	51
<i>C. foxi</i> X <i>C. ruizi</i>	0,95017	0,11286	0,10724	0	41
<i>C. fusipalpis</i> X <i>C. glabrior</i>	0,87019	0,22275	0,19383	0	63
<i>C. fusipalpis</i> X <i>C. hylas</i>	0,97814	0,16011	0,15661	0	59
<i>C. fusipalpis</i> X <i>C. insignis</i>	0,92549	0,13167	0,12186	0	44
<i>C. fusipalpis</i> X <i>C. paraensis</i>	0,98423	0,19423	0,19116	0	73
<i>C. fusipalpis</i> X <i>C. paucienfuscatus</i>	0,97730	0,21202	0,20720	1	79
<i>C. fusipalpis</i> X <i>C. plaumanni</i>	0,96667	0,13123	0,12686	0	48
<i>C. fusipalpis</i> X <i>C. ruizi</i>	0,98271	0,12286	0,12073	0	46
<i>C. glabrior</i> X <i>C. hylas</i>	0,87100	0,22415	0,19523	0	68
<i>C. glabrior</i> X <i>C. insignis</i>	0,83265	0,21050	0,17527	5	59
<i>C. glabrior</i> X <i>C. paraensis</i>	0,87340	0,22493	0,19646	0	61
<i>C. glabrior</i> X <i>C. paucienfuscatus</i>	0,85652	0,21067	0,18045	0	59

<i>C. glabrior</i> X <i>C. plaumanni</i>	0,85523	0,20577	0,17598	1	60
<i>C. glabrior</i> X <i>C. ruizi</i>	0,85570	0,19085	0,16331	0	53
<i>C. hylas</i> X <i>C. insignis</i>	0,94082	0,16579	0,15598	0	58
<i>C. hylas</i> X <i>C. paraensis</i>	0,98163	0,16667	0,16360	0	62
<i>C. hylas</i> X <i>C. paucienfuscatus</i>	0,97699	0,20910	0,20429	0	77
<i>C. hylas</i> X <i>C. plaumanni</i>	0,97382	0,16710	0,16273	0	61
<i>C. hylas</i> X <i>C. ruizi</i>	0,98524	0,14398	0,14186	0	53
<i>C. insignis</i> X <i>C. paraensis</i>	0,95347	0,20144	0,19207	0	69
<i>C. insignis</i> X <i>C. paucienfuscatus</i>	0,93760	0,17826	0,16714	0	61
<i>C. insignis</i> X <i>C. plaumanni</i>	0,91634	0,12773	0,11705	1	40
<i>C. insignis</i> X <i>C. ruizi</i>	0,93125	0,12270	0,11427	0	41
<i>C. paraensis</i> X <i>C. paucienfuscatus</i>	0,97955	0,21391	0,20954	1	80
<i>C. paraensis</i> X <i>C. plaumanni</i>	0,97831	0,18154	0,17760	0	67
<i>C. paraensis</i> X <i>C. ruizi</i>	0,98865	0,14867	0,14698	0	56
<i>C. paucienfuscatus</i> X <i>C. plaumanni</i>	0,97111	0,19685	0,19116	0	72
<i>C. paucienfuscatus</i> X <i>C. ruizi</i>	0,98151	0,18585	0,18241	0	69
<i>C. plaumanni</i> X <i>C. ruizi</i>	0,97597	0,11549	0,11249	0	42

---

Fst: Diferenciação genética entre pares; Dxy: Número médio de substituições de nucleotídeos por local entre as populações; Da: Número de substituições líquidas de nucleotídeos por local entre as populações; Ss: Número de polimorfismos compartilhados entre pares de populações; Sf: Número de diferenças fixas entre pares de populações.

**Tabela 7 (14).** Distância genética entre as 12 espécies de *Culicoides*. coletadas nos municípios: de Itaituba, Oriximiná e Óbidos, no estado do Pará; Presidente Figueiredo e Tefé, no estado do Amazonas; Porto Velho, Amazonas.

Espécies	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>C. jurutiensis</i>	0,000											
<i>C. ruizi</i>	0,199	0,000										
<i>C. debilipalpis</i>	0,232	0,229	0,000									
<i>C. foxi</i>	0,225	0,118	0,272	0,000								
<i>C. fusipalpis</i>	0,248	0,129	0,253	0,152	0,000							
<i>C. glabrior</i>	0,303	0,218	0,284	0,264	0,237	0,000						
<i>C. hylas</i>	0,217	0,142	0,241	0,162	0,145	0,280	0,000					
<i>C. insignis</i>	0,237	0,119	0,248	0,132	0,125	0,248	0,159	0,000				
<i>C. paraensis</i>	0,215	0,170	0,199	0,213	0,195	0,233	0,170	0,217	0,000			
<i>C. paucienfuscatus</i>	0,219	0,189	0,218	0,195	0,229	0,237	0,213	0,181	0,225	0,000		
<i>C. plaumanni</i>	0,257	0,119	0,258	0,156	0,136	0,253	0,180	0,132	0,214	0,195	0,000	
<i>C. pseudodiabolicus</i>	0,300	0,172	0,233	0,182	0,169	0,230	0,196	0,143	0,225	0,210	0,161	0,000

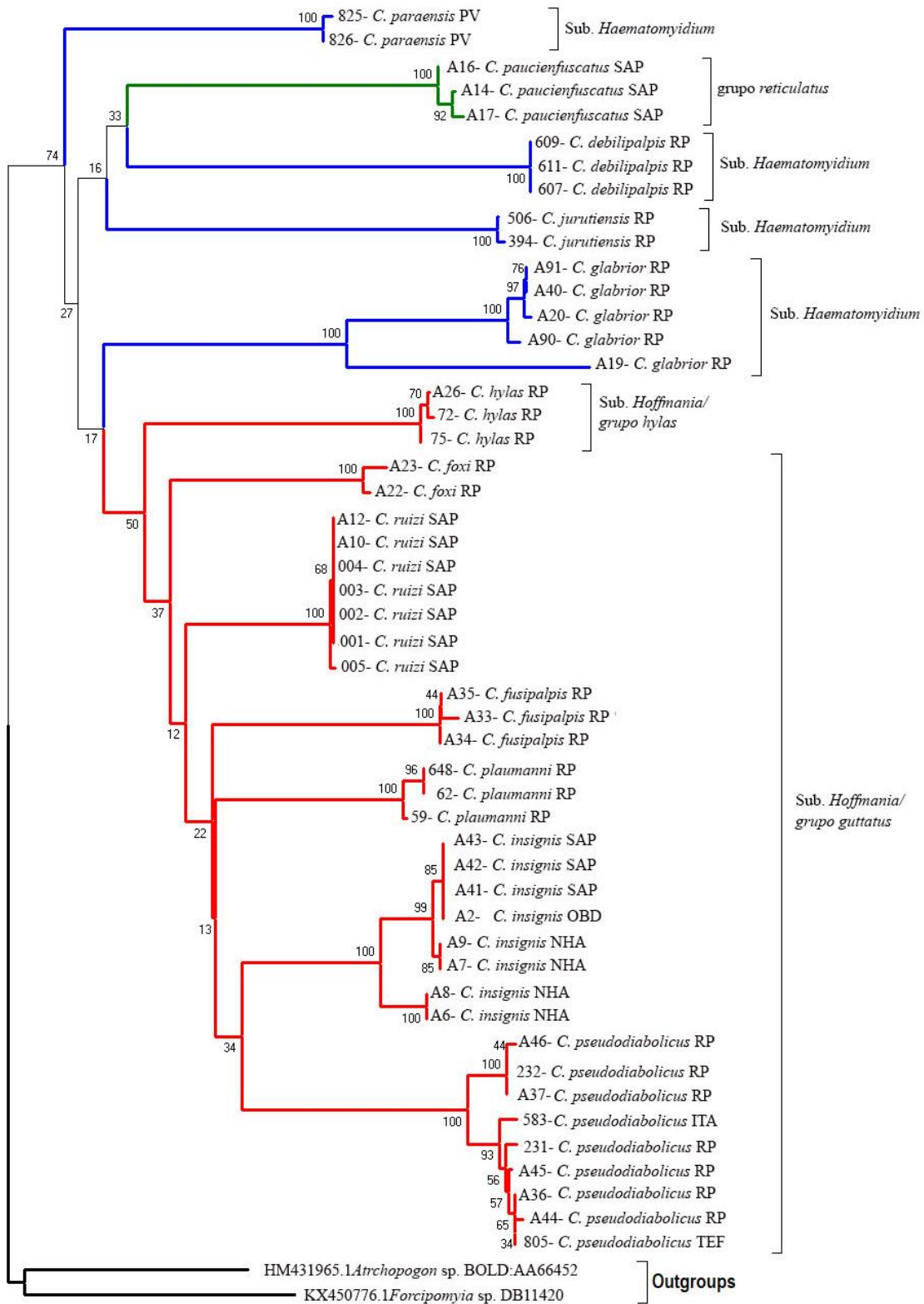
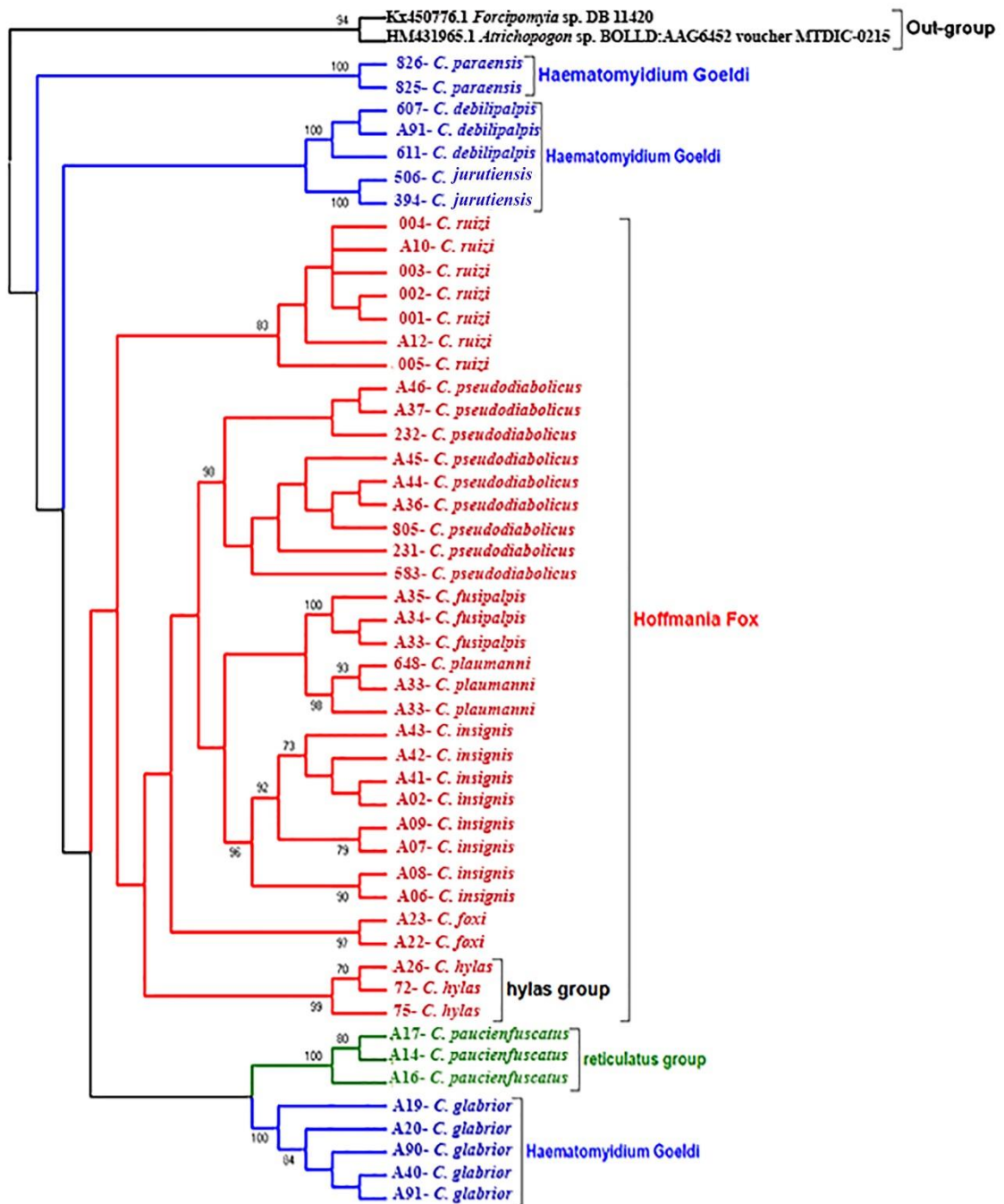


Figura 16 (66). Árvores obtidas a partir da análise de nucleotídeos para o COI 1 (com método NJ) para 12 espécies de *Culicoides*. Com valor de “bootstrap” de 1000 réplicas.





**Figura 17 (67).** Árvore obtidas a partir da análise de nucleótidos para o COI 1 (com método Máxima verossimilhança) para 12 espécies de *Culicoides*. Com valor de “bootstrap” de 1000 réplicas.

#### 4. CONCLUSÃO

A taxonomia integrada apontou que a morfologia, MG e DNA Barcode estão bem relacionadas, pois a classificação atual mostrou-se concordantes com resultados genéticos e morfométricos, com exceção de *Culicoides glabrior*.

Para a MG, a variação das asas entre as espécies do subgênero *Culicoides* indicou que existem diferenças significativas nos dois componentes da forma, ou seja, tamanho e forma para os 17 grupos, sendo que a ANOVA mostrou diferenças significativas para o TC e o teste de Tukey indicou que as variações ocorreram entre a maioria das espécies, com exceção entre algumas populações da mesma espécie e, mas as variações de forma foram mais confiáveis para separar os 17 grupos estudados, pois a ANOVA na ACP e a MANOVA na AVC apresentaram diferenças significativas.

Os dados sugerem que a espécie *C. glabrior* não pertença ao Subgênero *Haematomyidium*, pois as ACP e AVC mostraram um claro agrupamento da espécie distante das demais espécies de seu subgênero, concordando a árvore de Máxima Verossimilhança do DNAm.

As análises filogenéticas por Neighbor-Joining e Máxima Verossimilhança, apontam que o subgênero *Hoffmania* é monofilético e *Haematomyidium* como parafilético e irmão do grupo *reticulatus* (representado por uma espécie, *C. paucienfuscatus*).

O DNA Barcode para investigar os limites das espécies de *Culicoides*, apesar de concordantes com a identificação morfológica e morfométrica, verificaram que algumas espécies eram geneticamente e morfologicamente uniformes nas distribuições amostradas. No entanto, as diferenças de sequência sintomáticas da diversidade de espécies crípticas estavam presentes em alguns grupos que requerem uma investigação mais profunda.

As duas espécies de vetores de arbovírus, *Culicoides paraensis* foi geneticamente uniforme para as duas sequências, mas *Culicoides insignis* continham três ou mais populações geneticamente independentes de espécies crípticas que, em alguns casos, eram simpátricas.

Mais estudos com outros marcadores são necessários para a validação dessa técnica, devido a formação de grupos irmãos dentro de uma mesma espécie simpátrica, para esclarecer as descrições taxonômicas em nível de espécie, bem como, maior número de amostras para estudos de populações para as espécies de vetores, *C. paraensis* e *C. insignis*.

É necessário estabelecer biblioteca de sequência DNA Barcode e de outros marcadores para espécies de *Culicoides* coletadas em diferentes locais na bacia Amazônica brasileira.

A taxonomia integrada oferece maior confiança na identificação a nível específico, facilitando o estudo da fauna, bem como, auxiliando no monitoramento, investigações e vigilâncias epidemiológicas.

## 5. REFERÊNCIA

- 1- Borkent A, Dominiak P. Catalog of the Biting Midges of the World (Diptera: Ceratopogonidae). Zootaxa [Internet]. 2020 [citado em 27 de julho de 2021]; 4787: 1–377. Disponível em: <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4787.1.1>
- 2- Santarém MC.; Felipe-Bauer ML. Brazilian species of biting midges - espécies de maruins do Brasil (Diptera: Ceratopogonidae). 2021 [citado em 27 de julho de 2021]. Disponível em: [https://portal.fiocruz.br/sites/portal.fiocruz.br/files/documentos/brazilian\\_species\\_of\\_biting\\_midges\\_2021\\_0.pdf](https://portal.fiocruz.br/sites/portal.fiocruz.br/files/documentos/brazilian_species_of_biting_midges_2021_0.pdf)
- 3- Meiswinkel R, Nevill EM, Venter GJ. Vectors: *Culicoides* spp. In: Coetzer JAW, Thomson GR, Tustin RC, editores. *Infectious Diseases of Livestock with Special Reference to Southern Africa*. New York: Cape Town, Oxford University. 1994. p. 68–89.

- 4- Mellor PS, Boorman J, Baylis M. *Culicoides* Biting midges: Their Role as Arbovirus Vectors. *Annu Rev Entomol* [Internet]. 2000 [citado em 27 de julho de 2021]; 45(1):307-340. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.45.1.307>
- 5- Carpenter S, Veronesi E, Mullens B, Venter G. Vector competence of *Culicoides* for arboviroses: Three major periods of research, their influence on current studies and future directions. *Rev Sci Tech* [Internet]. 2015 [citado em 27 de julho de 2021]; 34(1):97-112. Disponível em: <https://doi.org/10.20506/rst.34.1.2347>
- 6- Borkent A. Numbers of Extant and Fossil Species of Ceratopogonidae. 2016 [citado em 27 de julho de 2021]. Disponível em: <https://www.inhs.illinois.edu/files/4014/6785/5847/WorldCatalogtaxa.pdf>.
- 7- Wirth WW, Dyce AL, Spinelli G.R. An atlas of wing photographs, with a summary of the numerical characters of the neotropical species of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). *Contr Am Entomol*. 1988; Inst.25(1):1-72.
- 8- Felipe-Bauer ML. A importância do padrão das manchas das asas em *Culicoides* (Latreille, 1809) (Diptera: Ceratopogonidae): Sua limitação. *Entomol Vect*. 2003; 10(4): 595-600.
- 9- Pagès N, Muñoz-Muñoz F, Talavera S, Sarton V, Lorca C, Núñez JI. Identification of cryptic species of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in the subgenus *Culicoides* and development of species-specific PCR assays based on Barcode regions. *Vet Parasitol* [Internet]. 2009 [citado em 27 de julho de 2021];165: 298-310. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.07.020>
- 10- Felipe-Bauer ML, Cáceres AG, Silva CS, Valderrama-Bazan W, Gonzáles-Perez A. A new *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) of the subgenus *Diphaomyia* from Peru. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2005 [citado em 27 de julho de 2021]; 100(1):51-53. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0074-02762005000100010>
- 11- Felipe-Bauer ML, Cáceres AG, Silva CS, Valderrama-Bazan W, Gonzales-Perez A. Two new *Culicoides* of the *paraensis* species group (Diptera: Ceratopogonidae) from the Amazonian region of Peru. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2003 [citado em 27 de julho de 2021]; 98 (8): 1051-1058. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762003000800014>

- 12- Harrup LE, Bellis GA, Balenghien T, Garros C. *Culicoides* Latreille Diptera: (Ceratopogonidae) taxonomy: current challenges and future directions. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2015 [citado em 27 de julho de 2021]; 30:249–266. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.12.018>
- 13- Seblova V, Sadlova J, Carpenter S, Volf P. Development of *Leishmania* parasites in *Culicoides nubeculosus* (Diptera: Ceratopogonidae) and implications for screening vector competence. *J Med Entomol* [Internet]. 2012 [citado em 27 de julho de 2021]; 49(5):967–970. Disponível em: <https://doi.org/10.1603/me12053>
- 14- Seblova V, Sadlova J, Vojtkova B, Votypka J, Carpenter S, Bates PA, et al. The biting midge *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) is capable of developing late stage infections of *Leishmania enriettii*. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2015 [citado em 27 de julho de 2021]; 9(9):e0004060. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004060>
- 15- Slama D, Haouas N, Remadi L, Mezhoud H, Babba H, Chaker E. First detection of *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae). *Parasit Vectors* [Internet]. 2014 [citado em 28 de julho de 2021] 7:51. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-51>
- 16- Borkent A, Spinelli GR. Neotropical Ceratopogonidae (Diptera: Insecta). In Adis J, Arias JR, Rueda-Delgado G, Wantzen KM. *Aquatic biodiversity in Latin America*, Pensoft, Sofia-Moscow. 2007; 4: 198p.
- 17- Linley JR. Autogeny in the Ceratopogonidae: Literature and notes. *Fla Entomol* [Internet]. 1983 [citado em 28 de julho de 2021] 66(2): 228-234. Disponível em: <https://doi.org/10.2307/3494245>
- 18- Simonsen PE, Onapa AW, Asio SM. *Mansonella perstans* filariasis in Africa. *Acta Trop* [Internet]. 2011 [citado em 28 de julho de 2021]; 120:109–120. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.01.014>
- 19- Bassene H, Sambou M, Fenollar F, Clarke S, Djiba S, Mourembou G, et al. High prevalence of *Mansonella perstans* filariasis in rural Senegal. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2015 [citado em 28 de julho de 2021]; 93(3):601–606. Disponível em: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0051>

- 20- Debrah LB, Nausch N, Opoku VS, Owusu W, Mubarik Y, Berko DA, et al. Epidemiology of *Mansonella perstans* in the middle belt of Ghana. *Parasit Vectors* [Internet]. 2017 [citado em 28 de julho de 2021]; 10:15. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1960-0>
- 21- Silva LBT, Crainey JL, Silva TRR, Suwa UF, Vicente ACP, Medeiros JF, et al. Molecular Verification of New World *Mansonella perstans* Parasitemias. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2017 [citado em 28 de julho de 2021];23(3):545-547. <https://doi.org/10.3201/eid2303.161159>
- 22- Wilson AJ, Mellor PS. Bluetongue in Europe: past, present and future. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* [Internet]. 2009 [citado em 28 de julho de 2021];364(1530):2669-81. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0091>
- 23- Hoffmann B, Scheuch M, Hoper D, Jungblut R, Holsteg M, Schirrmeyer H, et. al. Novel orthobunyavirus in cattle, Europe, 2011. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2012 [citado em 28 de julho de 2021]; 18(3): 469-472. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3201/eid1803.111905>
- 24- Tesh RB. The emerging epidemiology of Venezuelan hemorrhagic fever and Oropouche fever in tropical South America. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 1994 [citado em 28 de julho de 2021]; 740: 129-137. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1994.tb19863.x>
- 25- Shelley AJ, Coscarón S. Simuliid blackflies (Diptera: Simuliidae) and ceratopogonid midges (Diptera: Ceratopogonidae) as vectors of *Mansonella ozzardi* (Nematoda: Onchocercidae) in northern Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2001 [citado em 29 de julho de 2021]; 96(4): 451-458. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762001000400003>
- 26- Rosa JFT, Souza WM, Pinheiro FP, Figueiredo ML, Cardoso JF, Acrani GO, et al. Oropouche Virus: Clinical, Epidemiological, and Molecular Aspects of a Neglected Orthobunyavirus. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2017 [citado em 29 de julho de 2021]; 96 (5):1019–1030. Disponível em: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0672>
- 27- Pinheiro FP, Travassos da Rosa APA, Vasconcelos PFC. Oropouche fever. In: Feigin RD Feigin, editor. *Textbook of pediatric infectious disease*. Philadelphia: W. B. Saunders Co.; 2004. p. 2418-2423.

- 28- Carpenter S, Groschup MH, Garros C, Felipe-Bauer ML, Purse BV. *Culicoides* biting midges, arboviruses and public health in Europe. *Antiviral Res* [Internet]. 2013 [citado em 29 de julho de 2021]; 100(1):102–113. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.07.020>
- 29- Felipe-Bauer ML. *Culicoides paraensis* (Diptera: Ceratopogonidae) infestations in cities of the Itapocú River valley, southern Brazil. *Entomol News* [Internet]. 2008 [citado em 29 de julho de 2021]; 119 (2):185–192. Disponível em: [http://doi.org/10.3157/0013-872X\(2008\)119\[185:CPDCII\]2.0.CO;2](http://doi.org/10.3157/0013-872X(2008)119[185:CPDCII]2.0.CO;2)
- 30- Ronderos MM, Greco NM, Spinelli GR. Diversity of Biting Midges of the Genus *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) in the Area of the Yacyretá Dam Lake between Argentina and Paraguay. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2003 [citado em 29 de julho de 2021]; 98(1): 19-24. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762003000100003>
- 31- Tanya VN, Greiner EC, Gibbs EPJ. Evaluation of *Culicoides insignis* (Diptera: Ceratopogonidae) as a vector of bluetongue virus. *Vet Microbiol* [Internet]. 1992 [citado em 29 de julho de 2021]; 32(1):1-14. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(92\)90002-B](https://doi.org/10.1016/0378-1135(92)90002-B)
- 32- Greiner EC, Knausenberger WI, Mesersmith M, Kramer WL, Gibbs EPJ. *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae) associated with cattle in St. Croix, Virgin Islands, and their relevance to bluetongue virus. *J Med Entomol* [Internet]. 1990 [citado em 29 de julho de 2021]; 27(6): 1071-1073. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jmedent/27.6.1071>
- 33- Saenz MR, Greiner EC. *Culicoides* aspirated from cattle in Costa Rica, Honduras, Panama and Puerto Rico, and their role as potential vectors of bluetongue viruses. *Med Vet Entomol* [Internet]. 1994 [citado em 29 de julho de 2021]; 8(1):15–19. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1994.tb00377.x>
- 34- Carvalho LPC, Pereira Júnior AM, Farias ES, Almeida JF, Rodrigues MS, Resadore F, et al. A study of *Culicoides* in Rondônia, in the Brazilian Amazon: species composition, relative abundance and potential vectors. *Med Vet Entomol* [Internet]. 2016 [citado em 29 de julho de 2021];31(1):117-122. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/mve.12208>

- 35- Homan EJ, Mo CL, Thompson LH, Barreto CH, Oviedo MT, Gibbs EP, et al. Epidemiologic study of bluetongue virus in Central America and the Caribbean: 1986–1988. *Am J Vet Res.* 1990; 51(7): 1089–1094.
- 36- Corrêa TG, Ferreira JM, Riet-Correa G, Ruas JL, Schild AL, Riet-Correa F, et al. Seasonal allergic dermatitis in sheep in southern Brazil caused by *Culicoides insignis* (Diptera: Ceratopogonidae). *Vet Parasitol* [Internet]. 2007 [citado em 29 de julho de 2021]; 145(1-2):181-185. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.10.025>
- 37- Will KW, Mishler BD, Wheeler QD. The Perils of DNA Barcoding and the Need for Integrative Taxonomy. *Syst Biol* [Internet]. 2005 [citado em 29 de julho de 2021]; 54 (5): 844-851. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10635150500354878>
- 38- Farias ES, Almeida JF, Pereira-Silva JW, Coelho LS, Ríos-Velásquez CM, et al. Diversity of biting midges *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae), potential vectors of disease, in different environments in an Amazonian rural settlement, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 2020 [citado em 29 de julho de 2021];53:e20200067. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0067-2020>
- 39- Rohlf FJ, Marcus LF. A revolution in morphometrics. *Trends Ecol Evol* [Internet]. 1993 [citado em 29 de julho de 2021]; 8(4): 129-132. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(93\)90024-J](https://doi.org/10.1016/0169-5347(93)90024-J)
- 40- Dujardin JP. Morphometrics applied to medical entomology. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2008 [citado em 30 de julho de 2021]; 8 (6): 875-890. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2008.07.011>
- 41- Baylac M, Villemant C, Simbolotti G. Combining geometric morphometrics with pattern recognition for the investigation of species complexes. *Biol J Linn Soc Lond* [Internet]. 2003 [citado em 30 de julho de 2021]; 80: 89–98. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1095-8312.2003.00221.x>
- 42- Calle DA, Quiñones ML, Erazo HJ, Jaramillo N. Discriminación por morfometría geométrica de once especies de *Anopheles* (Nyssorhynchus) presentes en Colombia. *Biomedica* [Internet]. 2008 [citado em 30 de julho de 2021]; 28(3): 371-385. Disponível em: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v28i3.75>
- 43- Lorenz C, Marques TC, Sallum MAM, Suesdek L. Morphometrical diagnosis of the malaria vectors *Anopheles cruzii*, *An. homunculus* and *An. bellator*. *Parasit Vectors*



- [Internet]. 2012 [citado em 30 de julho de 2021]; 5: 257. Disponível em: <http://doi.org/10.1186/1756-3305-5-257>
- 44- Jirakanjanakit N, Dujardin JP. Discrimination of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) laboratory lines based on wing geometry. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2005; 36: 858–861.
- 45- Vidal PO, Carvalho E, Suesdek L. Temporal variation of wing geometry in *Aedes albopictus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2012 [citado em 30 de julho de 2021];107(8): 1030-1034. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000800011>
- 46- Dujardin JP, Bermúdez H, Schofield CJ. The use of morphometrics in entomological surveillance of sylvatic foci of *Triatoma infestans* in Bolivia. *Acta Trop* [Internet]. 1997 [acessado 29 jul. 2021]; 66(3): 145-153. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0001-706x\(97\)00038-7](https://doi.org/10.1016/s0001-706x(97)00038-7)
- 47- Godoy R, Galati EAB, Estrela PC. 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* [Internet]. 2014 [citado em 30 de julho de 2021]; 3838, 501– 517. Disponível em: <http://doi.org/10.11646/zootaxa.3838.5.1>
- 48- Freitas MTS, Ríos-Velasquez CM, Costa CRJr, Figueiredo CA, Aragão N C, et al. Phenotypic and genotypic variations among three allopatric populations of *Lutzomyia umbratilis*, main vector of *Leishmania guyanensis*. *Parasit Vectors* [Internet]. 2015 [citado em 30 de julho de 2021]; 8(1):448. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1051-7>
- 49- Giordani BF, Andrade AJ, Galati EAB, Gurgel-Gonçalves R. The role of wing geometric morphometrics in the identification of sandflies within the subgenus *Lutzomyia*. *Med Vet Entomol* [Internet]. 2017 [citado em 30 de julho de 2021]; Disponível em: <https://doi.org/10.1111/mve.12245>
- 50- Godoy RE, Shimabukuro PH, Santos TV, Pessoa FAC, Cunha AEFL, Santos FKM, et al. Geometric morphometry of the head in sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), an alternative approach to taxonomy studies. *Zootaxa* [Internet]. 2018 [citado em 30 de

julho de 2021]; 4504(4), 566–576. Disponível em: <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4504.4.7>

- 51- Demari-Silva B, Suesdek L, Sallum MAM, Marrelli MT. Wing geometry of *Culex coronator* (Diptera: Culicidae) from South and Southeast Brazil. *Parasit Vectors* [Internet]. 2014 [citado em 30 de julho de 2021]; 7:174. Disponível em: <http://doi.org/10.1186/1756-3305-7-174>
- 52- Augot D, Sauvage F, Jouet D, Simphal E, Veuille M, Couloux A, et al. Discrimination of *Culicoides obsoletus* and *C. scoticus*, potential bluetongue vectors, by morphometrical and mitochondrial cytochrome oxidase subunit I analysis. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2010 [citado em 31 de julho de 2021]; 10(5): 629–637. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.03.016>
- 53- Muñoz-Muñoz F, Talavera S, Pagès N. Geometric Morphometrics of the Wing in the Subgenus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae): from Practical Implications to Evolutionary Interpretations. *J Med Entomol* [Internet]. 2011 [citado em 31 de julho de 2021]; 48(2): 129-139. Disponível em: <https://doi.org/10.1603/ME10110>
- 54- Muñoz-Muñoz F, Talavera S, Carpenter S, Nielsen SA, Werner D, Pagès N. Phenotypic differentiation and phylogenetic signal of wing shape in western European biting midges, *Culicoides* spp., of the subgenus *Avaritia*. *Med Vet Entomol* [Internet]. 2014 [citado em 31 de julho de 2021]; 28(3):319–329. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/mve.12042>
- 55- Henni HL, Sauvage F, Ninio C, Depaquit J, Augot D. Wing geometry as a tool for discrimination of *Obsoletus* group (Diptera: Ceratopogonidae: *Culicoides*) in France *Infect Genet Evol* [Internet]. 2014 [citado em 31 de julho de 2021]; 21: 110-117. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.10.008>
- 56- Ander M, Troell K, Chirico J. Barcoding of biting midges in the genus *Culicoides*: a tool for species determination. *Med Vet Entomol* [Internet]. 2013 [citado em 31 de julho de 2021]; 27(3): 323–31. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2012.01050.x>
- 57- Augot D, Ninio C, Akhoundi M, Lehrter V, Couloux A, et al. Characterization of two cryptic species, *Culicoides stigma* and *C. parroti* (Diptera: Ceratopogonidae), based on barcode regions and morphology. *J Vector Ecol* [Internet]. 2013 [citado em 31 de julho de 2021]; 38(2):260-265. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2013.12039.x>

- 58- Perrin A, Cêtre-Sossah C, Mathieu B, Baldet T, Delécolle JC, Albina E. Phylogenetic analysis of *Culicoides* species from France based on nuclear ITS1-rDNA sequences. *Med Vet Entomol* [Internet]. 2006 [citado em 31 de julho de 2021]; 20(2):219-228. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2006.00616.x>
- 59- Mathieu B, Perrin A, Baldet T, Delécolle JC, Albina E, Cêtre-Sossah C. Molecular Identification of Western European species of *Obsoletus* complex (Diptera: Ceratopogonidae) by an Internal Transcribed Spacer-1 rDNA multiplex polymerase chain reaction assay. *J Med Entomol* [Internet]. 2007 [citado em 31 de julho de 2021]; 44(6):1019-1025. Disponível em: [https://doi.org/10.1603/0022-2585\(2007\)44\[1019:miowes\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2007)44[1019:miowes]2.0.co;2)
- 60- Gomulski LM, Meiswinkel R, Delécolle JC, Goffredo M, Gasperi G. Phylogenetic relationships of the subgenus *Avaritia* Fox, 1995 including *Culicoides obsoletus* (Diptera, Ceratopogonidae) in Italy based on internal transcribed spacer 2 ribosomal DNA sequences. *Syst Entomol* [Internet]. 2005 [citado em 31 de julho de 2021]; 30(4):619-631. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2005.00286.x>
- 61- Monaco F, Benedetto L, Di Marcello V, Leilli R, Goffredo M. Development and preliminary evaluation of a real-time polymerase chain reaction for the identification of *Culicoides obsoletus* sensu strictu, *C. scoticus* and *C. montanus* in the *Obsoletus* Complex in Italy. *Vet Ital.* 2010; 46(2): 215-220.
- 62- Carpenter S, Wilson A, Mellor PS. *Culicoides* and the emergence of bluetongue virus in northern Europe. *Trends Microbiol* [Internet]. 2009 [citado em 31 de julho de 2021]; 17(4): 172-8. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.01.001>
- 63- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, Dewaard JR. Biological identifications through DNA Barcodes. *Proc Biol Sci* [Internet]. 2003 [citado em 31 de julho de 2021]; 270 (1512): 313-321. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- 64- Pagès N, Sarto i Monteys V. Differentiation of *Culicoides obsoletus* and *Culicoides scoticus* (Diptera: Ceratopogonidae) based on mitochondrial cytochrome oxidase subunit I. *J Med Entomol* [Internet]. 2005 [citado em 31 de julho de 2021]; 42(6): 1026–1034. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jmedent/42.6.1026>
- 65- Cêtre-Sossah C, Baldet T, Delécolle JC, Mathieu B, Perrin A, et al. Molecular detection of *Culicoides* spp. and *Culicoides imicola*, the principle vector of African horse sickness

- (AHS) in Africa and Europe. *Vet Res* [Internet]. 2004 [citado em 31 de julho de 2021]; 35(3): 325-337. Disponível em: <https://doi.org/10.1051/vetres:2004015>
- 66- Bellis GA, Dyce AL, Gopurenko D, Mitchell A. Revision of the Immaculatus Group of *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) from the Australasian Region with description of two new species. *Zootaxa* [Internet]. 2013 [citado em 31 de julho de 2021]; 3680:015–037. Disponível em: <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3680.1.4>
- 67- Augot D, Mathieu B, Hadj-Henni L, Barriol V, Mena SZ, Smolis S, et al. Molecular phylogeny of 42 species of *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae) from three continents. *Parasite* [Internet]. 2017 [citado em 01 de agosto de 2021]; 24(3):23. Disponível em: <https://doi.org/10.1051/parasite/2017020>
- 68- Nielse SA, Kristensen M. Delineation of *Culicoides* species by morphology and barcode exemplified by three new species of the subgenus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) from Scandinavia. *Parasit Vectors* [Internet]. 2015 [citado em 01 de agosto de 2021]; 8(1): 151. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0750-4>.
- 69- Lassen SB, Nielsen SA, Skovgard H, Kristensen M. Molecular differentiation of *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) from the subgenus *Culicoides* Latreille in Denmark. *Parasitol Res* [Internet]. 2012 [citado em 01 de agosto de 2021]; 10 (5): 1765-71. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2697-5>
- 70- Talavera S, Muñoz-Muñoz F, Verdún M, Pagès N. Morphology and DNA barcoding reveal three species in one: description of *Culicoides cryptipulicaris* sp. nov. and *Culicoides quasipulicaris* sp. nov. in the subgenus *Culicoides*. *Med Vet Entomol* [Internet]. 2017 [citado em 01 de agosto de 2021]; 31(2): 178-191. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/mve.12228>
- 71- Linton YM, Luntz AJM, Cruickshank RH, Meiswinkel R, Mellor PS, Dallas JF. Phylogenetic analysis of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gene of five species of the *Culicoides imicola* species complex. *Med Vet Entomol* [Internet]. 2002 [citado em 01 de agosto de 2021]; 16 (2):139-146. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.2002.00356.x>.
- 72- Bellis GA, Dyce AL, Gopurenko D, Mitchell A. Revision of the Immaculatus Group of *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) from the Australasian Region with

- description of two new species. *Zootaxa* [Internet]. 2013 [citado em 01 de agosto de 2021]; 3680:015–037. Disponível em: <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3680.1.4>
- 73- Wirth WW, Marston N. Method for mounting small insects on microscope slides in Canada balsam. *Ann Entomol Soc Am*. 1968; 61(3): 783–784.
- 74- Staden R. The Staden sequence analysis package. *Mol Biotechnol* [Internet]. 1996 [citado em 01 de agosto de 2021]; 5(3):233-241. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/bf02900361>
- 75- Tamura K, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* [Internet]. 2011 [citado em 01 de agosto de 2021]; 28(10): 2731-2739. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>
- 76- Edgar RC. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* [Internet]. 2004 [citado em 01 de agosto de 2021]; 5:113. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-5-113>.
- 77- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* [Internet]. 2010 [citado em 01 de agosto de 2021]; 59 (3):307–321. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>.
- 78- Posada, D. jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol* [Internet]. 2008 [citado em 01 de agosto de 2021]; 25 (7): 1253-1256. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/molbev/msn083>.
- 79- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Bio Evol* [Internet]. 1987 [citado em 01 de agosto de 2021]; 4(4):406–425. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- 80- Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* [Internet]. 1980 [citado em 01 de agosto de 2021]; 16(2): 111–120. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/bf01731581>
- 81- Excoffier L, Lischer HEL. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour* [Internet]. 2010

- [citado em 02 de agosto de 2021]; 10 (3): 564-567. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
- 82- Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* [Internet]. 2003 [citado em 02 de agosto de 2021]; 19(18) 2496-2497. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg359>.
- 83- Rios RRS, Santarém MCA, Ribeiro Júnior KAL, Melo BA, Silva SGM, Silva NC, et. al. *Culicoides insignis* Lutz, 1913 (Diptera: Ceratopogonidae) Biting Midges in Northeast of Brazil. *Insects* [Internet]. 2021 [citado em 02 de agosto de 2021];12: 366. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/insects12040366>.
- 84- Bakhoun MT, Sarr M, Fall AG. et al. DNA barcoding and molecular identification of field-collected *Culicoides* larvae in the Niayes area of Senegal. *Parasit Vectors* [Internet]. 2018 [citado em 02 de agosto de 2021]; 11, 615. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3176-y>.
- 85- Gomulski LM, Meiswinkel R, Delécolle JC, Goffredo M, Gasperi G. Phylogeny of the subgenus *Culicoides* and related species in Italy, inferred from internal transcribed spacer 2 ribosomal DNA sequences. *Med Vet Entomol* [Internet]. 2006 [citado em 02 de agosto de 2021]; 20(2): 229–238. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2006.00620.x>.
- 86- Coyne JA, Price TD. Little evidence for sympatric speciation in island birds. *Evolution* [Internet]. 2000 [citado em 02 de agosto de 2021]; 54(6): 2166–2171. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2000.tb01260.x>
- 87- Tomazatos A, Jöst H, Schulze J, Spînu M, Schmidt-Chanasit J, Cadar D, Lühken R. Blood-meal analysis of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) reveals a broad host range and new species records for Romania. *Parasit Vectors* [Internet]. 2020 [citado em 02 de agosto de 2021]; 13:79. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-020-3938-1>
- 88- Ander M, Troell K, Chirico J. Barcoding of biting midges in the genus *Culicoides*: a tool for species determination. *Med Vet Entomol* [Internet]. 2013 [citado em 02 de agosto de 2021]; 27(3): 323-331. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2012.01050.x>
- 89- Gopurenko D, Bellis GA, Yanase T, Wardhana AH, Thepparat A, J Wang, et. al. Integrative taxonomy to investigate species boundaries within *Culicoides* (Diptera:

Ceratopogonidae): a case study using subgenus *Avaritia* from Australasia and Eastern Asia. *Vet Ital* [Internet]. 2015 [citado em 02 de agosto de 2021]; 51 (4), 345-378. Disponível em: <https://doi.org/10.12834/VetIt.515.2463.2>

- 90- Harrup LE, Laban S, Purse BV. et al. DNA barcoding and surveillance sampling strategies for *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) in southern India. *Parasit Vectors* [Internet]. 2016 [citado em 02 de agosto de 2021]; 9(1):461. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1722-z>

## CAPÍTULO IV

### **DESCRIPTION OF THREE NEW SPECIES OF BITING MIDGE OF THE GENUS *Atrichopogon* KIEFFER (DIPTERA: CERATOPOGONIDAE) FROM THE BRAZILIAN AMAZON**

Emanuelle de Sousa Farias<sup>1,2</sup>, Sanmya Silva Dos Santos<sup>1,3</sup>, Jokebede Melynda Dos Santos Paulino-Rosa<sup>1,4</sup>, Felipe Arley Costa Pessoa<sup>1\*</sup>

1. Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ. Laboratório de Ecologia e Doenças Transmissíveis na Amazônia, Manaus, Amazonas, Brazil.
2. Instituto Oswaldo Cruz-IOC/FIOCRUZ. Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.
3. Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ. Programa de Bolsa de Iniciação Científica – PIBIC/CNPq4. Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Interação Patógeno Hospedeiro, Manaus, Amazonas, Brazil.

#### **Corresponding author**

Correspondence to Felipe Arley Costa Pessoa, Instituto Leônidas e Maria Deane - FIOCRUZ Amazônia, Laboratório de Ecologia e Doenças Transmissíveis na Amazônia, Rua Terezina, 476, Adrianópolis, Manaus, Amazonas, CEP 69.057-070, Brazil. Telephone number (92) 984125634. E-mail: felipe.pessoa@fiocruz.br



## Abstract

Three new species of *Atrichopogon* with spotted wings of the family Ceratopogonidae (Diptera: Culicomorpha) from the Amazonas State of Brazil are described and illustrated. Male and female specimens of *Atrichopogon janseni* sp. nov., *A. riopardensis* sp. nov., and *A. sergioluzi* sp. nov. were associated by wing pigmentation patterns: with two darker spots, one over r-m and the other one in cell r<sub>3</sub>, posterior to the apex of R<sub>3</sub>. Male *A. janseni* sp. nov. have tergite 9 that is 2.5 × as broad as long, not extending to the apex of gonocoxite, and sternite 9 stout, subtrapezoidal, with distal margin with a row of stout spines; gonostylus of *A. janseni* sp. nov. is spatulate, with distinct middle notch. *Atrichopogon riopardensis* sp. nov. is separated from other species with similar wing patterns and forked gonostylus, with gonostylus forked near midlength, with longitudinal furrow, inner portion short and fingernail-like, outer portion elongate and apically curved directed mesally; outer portion is 4 × longer than inner, with one long seta in basal 1/3. Contrastingly, *A. sergioluzi* sp. nov. has a small fork at the apex of gonostylus, and cercus broad basally with rounded tip. Females of the three new species are very similar (as are other females in this group), and it is probably not possible to distinguish them using the morphological features described. With the addition of the three new species described here, there are now known 15 Neotropical species of *Atrichopogon* with pigmented wings.

**Keywords:** Forcipomyiinae, spotted wings, Culicomorpha, Neotropical.

## Introduction

Species of the genus *Atrichopogon* Kieffer are small dipterans of the family Ceratopogonidae (subfamily Forcipomyiinae), which contains 513 extant species and three extinct fossil species (Borkent & Dominiak 2020). They are common in all moist and terrestrial habitats (hygropetric) (Szadziewski *et al.* 1995; Marino *et al.* 2017). Adults may feed on pollen (de Meillon & Wirth 1989), while some are ectoparasites on large insects (Borkent & Rocha-

Filho 2006; Szadziewski *et al.* 2011). *Atrichopogon* is a genus that presents difficulties in its taxonomic systematics (Edwards 1926; Ewen & Saunders 1958; Boesel 1973) due to a lack of conspicuous adult characteristics. The adults of *Atrichopogon* are separated from the related *Forcipomyia* Meigen based on the occurrence of thoracic paratergite bearing at least one strong seta and costa reaching well beyond the middle of the wing (Debenham 1973; Borkent & Spinelli 2007). The oldest fossils were reported from Eocene Baltic amber, and the genus is most likely still experiencing evolutive radiation, as they are a recent group (Szadziewski *et al.* 1995).

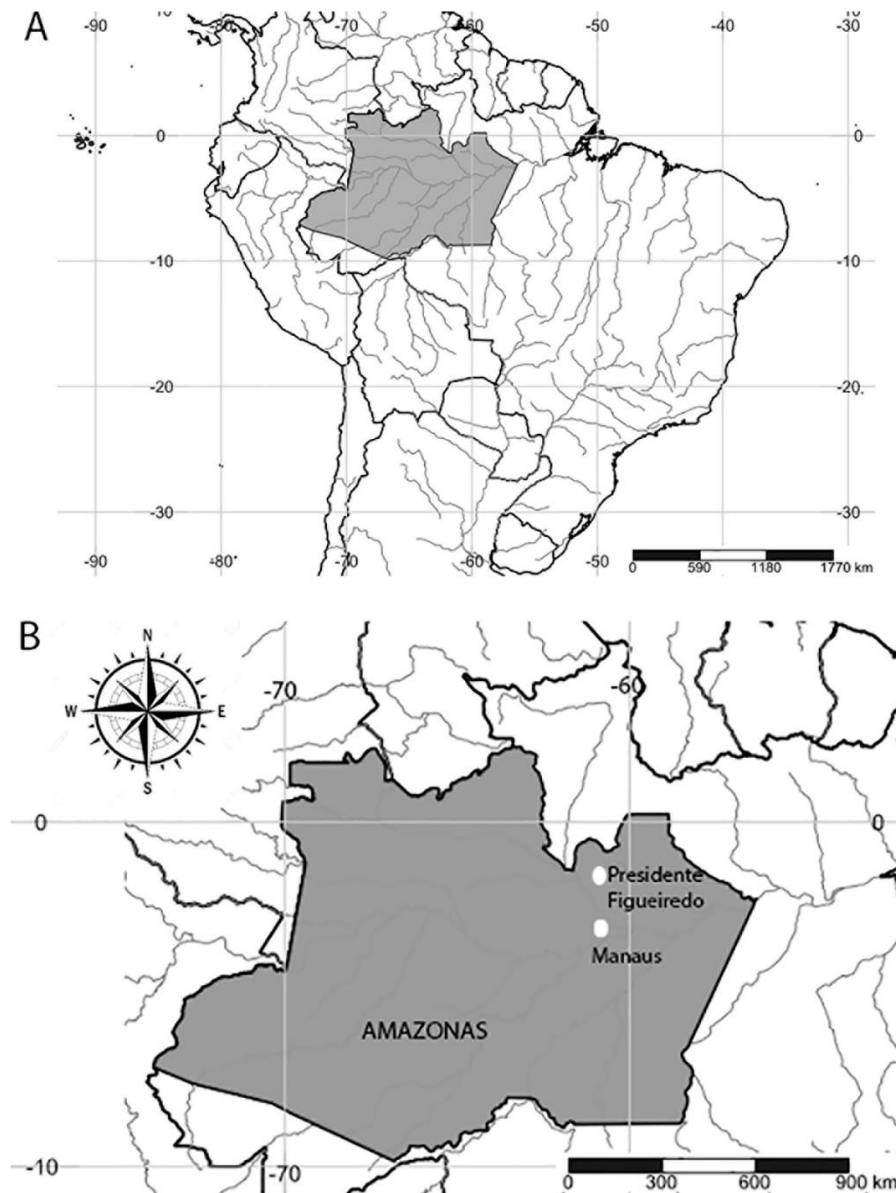
Most species of *Atrichopogon* look very much alike and cannot be confidently identified using morphology, and this group of biting midges is probably paraphyletic (Borkent & Picado 2004). Macfie (1939, 1949) described one species of *Atrichopogon* from Brazil and another one from Mexico, based only on females with pigmented wings. Clastrier (1968, 1979, 1987) described three species with distinctively pigmented wings from French Guiana and the Amazon Basin. Cavalieri & Chiossone (1973) and Spinelli & Marino (2007) described two species from Argentina and Paraguay. Borkent & Picado (2004) described a species from Costa Rica. Felipe-Bauer *et al.* (2012) and Felipe-Bauer (2018) described four species from Brazil, two in the Atlantic rainforest of Rio de Janeiro, and two from the state of Acre, from Brazil's Amazon rainforest, and proposed an identification key for Neotropical *Atrichopogon* with pigmented wings.

In an entomological survey of *Culicoides* in upland terra-firme forests of the Amazonas State, other members of Ceratopogonidae were collected. In this study, we describe three new species of *Atrichopogon* with pigmented wings, based on male and female specimens.

## Methodology

Collections were performed in forested areas of an Amazonian rural settlement, namely Rio Pardo (1°49'02.3" S 60°19'03.5" W), Presidente Figueiredo Municipality, Amazonas State, Brazil, and the ZF-2 reserve (2°35'21" S 60°06'55" W), Km 14, Manaus, Amazonas, Brazil (Fig. 1). The vegetation of the location is mainly composed of a mosaic of upland terra-firme Amazonian rainforest, which varies from primary and secondary forests, to open areas, and small farms with anthropogenic alterations (Ramos *et al.* 2014; Picelli *et al.* 2020). The area has a mean annual temperature of approximately 26°C, with relative air humidity over 80% (Araújo *et al.* 2002). Annual rainfall is over 2,000 mm and is usually concentrated in a rainy season that occurs from December to May (Marques Filho *et al.* 1981). The average elevation is 40–160 m above sea level (Laurance *et al.* 2011).

The specimens of *Atrichopogon* were captured by CDC light traps, installed 1.5 m above the ground and canopy during surveys conducted in 2010, 2015 and 2016 in the Rio Pardo settlement and by Malaise trap in 2018 in the ZF-2 reserve. The collected *Atrichopogon* were slide-mounted in phenol-canada balsam following the method described by Wirth & Marston (1968). The males and females of the species were identified according to their similar wing pigmentation before slide preparation. The meristic information is given as a range, followed by the mean and number of specimens examined.



**Figure 1 (68).** Location of the study area where *Atrichopogon* were captured. **A.** Brazil, Amazonas state in bold area; **B.** Location of Presidente Figueiredo and Manaus Municipalities in the Amazonas State. (modified after SimpleMappr, <http://www.simplemappr.net>).

The nomenclature of the morphological terms was from Szadziewski (2001), Borkent & Picado (2004), terms for wing veins follow Spinelli & Borkent (2004) (Fig. 3A) and meristic information was taken from Felipe-Bauer (2018) as follows: head width/mouthpart length was based on Borkent & Picado (2004); antennal ratio (AR) in males was calculated by dividing the

lengths of the flagellomeres 10–13 by the lengths of the flagellomeres 1–9, and in females, by dividing the lengths of the flagellomeres 9–13 by the lengths of the flagellomeres 1–8; palpal ratio (PRIII) of both sexes was determined by dividing the length of the third palpal segment by its greater width; costal ratio (CR) was measured by dividing the length of the wing by the length of the costal vein, both measured from the arculus; tarsal ratio was calculated by dividing the length of first tarsomere by the length of second tarsomere, calculated for foreleg (TRI), midleg (TRII) and hindleg (TRIII).

The images and measurements were obtained using a digital system (Synoptics, Cambridge, UK) attached to an optical microscope (Leica DM 1000, Frankfurt, Germany). The images were taken with a digital camera (JVC 3CCDTM, Wayne, USA), and Auto Montage 4.0 was used to obtain the final images. Holotypes and paratypes will be deposited in the National Institute of Amazonian Research (INPA), Manaus, Brazil, and in the Leônidas and Maria Deane Institute (ILMD/FIOCRUZ), Manaus, Brazil.

***Atrichopogon janseni* Pessoa & Farias sp. nov.**

(Figs. 2 A–E; 3 A–C; 4 A–G; 5 A–E; 6 A–E)

**Diagnosis.** Male. Only extant species of *Atrichopogon* with pigmented wings in the Neotropical region with gonostylus not forked, spatulate in distal 2/3, with distinct middle notch and quadratic apex. Female. Without good characteristic features: wing with two distinct darker spots; flagellomeres 1–8 more darker than flagellomeres 9–13; genitalia medium brown; spermatheca single, without neck, small and ovoid.

**Male.** Head brown (Fig. 2A); head width/mouth part length 2.60–2.90 (2.75, n = 2). Ommatidia with interfacet pubescence; broadly abutting medially for length of 3.00–3.40 (3.2, n = 2) ommatidia (Fig. 2D). Antenna medium brown, proportions of flagellomeres as in figure 2B; flagellomeres 2–10 fused; flagellomeres 1–9 dark brown with well-developed plumes; 10–

13 medium brown without plume setae; 9th flagellomere 0.65 times shorter than flagellomere 10; flagellomere 13 with apical projection slightly constricted basally. AR 0.92 (0.92, n = 2). Palpus medium brown (Figs. 2C, E); third segment short to moderately elongated, swollen at mid-length, with well-developed subapical pit; segments 4 and 5 separate. PRIII 2.60 (2.60, n = 2).

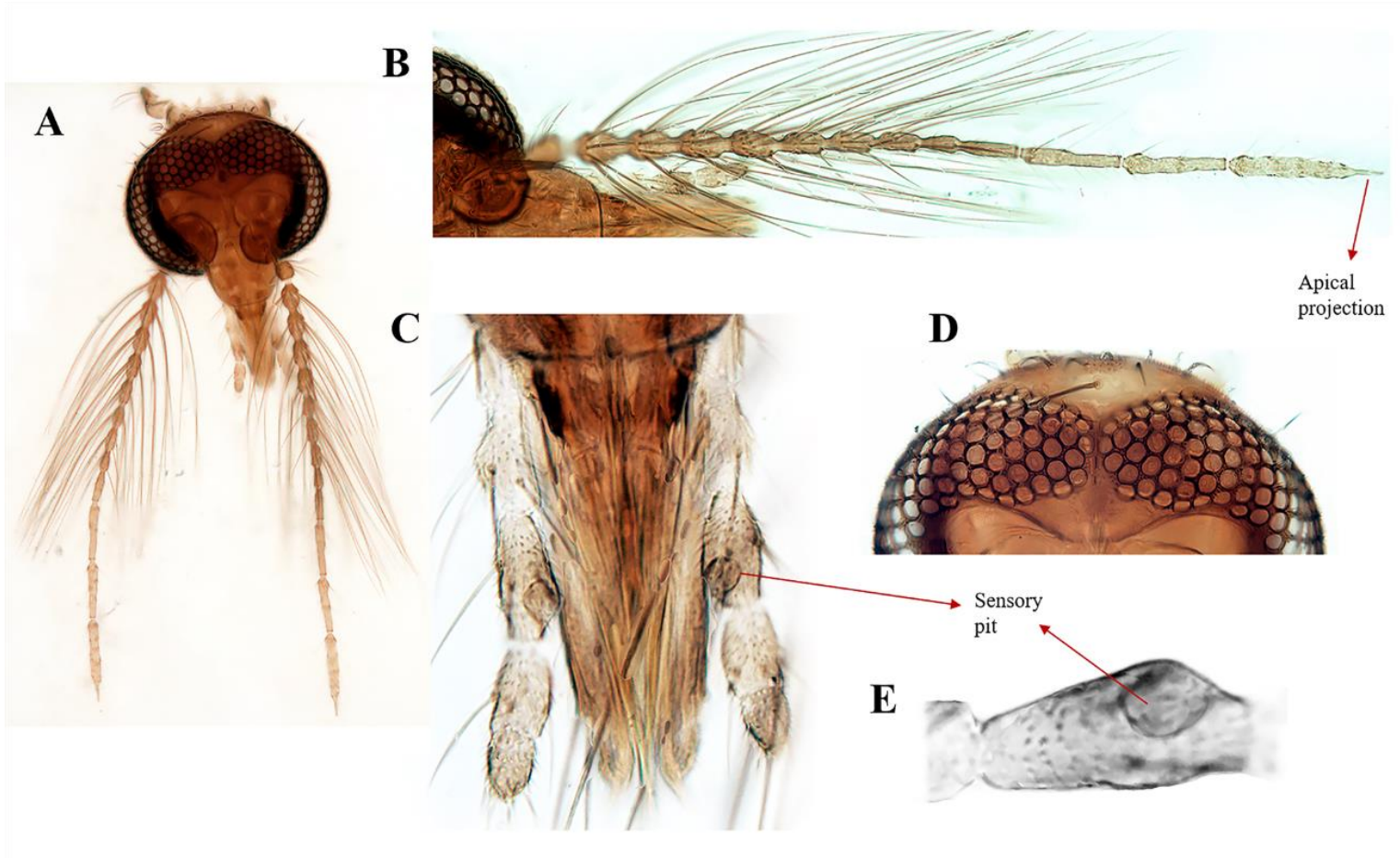
Thorax dark brown (Fig. 3B). Scutum with setae arising directly from surface, with lateral suture. Paratergite with one seta. Anepisternum well-developed, broadly bilobed posteriorly. Wing (Fig. 3A) with patch of pigmentation in area of r-m and posterior to apex of R<sub>3</sub>; few macrotrichiae on membrane in apical portion of r<sub>3</sub>, m<sub>1</sub>; wing length 0.80–0.82 (0.81, n = 2) mm. CR 0.63 (0.63, n = 2). Halter pale. Legs yellow brown (Fig. 3C); coxae, trochanter, and basal portion of femora lighter; hind tibial spur shorter than width of hind tibia, hind tibial comb with 9 spines. TRI 3.07 (n = 1), TRII 3.15 (n = 1), and TRIII 2.57 (n = 1); empodia present.

Abdomen brown (Fig. 4A). Segments 1-6 with lateral dark marks. Terminalia dark brown, large (Figs. 4B, C); tergite 9 about 2.5 × as broad as long, not extending to apex of gonocoxite; sternite 9 stout, sub-trapezoidal, with proximal margin broadly concave, distal margin with a row of stout spines (Fig. 4C). Gonocoxite without medial lobe; length 1.80–2.00 (2.80, n = 2) × basal width. Gonostylus (Fig. 4D) with 1/3 proximal side stout; distal 2/3 spatulate; concave with a distinct middle notch, gently curved; apex quadratic, with a discrete concavity in the distal lateral tip; outer tip rounded; inner tip pointed. Aedeagal-parameral complex nearly quadrangular, 2 × as broad as long (Figs. 4E-G); with curved, sclerotized lateral arms; subapical portion with two lateral triangular teeth-like, and two lateral thin spiniform projections in the centre. Cercus triangular, not reaching the apex of tergite 9.

**Female.** Similar to male. Head (Fig. 5A); head width/mouthpart length 2.50–2.70 (2.6,  $n = 2$ ). Eyes broadly abutting medially for length of 2.80–3.00 (2.9,  $n = 2$ ) ommatidia (Fig. 5C). Antenna with flagellomeres 1–8 dark brown (Fig. 5B); 9–13 medium brown. AR 1.23–1.26 (1.24,  $n = 2$ ). Mandibles well developed; teeth not visible. Palpus medium brown (Fig. 5D); third segment short to moderately elongated (Fig. 5E), pit at mid-length; segments 4 and 5 separate. PR<sub>III</sub> 2.20–2.40 (2.3,  $n = 2$ ). Thorax dark brown (Fig. 6B). Wing (Fig. 6A) pattern of pigmented membrane as for male; macrotrichiae on membrane in apical portion of  $r_3$ ,  $m_1$ , and apical half of  $M_1$ . Wing length 0.85–0.90 (0.87,  $n = 2$ ) mm. CR 0.62 (0.62,  $n = 2$ ). Legs as shown in figure 6C. Abdomen brown (Fig. 6D); cercus light brown. Genitalia. One medium brown, small, ovoid, sclerotized spermatheca (Fig. 6E), measuring  $85 \times 70$  ( $n = 1$ )  $\mu\text{m}$ , without visible neck.

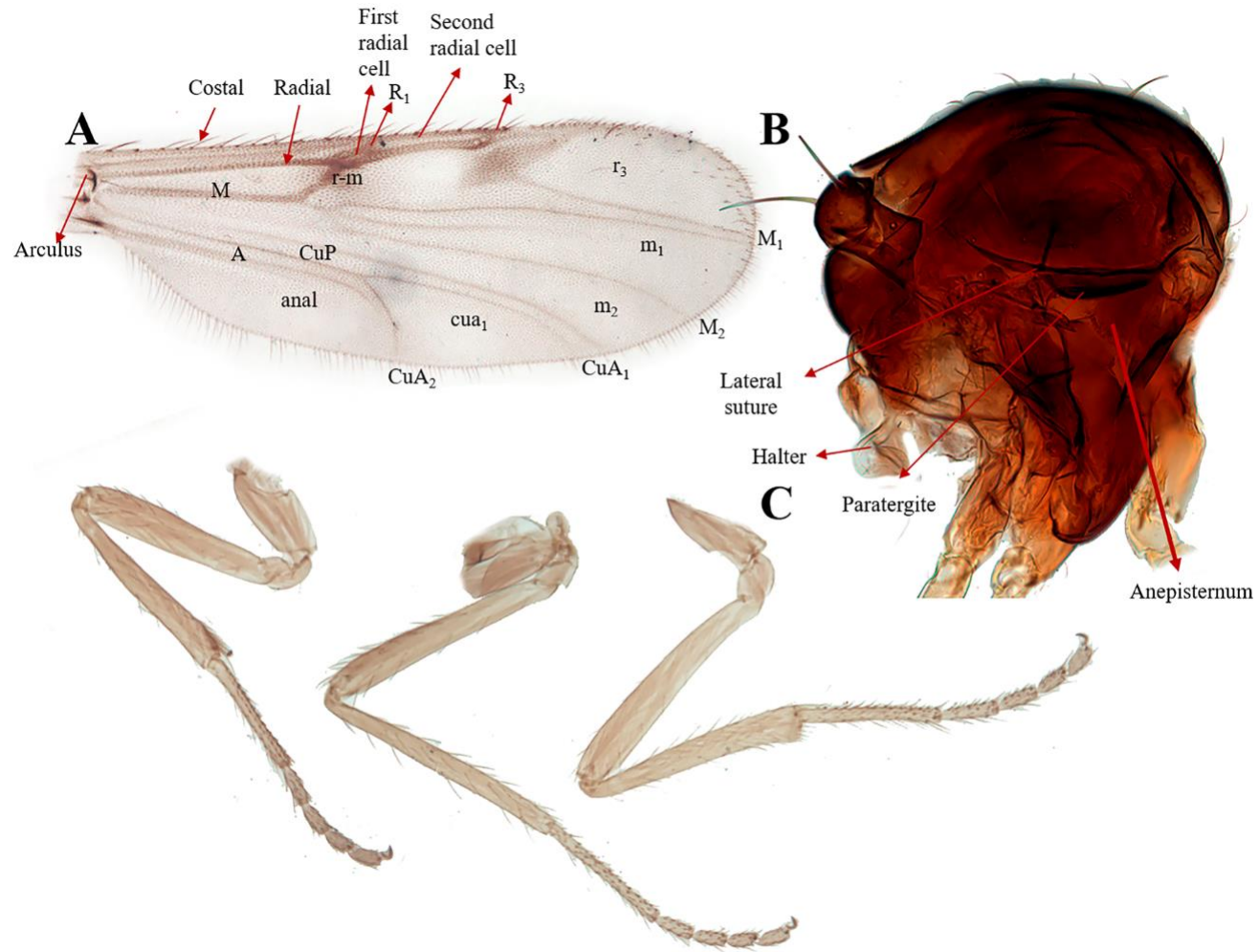
**Type material.** Holotype, adult male, slide-mounted, labelled as follows: BRAZIL, Amazonas, Presidente Figueiredo, Rio Pardo,  $1^\circ 49' 02.3''$  S  $60^\circ 19' 03.5''$  W, CDC light trap, Ramal Gusmão, canopy, forest, Pereira-Silva J. Col. VII. 2015 (INPA). Allotype, adult female, slide-mounted, same data as holotype (INPA). Paratypes: 1 male and 1 female, same data as holotype (ILMD).

**Etymology.** This species is named and described in honor of Jansen Fernandes de Medeiros, a close friend of the authors, medical entomologist, dedicated chairperson, and laboratory leader, who enthusiastically promotes entomological research on biodiversity in the Amazon basin and is largely responsible for the growth and development of another Amazonian FIOCRUZ Unit in Porto Velho, Rondônia.

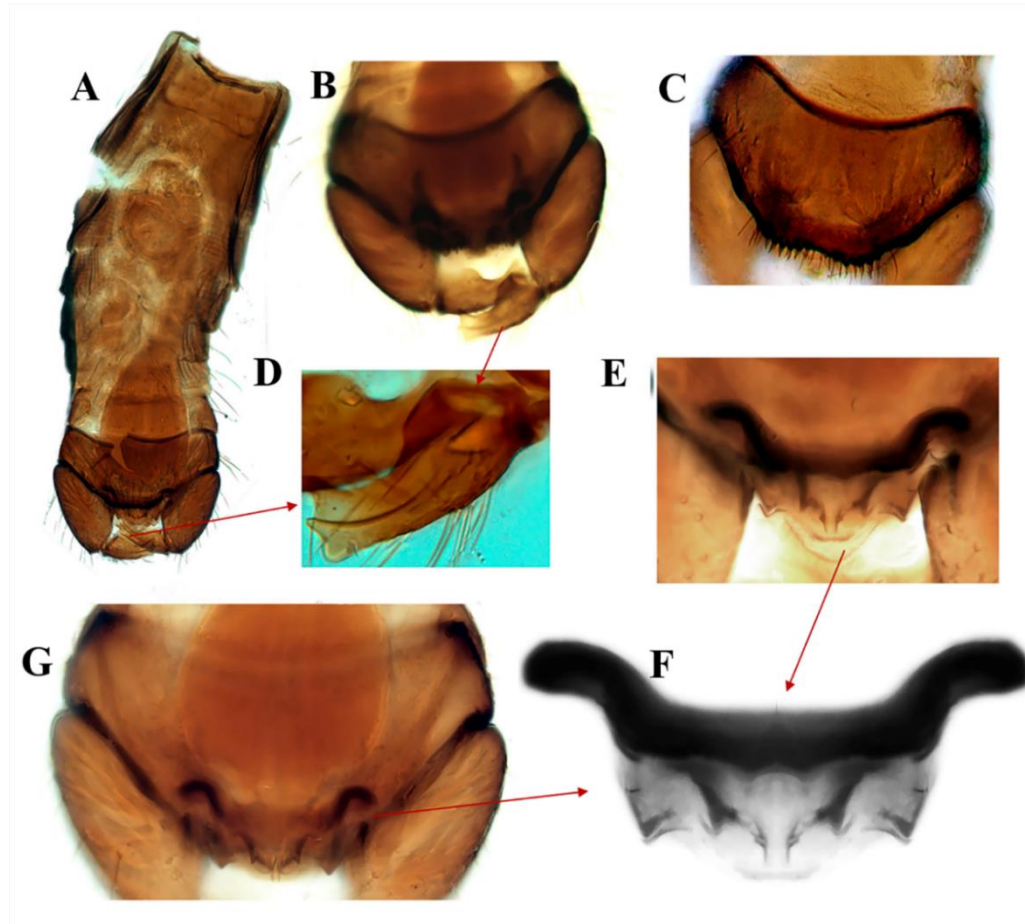


**Figure 2 (69).** *Atrichopogon janseni* sp. nov. Male. **A.** Head, anterior view; **B.** Antenna; **C.** Maxillary palpus; **D.** Eyes separation, anterior view; **E.** Third palpal segment.

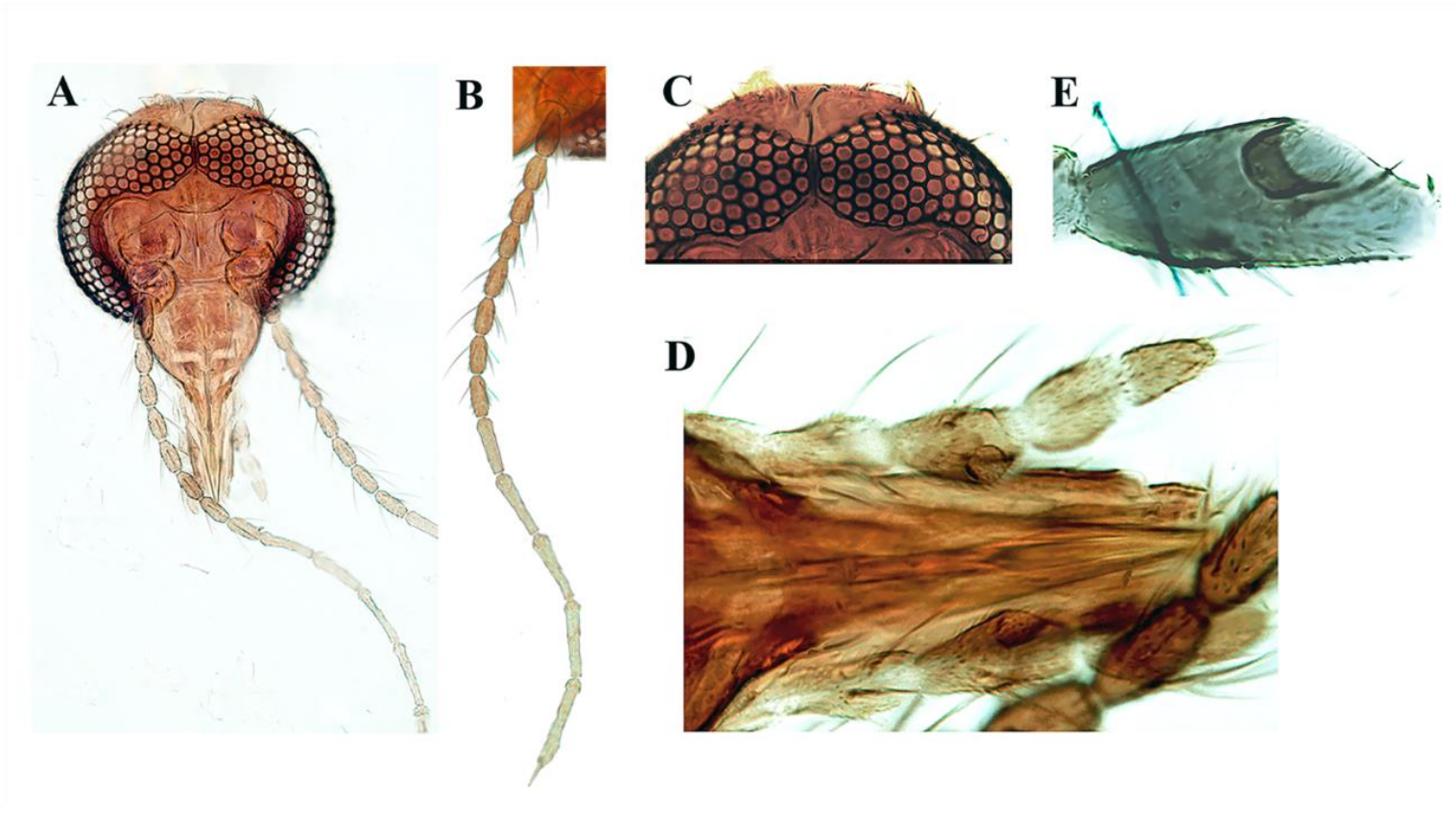




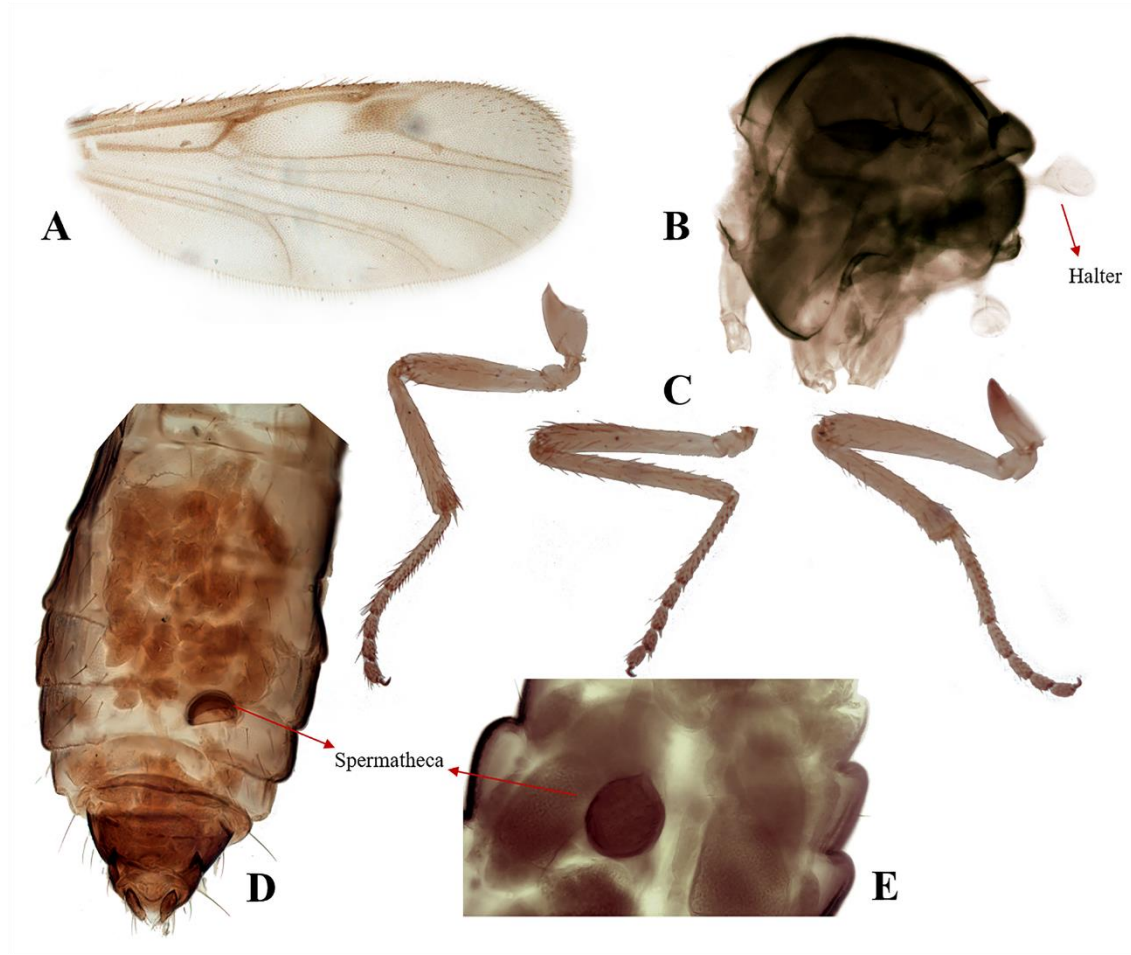
**Figure 3 (70).** *Atrichopogon janseni* sp. nov. Male. **A.** Wing with patch of pigmentation, showing venations and cells; **B.** Thorax, lateral view; **C.** Fore, mid- and hind legs (left to right), lateral view.



**Figure 4 (71).** *Atrichopogon janseni* sp. nov. Male. **A.** Abdomen, ventral view; **B-C.** Terminalia, ventral view; **D.** Gonostylus; **E-G.** Aedeagal-parameral complex, ventral view.



**Figure 5 (72).** *Atrichopogon janseni* sp. nov. Female. **A.** Head, anterior view; **B.** Antenna; **C.** Eyes separation, anterior view; **D.** Maxillary palpus **E.** Third palpal segment.



**Figure 6 (73).** *Atrichopogon janseni* sp. nov. Female. **A.** Wing; **B.** Thorax, lateral view; **C.** Fore, mid- and hind legs (left to right), lateral view; **D.** Abdomen, ventral view; **E.** Spermatheca.

*Atrichopogon riopardensis* Farias, Pessoa & Paulino-Rosa sp. nov.

(Figs. 7 A–E; 8 A–D; 9 A–F; 10 A–F; 11 A–E)

**Diagnosis.** Male. Only extant species of *Atrichopogon* with pigmented wings in the neotropical region with gonostylus forked near its midlength; inner portion short, like a fingernail, with longitudinal furrow; outer portion, apically curved directed mesally, 4 × longer than inner, with one long seta in basal 1/3. Female. Without good characteristic features: wing with two distinct darker spots; uniform color pattern of the antenna and legs; one short, ovoid, sclerotized spermatheca with short and broad neck.

**Male** (Fig. 7C). Head (Fig. 7A); head width/mouthpart length 2.60–3.00 (2.80, n = 7). Ommatidia with interfacet pubescence; broadly abutting medially for length of 3.9–4.4 (4.16, n = 5) ommatidia (Fig. 7D). Antenna pale brown; proportions of flagellomeres as in figure 7E; flagellomeres 2–10 fused; plume on flagellomeres 1–9 well developed; flagellomeres 10–13 without plume; 9th flagellomere 0.83 times shorter than flagellomere 10; flagellomere 13 with apical projection not basally constricted. AR 0.99–1.10 (1.00, n = 5). Palpus pale brown (Fig. 7B); third segment short to moderately elongate, swollen at mid-length, with well-developed pit somewhat apical to mid length; segments 4–5 separated; segment 5 conical. PRIII 2.30–2.70 (2.40, n = 7).

Thorax dark brown (Fig. 8B). Scutum with setae arising directly from surface, with lateral sutures (Fig. 8D). Paratergite with one seta. Anepisternum well-developed, broadly bilobed posteriorly. Wing with patch of pigmentation in area of r-m and posterior to apex of R<sub>3</sub> (Fig. 8A); macrotrichiae on membrane in apical portion of r<sub>3</sub>, m<sub>1</sub> and in apical half of M<sub>1</sub>; wing length 0.85–0.95 (0.90, n = 8) mm. CR 0.66–0.74 (0.68, n = 8). Halter stem pale brown, knob hyaline. Legs (Fig. 8C) yellowish brown; hind tibial spur shorter than width of hind tibia, hind

tibial comb with 9 spines. TRI 3.37 (n = 1), TRII 3.24 (n = 1), and TRIII 2.63 (n = 1); empodia present.

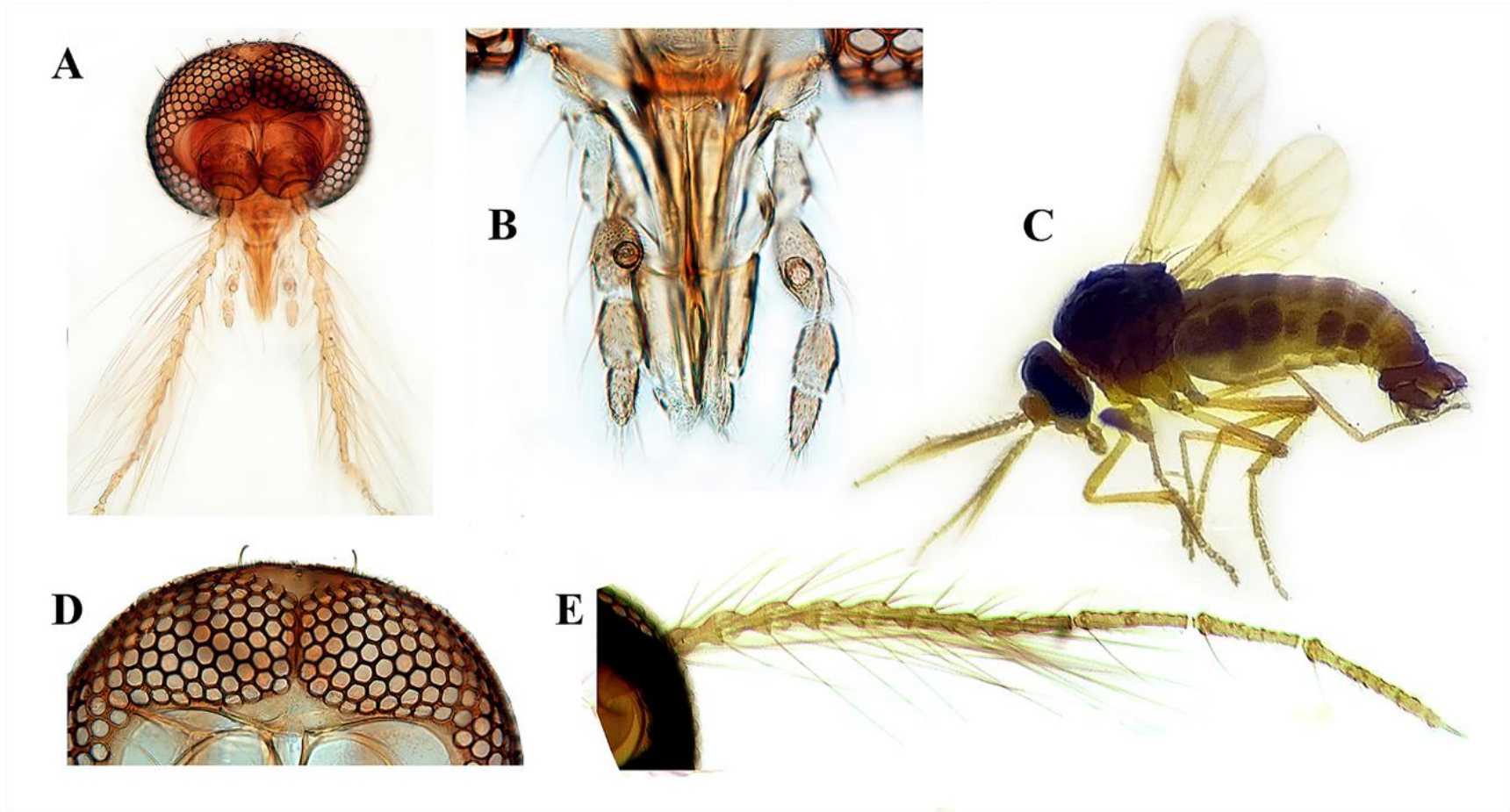
Abdomen (Fig. 9A). Segments 1–8 yellowish brown, with ventrolateral black marks well developed on segments 1–3, 5 and 6, smaller on segment 4; distal segments 9–10 dark brown. Terminalia brown (Figs. 9B, C); segment 9 equal in width to segment 8; tergite 9 moderately elongate, extending to about level of apex of gonocoxite; posterior margin rounded. Sternite 9 with posterior margin nearly straight and scattered row of setae. Gonocoxite without the medial lobe, with three large setae laterally in the proximal inner part (Fig. 9C); length 3.00–3.20 (3.10, n = 6) × the basal width. Gonostylus forked near midlength (Fig. 9F); inner portion short and fingernail-like, with longitudinal furrow; outer portion elongate and apically curved directed mesally, 4 × longer than inner portion, with one long seta in basal 1/3. Aedeagal-parameral complex quadrangular (Figs. 9D, E), with delicate lateral arms curved posteriorly; dorsal portion sclerotized on distal 1/3, bearing two anteroposteriorly directed projections, ending as process laterally directed; ventral portion with apical part pointed. Cercus short, slightly tapering, extending to the apex of tergite 9.

**Female** (Fig. 10C). Similar to male. Head (Fig. 10B); head width/mouth part length 2.80 (n = 1). Eyes broadly abutting medially for length 4.20 (n = 1) ommatidia (Fig. 10D). Antenna medium brown; flagellomeres 1–8 vasiform (Fig. 10A). AR 1.40 (n = 1). Mandible well developed, with 24 teeth (n = 1) (Fig. 10E). Palpus medium brown; third segment short (Fig. 10F), pit at mid-length; segments 4–5 separate. PRIII 2.25 (n = 1). Thorax dark brown (Fig. 11B). Wing (Fig. 11A) pattern of pigmented membrane as observed in males; macrotrichiae on membrane in apical portion of  $r_3$ ,  $m_1$ , and apical half of  $M_1$ ; wing length 0.90 (n = 1) mm. CR 0.77 (n = 1). Legs as shown in figure 11E. Abdomen yellowish brown (Fig. 11D), with ventrolateral black marks well developed on segments 1–3, 5 and 6, smaller on

segment 4; segments 8–10 pale brown; cercus pale brown. Genitalia. One dark brown ovoid spermatheca (Fig. 11C), measuring  $72.5 \times 70.0$  ( $n = 1$ )  $\mu\text{m}$ , with a short neck,  $7.5$  ( $n = 1$ )  $\mu\text{m}$ .

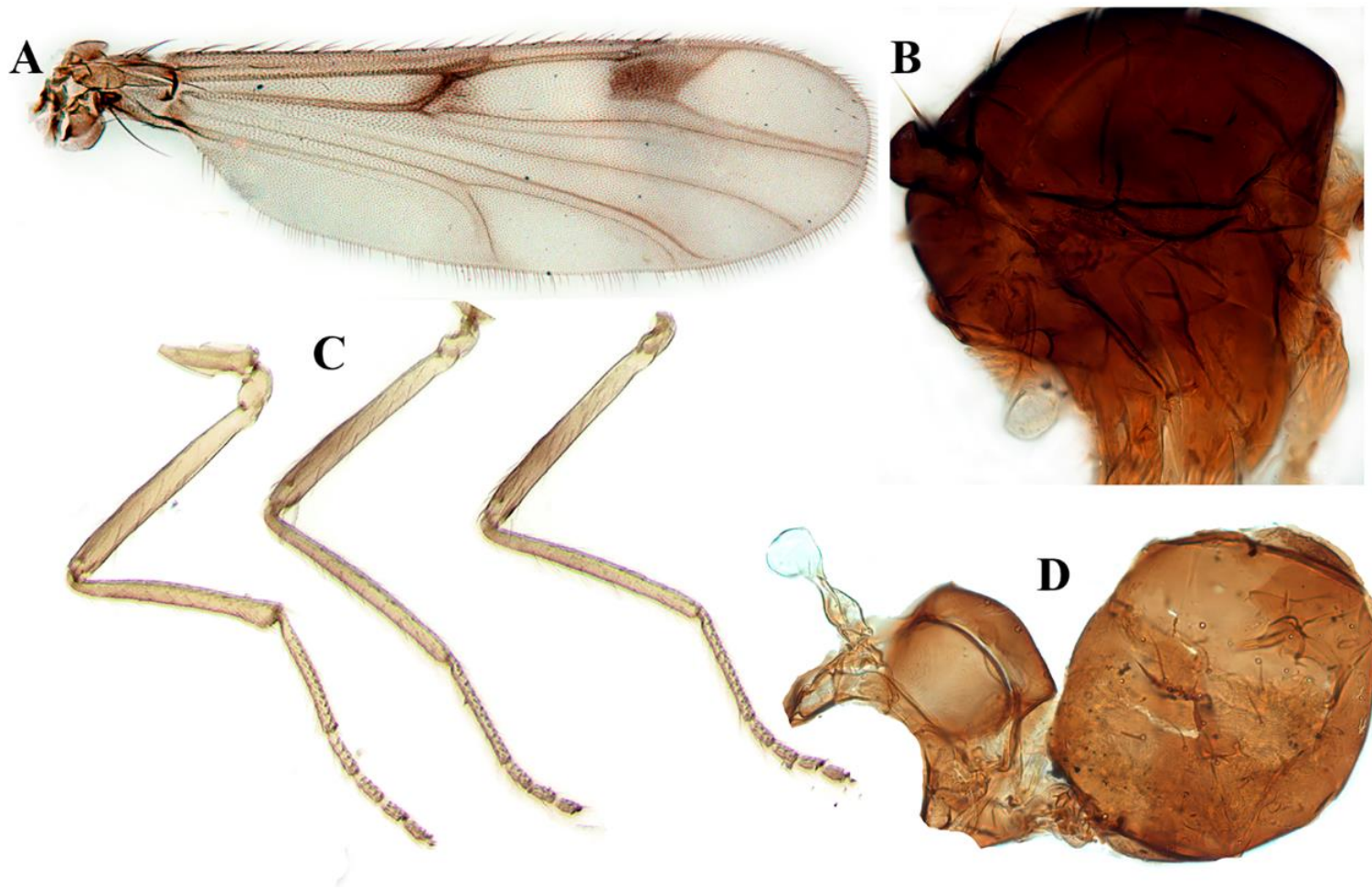
**Type material.** Holotype, adult male, slide-mounted, labelled as follows: BRAZIL, Amazonas, Presidente Figueiredo Municipality, Rio Pardo rural settlement,  $1^{\circ}49'02.3''$  S  $60^{\circ}19'03.5''$  W, CDC light trap, canopy forest, principal road, Pereira-Silva J. Col. VII. 2016 (ILMD). Allotype, adult female, slide-mounted, same data as holotype (ILMD). Paratypes: 3 males, same data as holotype, except Gusmão road, VIII. 2015 (ILMD); 2 males, same data as holotype, except for areas of transition between secondary capoeira and forest, F. Pessoa col. VII. 2010 (ILMD); 2 males, same data as holotype, except F. Pessoa col. VIII. 2010 (ILMD).

**Etymology.** This species is named in honor of the rural settlement of Rio Pardo, type locality, where Leônidas and Maria Deane Institute have a field base and have developed research activities since

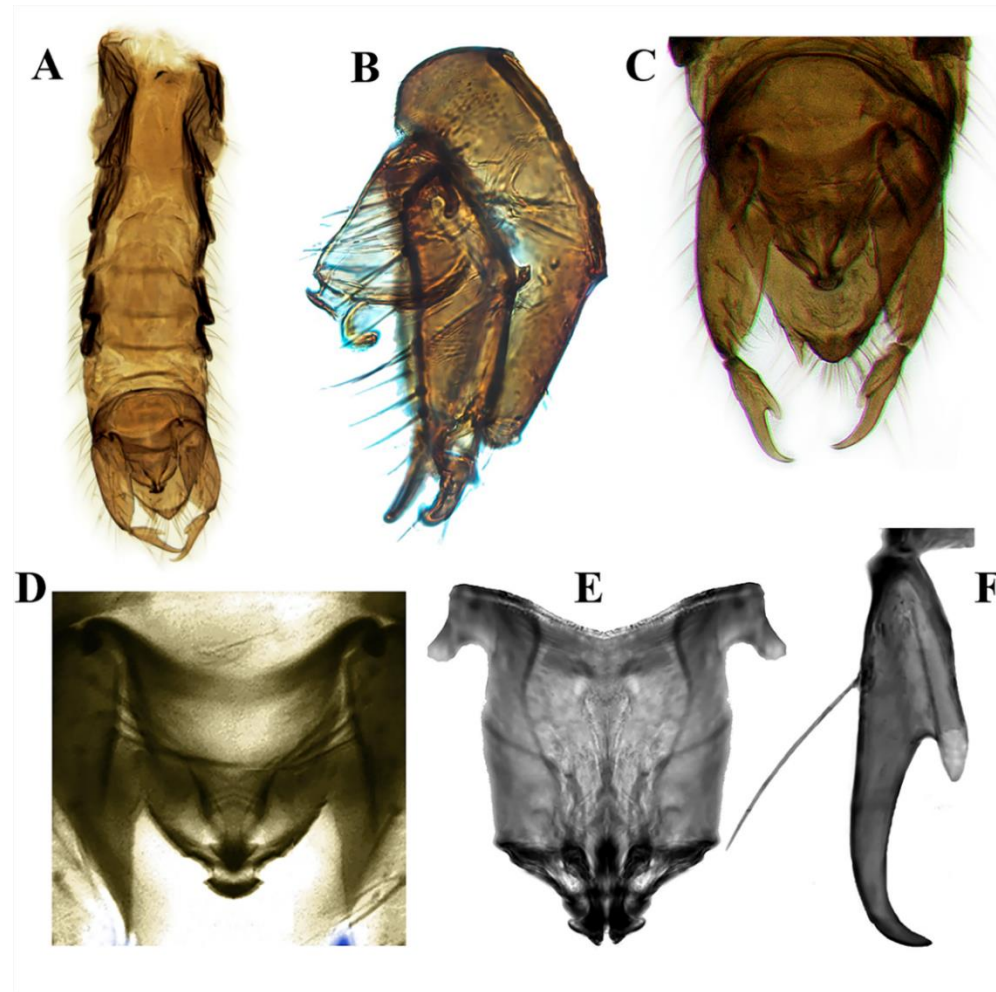


**FIGURE 7.** *Atrichopogon riopardensis* sp. nov. Male. A. Head, anterior view; B. Maxillary palpus; C. Adult, lateral view; D. Eyes separation, anterior view; E. Antenna.

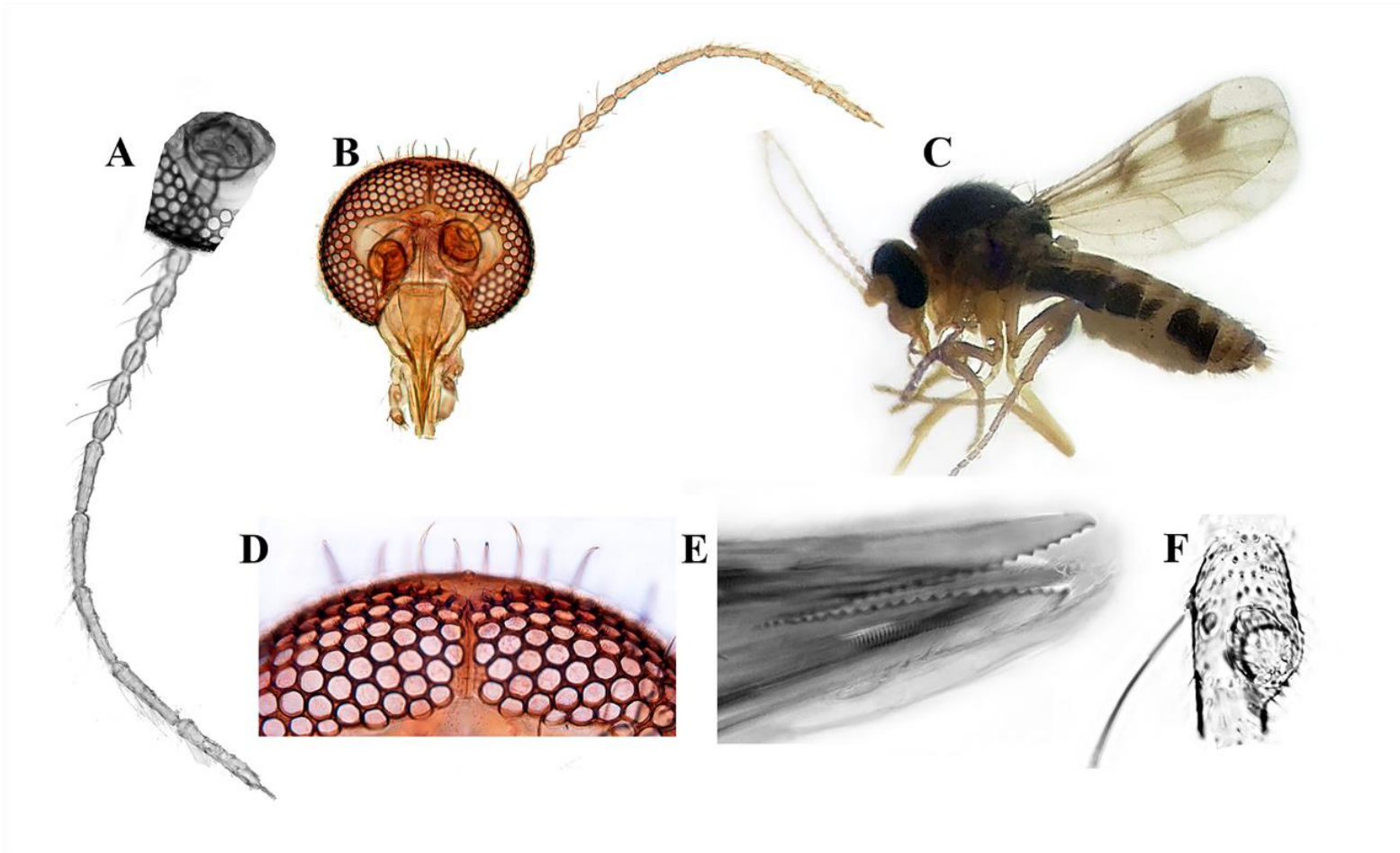




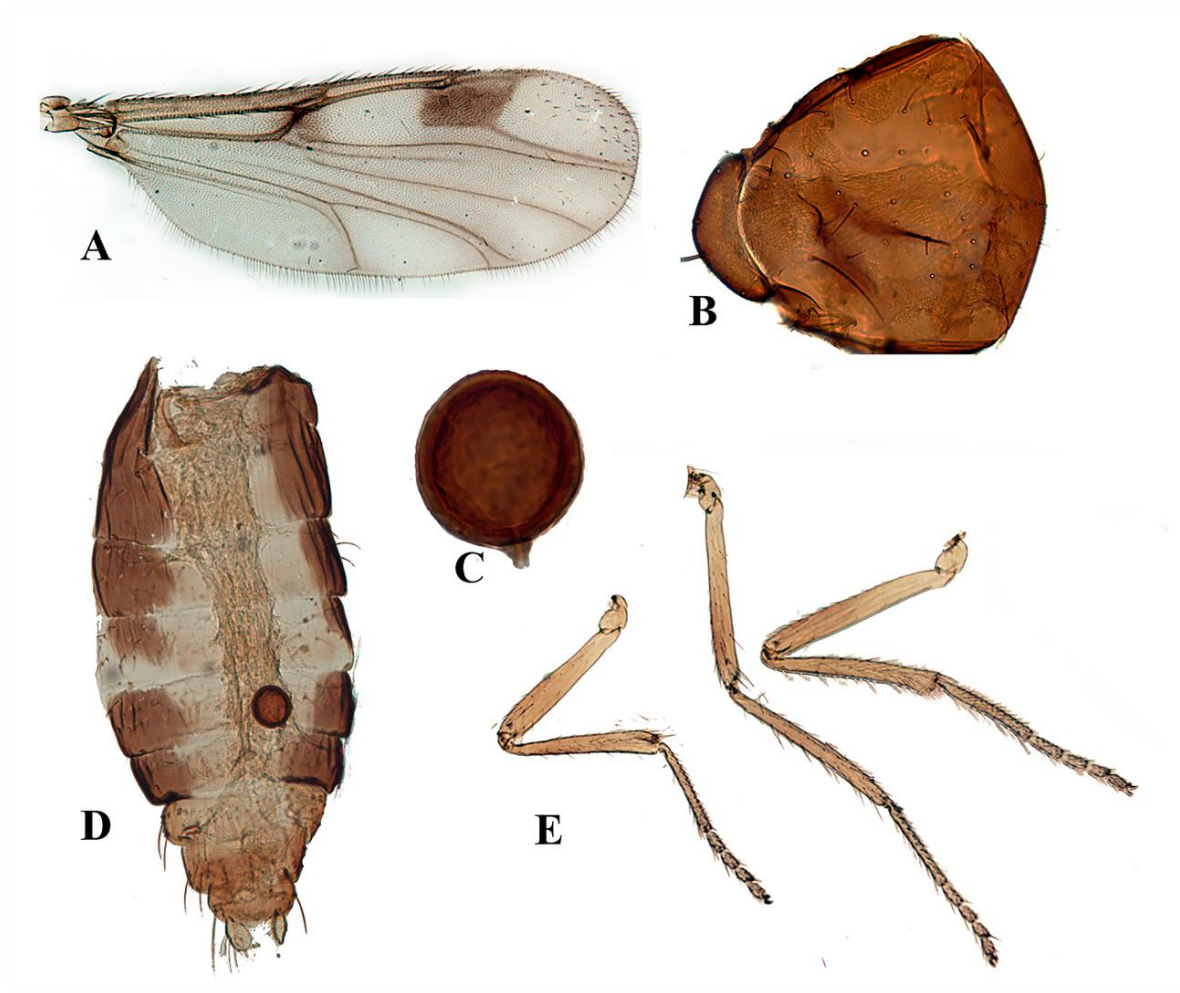
**Figure 8 (74).** *Atrichopogon riopardensis* sp. nov. Male. **A.** Wing; **B.** Thorax, lateral view; **C.** Fore, mid- and hind legs (right to left), lateral view; **D.** Scutum, scutellum and postscutellum, dorsal view.



**Figure 9 (75).** *Atrichopogon riopardensis* sp. nov. Male. **A.** Abdomen, ventral view; **B.** Terminalia, lateral view; **C.** Terminalia, ventral view; **D-E.** Aedeagal-parameral complex, ventral view; **F.** Gonostylus.



**Figure 10 (76).** *Atrichopogon riopardensis* sp. nov. Female. **A.** Antenna; **B.** Head, anterior view; **C.** Adult, lateral view; **D.** Eyes separation, anterior view; **E.** Mandibular teeth; **F.** Third palpal segment.



**Figure 11 (77).** *Atrichopogon riopardensis* sp. nov. Female. **A.** Wing; **B.** Scutum, scutellum dorsal view; **C.** Spermatheca; **D.** Abdomen, ventral view; **E.** Fore, mid- and hind legs (left to right), lateral view.

***Atrichopogon sergioluzi* Farias, Santos & Pessoa sp. nov.**

(Figs. 12 A–E; 13 A–D; 14 A–E; 15 A–E; 16 A–E)

**Diagnosis.** Male. Only extant species of *Atrichopogon* with pigmented wings in the Neotropical region with gonostylus thick, swollen in basal half, with apex bifid with sclerotized inner prong. Female. Without good characteristic features: wing with two distinct darker spots; one large, elliptic spermatheca.

**Male** (Fig. 12D). Head brown (Fig. 12A); head width/mouth part length 2.00–2.20 (2.10, n = 2). Ommatidia with interfacet pubescence; broadly abutting medially for length of 4.00–5.00 (4.50, n = 2) ommatidia (Fig. 12C). Antenna medium brown, proportions of flagellomeres as in figure 12B; flagellomeres 2–10 fused; plume on flagellomeres 1–9 well developed; 9th flagellomere 0.72 times shorter than flagellomere 10; flagellomeres 11–13 not fused, without plume setae; flagellomere 13 with apical projection not basally constricted. AR 1.10 (1.10, n = 2). Palpus (Fig. 12E) medium brown; third segment short to moderately elongated, swollen at mid-length, with well-developed, deep pit at midlength; segments 4 and 5 separate. PRIII 2.44–2.86 (2.65, n = 2).

Thorax dark brown (Figs. 13B, C). Scutum with setae arising directly from surface, with lateral suture. Paratergite with one seta. Anepisternum well-developed, broadly bilobed posteriorly. Wing with patch of pigmentation in area of r-m and posterior to apex of R<sub>3</sub> (Fig. 13A); few macrotrichiae on membrane in apical portion of r<sub>3</sub>; wing length 1.03–1.05 (1.04, n = 2) mm; CR 0.66–0.73 (0.71, n = 3). Halter pale. Legs (Fig. 13D) yellowish brown, coxae, trochanter, and basal portion of femora lighter; hind tibial spur shorter than width of hind tibia, hind tibial comb with 9–10 spines. TRI 3.33 (n = 1), TRII 3.28 (n = 1), and TRIII 2.48 (n = 1); empodia present.

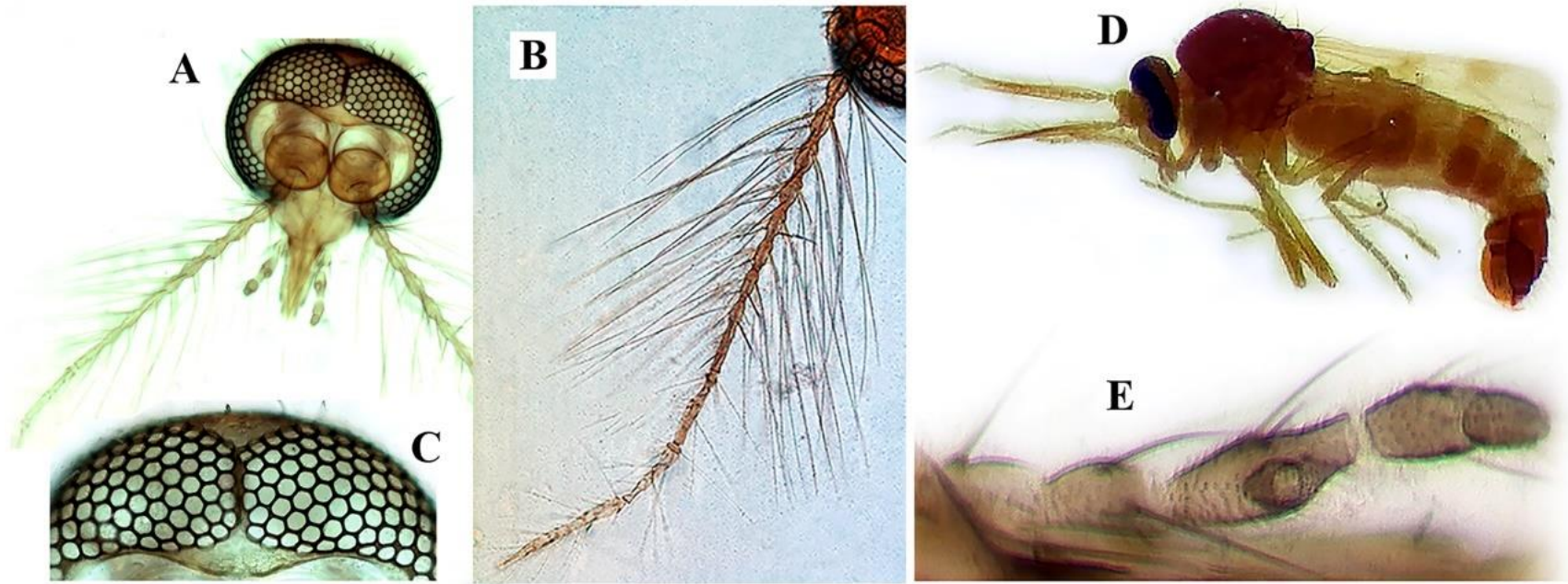
Abdomen brown (Fig. 14B). Ventrolateral dark marks well developed on segments 1–3 and 5–8, smaller on segment 4. Terminalia dark brown (Figs. 14C, D), except for lighter gonostylus and cercus; sternite 9 with posterior margin nearly straight; tergite 9 moderately elongate, extending to the level of apex of gonocoxite. Gonocoxite without the medial lobe, gonocoxal apodeme greatly evident, triangular; length 2.00–2.27 (2.10, n = 3) × the basal width. Gonostylus pale brown, except of yellowish brown apical 1/2 (Fig. 14E); swollen in basal half, with apex bifid with sclerotized inner claw. Aedeagal-parameral complex (Fig. 14B) nearly quadrangular, with short basal laterally directed arms, median portion trapezoidal, apical portion as a long pen feather connected with the median portion and gonocoxal apodeme of gonocoxite. Cercus yellowish brown, elongate, lobe-like, extending beyond the margin of tergite 9.

**Female** (Fig. 15B). Similar to male. Head (Fig. 15A); head width/mouthpart length 2.14–2.55 (2.33, n = 3). Eyes broadly abutting medially for length of 3.6–5.0. (4.26, n = 3) ommatidia (Fig. 15E). Antenna medium brown (Fig. 15C); flagellomeres 1–8 elongate, vasiform. AR 1.53–1.55 (n = 2). Mandibles with 23 teeth. Palpus (Fig. 15D) light brown; third segment short to moderately elongated, pit at mid-length; segments 4 and 5 separated. PRIII 2.11–2.44 (2.25, n = 3). Thorax dark brown (Fig. 16B). Wing pattern of pigmented membrane as for male (Fig. 16A); macrotrichiae on membrane in apical portion of  $r_3$ ,  $m_1$ , and apical half of  $M_1$ ; wing length 1.10–1.13 (1.11, n = 3) mm. CR 0.66–0.75 (0.69, n = 2). Legs as shown in figure 16C. Abdomen brown (Fig. 16E), with lateral black marks; with ventrolateral dark marks well developed on segments 1–3, 5 and 8, smaller on segment 4; segments 8–10 brown. Genitalia. One medium brown, large, elliptic spermatheca (Fig. 16D), measuring  $115 \times 65$  (n = 1)  $\mu\text{m}$ , with moderate neck 37.5 (n = 1)  $\mu\text{m}$ .

**Type material.** Holotype, adult male, slide-mounted, labelled as follows: BRAZIL, Amazonas, Presidente Figueiredo, Rio Pardo, 1°49'02.3" S 60°19'03.5" W, CDC light trap,

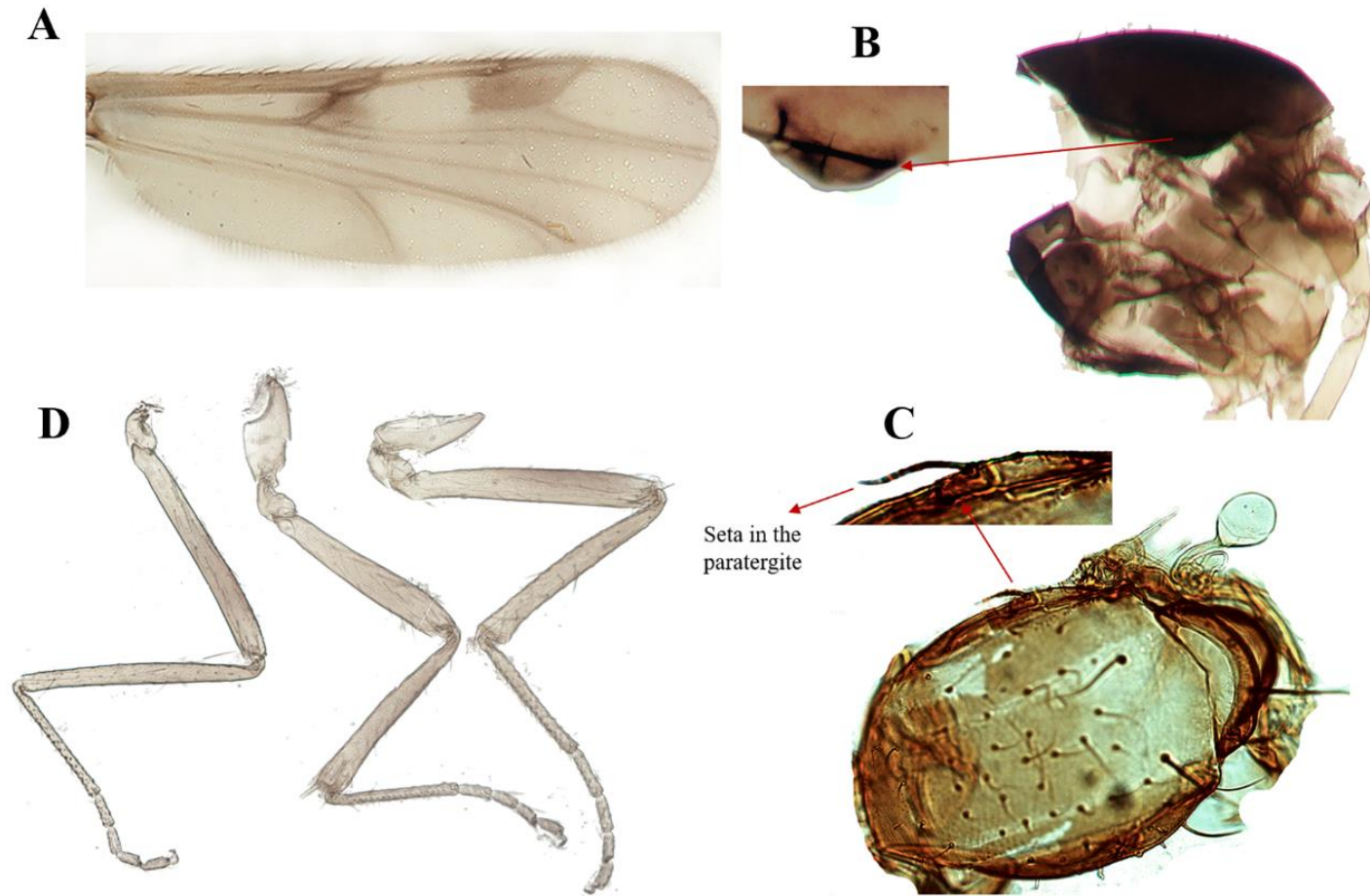
Ramal Gusmão, canopy, forest, Pereira-Silva J. Col. VII. 2015 (INPA). Allotype, adult female, slide-mounted, same data as holotype (INPA). Paratypes: 1 female, same data as holotype (ILMD); 1 male and 1 female, slide mounted, BRAZIL, Amazonas, Manaus, ZF-2 reserve (2°35'21" S 60°06'55" W), Km 14, Malaise trap, canopy, forest, Rafael J.A. Col. VIII. 2018 (ILMD).

**Etymology.** This species is named and described in honor of Sérgio Luiz Bessa Luz, close friend, medical entomologist, and a dedicated chairman, who is largely responsible for the growth and development of the Leônidas and Maria Deane Institute, FIOCRUZ in Manaus.

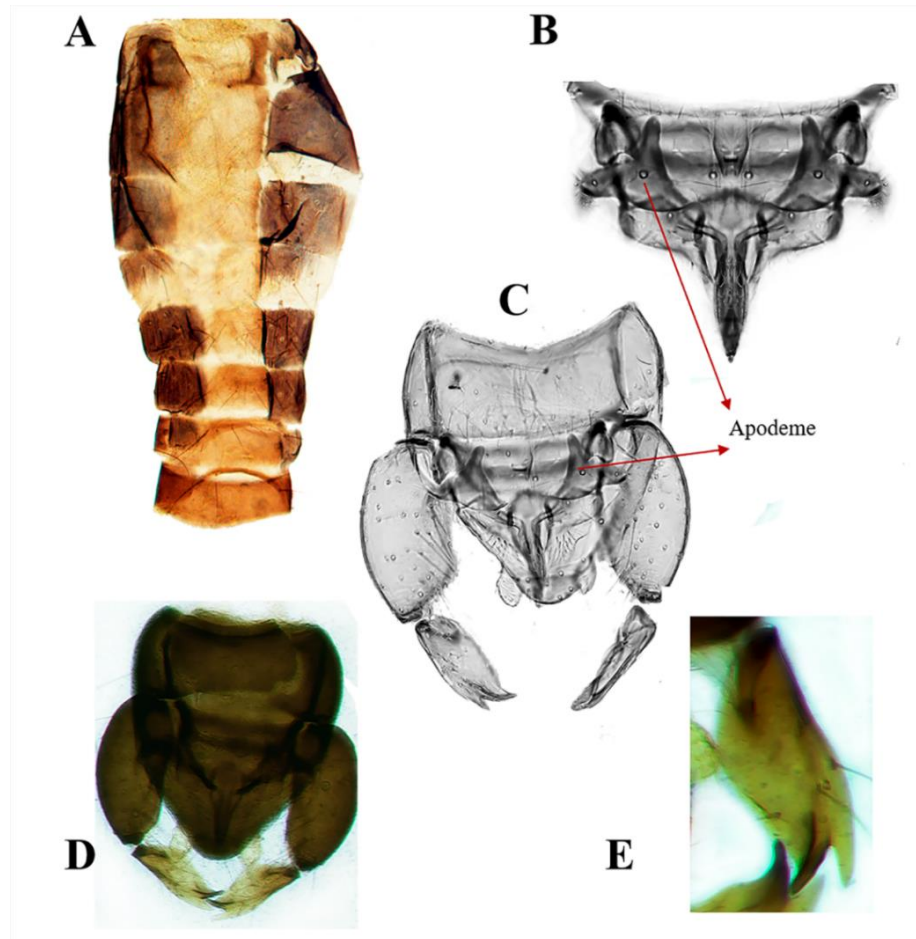


**Figure 12 (78).** *Atrichopogon sergioluzi* sp. nov. Male. **A.** Head, anterior view; **B.** Antenna; **C.** Eyes separation, anterior view; **D.** Adult, lateral view; **E.** Maxillary palpus.

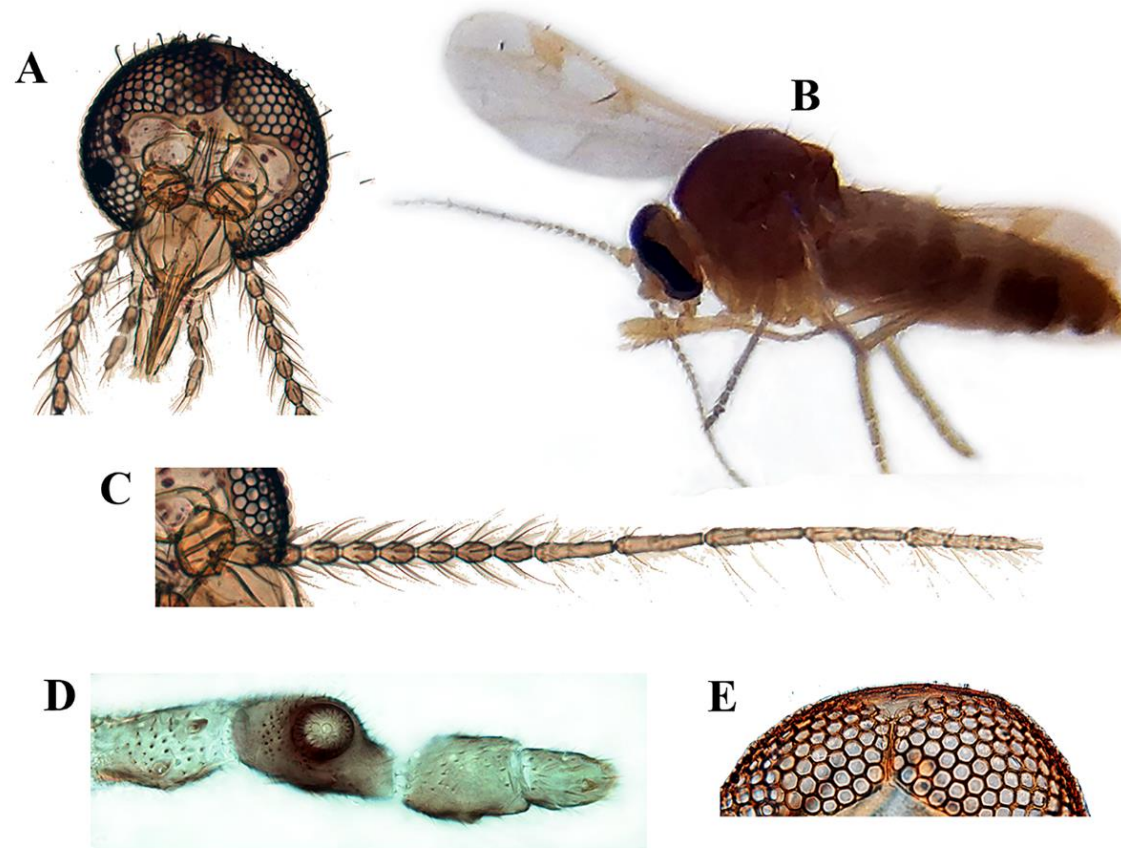




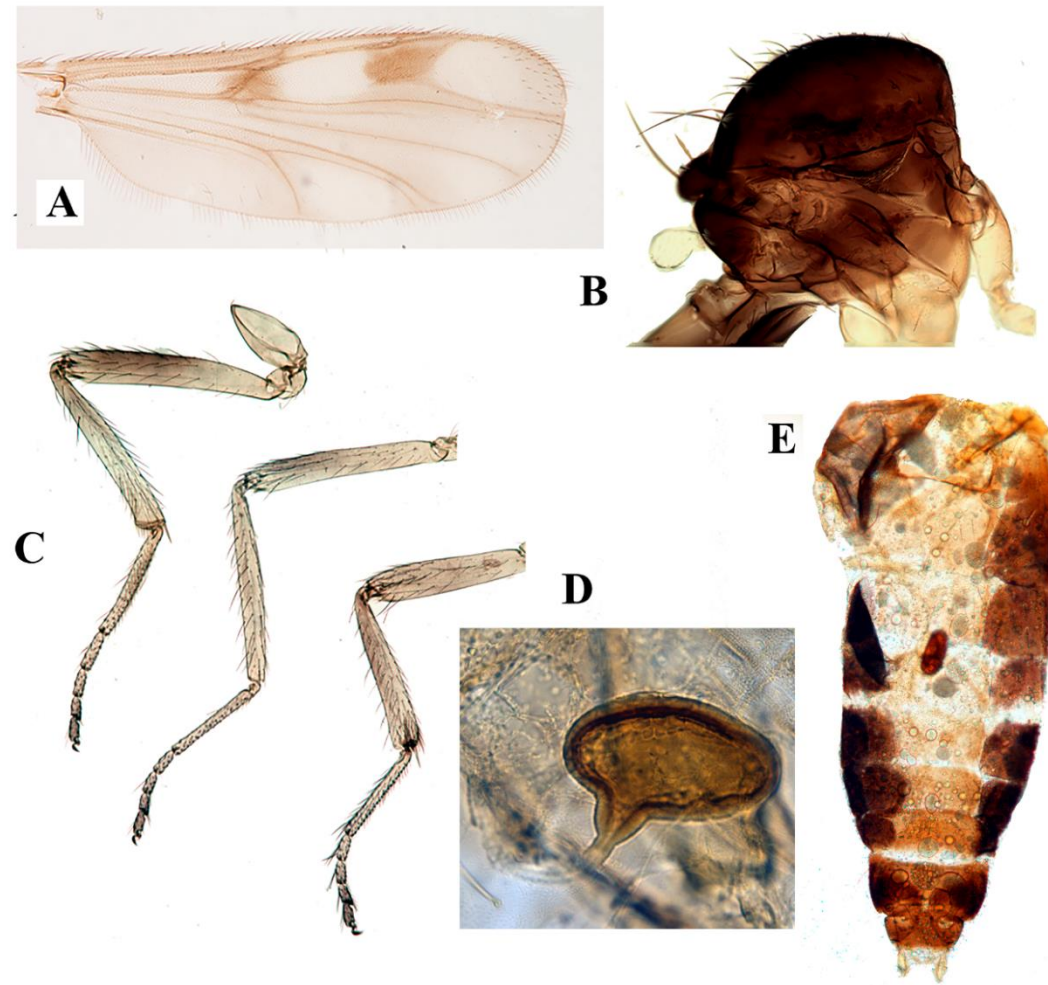
**Figure 13 (79).** *Atrichopogon sergioluzi* sp. nov. Male. **A.** Wing; **B.** Thorax, lateral view; **C.** Scutum, scutellum and postscutellum, dorsal view; **D.** Mid, fore and hind legs (left to right), lateral view.



**Figure 14 (80).** *Atrichopogon sergioluzi* sp. nov. Male. **A.** Abdomen, ventral view; **B.** Aedeagal-parameral complex, ventral view; **C-D.** Terminalia, ventral view; **E.** Gonostylus.



**Figura 15 (81).** *Atrichopogon sergioluzi* sp. nov. Female. **A.** Head, anterior view; **B.** Adult, lateral view; **C.** Antenna; **D.** Maxillary palpus; **E.** Eyes separation, anterior view.



**Figure 16 (82).** *Atrichopogon sergioluzi* sp. nov. Female. **A.** Wing; **B.** Thorax posterolateral view; **C.** Hind, mid- and fore legs (left to right), lateral view; **D.** Spermatheca; **E.** Abdomen, ventral view.

### **Taxonomic remarks**

The *Atrichopogon* species with pigmented wings can present dark spots on the distal third of the wing with or without pale spots, as observed in *A. cavus* Felipe-Bauer, 2012 and in *A. maculipennis* Clastrier, 1968, or two distinct dark spots, one over r-m and the second in cell  $r_3$  posterior to the apex of  $R_3$ . This last type of wing pigmentation is observed in other species of *Atrichopogon* with pigmented wings, including the three species described in this manuscript.

Males of the new species are separated from other species with a similar wing pattern, mainly by the following characteristics. *A. janseni* sp. nov. is similar to *A. ornatipennis* Clastrier, 1987, having single, not forked gonostylus. It can be distinguished from this species by sternite 9 which is stout, subtrapezoidal, with proximal margin broadly concave, distal margin with a row of stout spines (posterior margin of sternite 9 with a middle row of setae in *A. ornatipennis*). Moreover, gonostylus of *A. janseni* has distal 2/3 spatulate, is concave with a distinct middle transversal notch, and has quadratic apex (gonostylus thick with blunt apex in *A. ornatipennis*).

*Atrichopogon riopardensis* sp. nov. is similar to *A. nukini* Felipe-Bauer, 2018, *A. shawadaua* Felipe-Bauer, 2018, and *A. lobatus* Borkent & Picado, 2004 having a forked gonostylus. It can be distinguished from these species by gonostylus forked near its midlength (gonostylus is forked near its base in *A. shawadaua*), by inner portion of gonostylus 4 × smaller than outer, fingernail-like (inner portion greater than outer, not fingernail-like in *A. nukini*; inner portion 2 × smaller than outer, not as a fingernail in *A. shawadaua*; inner portion 4 × smaller than outer, not as a fingernail in *A. lobatus*). *Atrichopogon riopardensis* sp. nov. is similar to *A. nukini*, *A. shawadaua* having wing with two distinct dark spots, one over r-m and second in cell  $r_3$  posterior to apex of  $R_3$ , while wing of *A. lobatus* is plain, without patterns.

*Atrichopogon sergioluzi* sp. nov. is similar to *A. maculipennis*, with a thick gonostylus with two pointed apical prongs (it is U-shaped in *A. maculipennis*, V-shaped in *A. sergioluzi*). The two species differ in shape of cercus (broad basally with rounded tip in *A. sergioluzi*, cercus not conspicuous in *A. maculipennis*) and in wing patterns. *Atrichopogon sergioluzi* sp. nov. has wings with two distinct dark spots, one over r-m and second in cell  $r_3$  posterior to apex of  $R_3$ , while the entire distal 1/3 of wing of *A. maculipennis* is dark.

Although some differences are observed among females of *Atrichopogon* species with pigmented wings in the Neotropical region, it is strongly recommended to associate them with males collected in the same samples (Felippe-Bauer 2018). The females of *A. janseni* sp. nov. and *A. clastrieri* Spinelli & Marino, 2007 are the only ones with pigmented wings in the Neotropical region that have contrasting coloration of the antenna with flagellomeres 1–8 darker than flagellomeres 9–13. The female of *A. sergioluzi* sp. nov. has a large, elongated, elliptic spermatheca that has a moderate long neck, and is distinguishable from the others as described and measured. Including the three newly described species in the present study, there are now 15 Neotropical species of *Atrichopogon* with pigmented wings.

**Acknowledgments.** We are grateful to Dr Rafael that kindly gave us some specimens from Ducke reserve; to the reviewers and to P. Dominiak (UiT, Norway) for critical review of this paper; to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the productivity fellowship to FACP; and to the Excellence Program in Basic and Applied Health Research (PROEP FIOCRUZ FAPEAM001/2014; PROEP FIOCRUZ CNPq 400896/2018-4).

## References

Araújo, A.C., Nobre, A.D., Kruijt, B., Elbers, J.A., Dallarosa, R., Stefani, P., Randow, C., Manzi, A.O., Culf, A.D., Gash, J.H.C., Valentini, R. & Kabat, P. (2002) Comparative measurements of carbon dioxide fluxes from two nearby towers in a central

- Amazonian rainforest: The Manaus LBA site. *Journal of Geophysical Research*, 107, 1–20. <https://doi.org/10.1029/2001JD000676>.
- Boesel, M.W. (1973) The genus *Atrichopogon* (Diptera: Ceratopogonidae) in Ohio and Neighboring states. *Ohio Journal of Sciences*, 73, 202–205.
- Borkent, A. & Dominiak, P. (2020) Catalog of the Biting Midges of the World (Diptera: Ceratopogonidae). *Zootaxa*, 4787, 1–377. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4787.1.1>.
- Borkent, A. & Picado, A. (2004) Distinctive new species of *Atrichopogon* Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae). *Zootaxa*, 637, 1–68. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.637.1.1>.
- Borkent, A. & Rocha-Filho, L.C. (2006) First record of female adult *Atrichopogon* Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae) biting in the Neotropical region. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 108, 998–1001.
- Borkent, A. & Spinelli, G.R. (2007) *Neotropical Ceratopogonidae (Diptera: Insecta)*. In: Adis, J. Arias, J.R. Rueda-Delgado, G. & Wantzen K. M. (eds). Aquatic biodiversity in Latin America (ABLA). 4. 1–198.
- Cavaliere, F. & Chiossone, I.F. (1973) Notas sobre el género *Atrichopogon* Kieffer, 1906, de la Argentina (Diptera: Ceratopogonidae). II. Descripción de *Atrichopogon casali* sp. nov. *Physis*, 32, 151–159.
- Clastrier, J. (1968) Deux Ceratopogonides nouveaux de la Guyane Francaise. *Archives de l'Institut Pasteur de la Guyane Francaise e de l'Inini*, 21, 85–92.
- Clastrier, J. (1979) Un nouvel *Atrichopogon* de la Guyane Francaise (Diptera: Ceratopogonidae). *Revue Française d'Entomologie*, 1, 30–32.
- Clastrier, J. (1987) *Atrichopogon ornatipennis*, n.sp., de la Guyane Francaise (Diptera: Ceratopogonidae). *Entomologiste*, 43, 271–274.
- Debenham, M.L. (1973) Four New Guinea and northern Queensland species of *Atrichopogon* Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae) with atypical development of the thoracic setae. *Journal of the Australian Entomological Society*, 12, 68–77.
- De Meillon, R. & Wirth, W.W. (1989) A new pollen feeding *Atrichopogon* midge from Madagascar, with notes on closely related subsaharan species (Diptera: Ceratopogonidae). *Revue Française d'Entomologie*, 11, 85–89.

- Edwards, F.W. (1926) On the British biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). *Transactions of the Entomological Society of London*, 74, 389–426.
- Ewen, A.B. & Saunders, L.G. (1958) Contributions towards a revision of the genus *Atrichopogon* based on characters of all stages (Diptera: Heleidae). *Canadian Journal of Zoology*, 36, 671–724.
- Felippe-Bauer, M.L. (2018) Two new species of *Atrichopogon* Kieffer from Acre State, Brazil (Diptera: Ceratopogonidae). *Zootaxa*, 4532, 257–265. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4532.2.5>.
- Felippe-Bauer, M.L., Silva, T.N. & Alves, J.R.C. (2012) Two new species of *Atrichopogon* Kieffer from Rio de Janeiro, Brazil (Diptera: Ceratopogonidae). *Zootaxa*, 3566, 39–50.
- Laurance, W.F., Camargo, J.L.C., Luizão, R.C.C., Laurance, S.G., Pimm, S.L., Bruna, E.M., Stouffer, P.C., Bruce Williamson, G., Benítez-Malvido, J., Vasconcelos, H.L., Van Houtan, K.S., Zartman, C.E., Boyle, S.A., Didham, R.K., Andrade, A. & Lovejoy, T.E. (2011) The fate of Amazonian forest fragments: A 32-year investigation. *Biological Conservation*, 144, 56–67. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2010.09.021>.
- Macfie, J.W.S. (1939) A report on a collection of Brazilian Ceratopogonidae (Diptera). *Revista de Entomologia*, 89, 137–219.
- Macfie, J.W.S. (1949) Notes on Ceratopogonidae. I. New species of *Forcipomyia* and *Atrichopogon* from the State of Chiapas, Mexico. *Proceedings of the Royal Entomological Society of London*, 18, 109–115.
- Marino, P.I., Spinelli, G.R., Ferreira-Kepler, R. & Ronderos, M.M. (2017) Description of fourth instar larva and pupa of *Atrichopogon delpontei* Cavalieri & Chiossone (Diptera: Ceratopogonidae) from Brazilian Amazonia. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 89, 2081–2094. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720150223>.
- Marques-Filho, A.O., Ribeiro, M.N.G., Santos, H.M. & Santos, J.M. (1981) Estudos climatológicos da Reserva Florestal Ducke – Manaus – AM. IV. Precipitação. *Acta Amazonica*, 11, 759–768.
- Picelli, A.M., Ramires, A.C., Masseli, G.S., Pessoa, F.A.C., Viana, L.A. & Kaefer, I.L. (2020) Under the light: high prevalence of haemoparasites in lizards (Reptilia: Squamata)



- from Central Amazonia revealed by microscopy. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 92, 01–19. <http://doi.org/10.1590/0001-3765202020200428>.
- Spinelli, G.R. & Marino, P.I. (2007) A new Neotropical species of *Atrichopogon* Kieffer, and a redescription of *A. casali* Cavalieri & Chiossone (Diptera: Ceratopogonidae). *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 42, 203–209. <https://doi.org/10.1080/01650520601136912>.
- Szadziewski, R., Gilka, W. & Anthon, H. (1995) Immature stages of two European species of the subgenus *Meloehalea* (Diptera: Ceratopogonidae), with keys to the European subgenera of *Atrichopogon*. *Entomologica Scandinavica*, 26, 181–190.
- Szadziewski, R. (2001) European *Atrichopogon* of the subgenus *Psilokempia* (Diptera: Ceratopogonidae). *Polish Journal of Entomology*, 70, 359–374.
- Zayed Al Nahyan, H.H. (Patron) & van A. Harten (ed.), Arthropod fauna of the United Arab Emirates. I. 4. Dar Al.Ummah Printing, Publishing, Distribution & Advertising, Abu Dhabi, UAE, pp. 636–653.
- Szadziewski, R., Gwizdalska-Kentzer, M. & Gilka, W. (2011) Order Diptera, family Ceratopogonidae. In: Sheikh Tahnoon Bin Zayed Al Nahyan, and H. H. (patron) & van Harten, A. (Eds.). Dar Al., Arthropod fauna of the United Arab Emirates. I. 4. Ummah Printing, Publishing, Distribution & Advertising, Abu Dhabi, UAE, pp. 636–653.
- Szadziewski, R., Gwizdalska-Kentzer, M. & Gilka, W. (2011) Order Diptera, family Ceratopogonidae. *Arthropod fauna of the UAE*, 4, 636–653.
- Ramos, W.R., Medeiros, J.F., Julião, G.R., Ríos-Velásquez, C.M., Marialva, E.F., Desmoulière, S.J.M., Luz, S.L. & Pessoa, F.A. (2014) Anthropogenic effects on sand fly (Diptera: Psychodidae) abundance and diversity in an Amazonian rural settlement, Brazil. *Acta Tropica*, 139, 44–52. <http://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.06.017>.
- Wirth, W.W. & Marston, N. (1968) A method for mounting small insects on microscope slides in Canada Balsam. *Annals of the Entomological Society of America*, 61, 783–784. <https://doi.org/10.1093/aesa/61.3.783>.

## ATIVIDADES ACADÊMICAS DURANTE O DOUTORADO

**Lista de trabalhos publicados, resumos em congresso, ou outras atividades.**

### Artigos como primeiro autor

\*Farias et al. 2016 List of *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) from the state of Amazonas, Brazil, including new records. 2002. Check List. 12(6):24. November 2016 doi:

<http://dx.doi.org/10.15560/12.6.2002>



## List of *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) from the state of Amazonas, Brazil, including new records

**Emanuelle de Sousa Farias<sup>1,2</sup>, Jessica Feijó Almeida<sup>1,3</sup> and Felipe Arley Costa Pessoa<sup>1\*</sup>**

1 Instituto Leônidas e Maria Deane, Fiocruz Amazônia, Laboratório de Ecologia de Doenças Transmissíveis na Amazônia, Rua Terezina, Nº 476, Adrianópolis, CEP 69.057-070, Manaus, AM, Brazil

2 Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Saúde, Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ)

3 Programa de Pós-graduação em Condições de Vida e Situações de Saúde na Amazônia, Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD/FIOCRUZ)

\* Corresponding author. E-mail: [felipe.pessoa@fiocruz.br](mailto:felipe.pessoa@fiocruz.br)

\*Farias et al. 2016. *Culicoides hildebrandoi*, a new species of the reticulatus species group from the Brazilian Amazon Region (Diptera, Ceratopogonidae). ZooKeys 2016. 571:105–111 doi: 10.3897/zookeys.571.7341

ZooKeys 571: 105–111 (2016)  
doi: 10.3897/zookeys.571.7341  
<http://zookeys.pensoft.net>

RESEARCH ARTICLE


A peer-reviewed open-access journal  
**ZooKeys**  
Launched to accelerate biodiversity research

## ***Culicoides hildebrandoi*, a new species of the reticulatus species group from the Brazilian Amazon Region (Diptera, Ceratopogonidae)**

Emanuelle de Sousa Farias<sup>1</sup>, Antonio Marques Pereira Júnior<sup>2,3</sup>,  
Maria Luiza Felipe-Bauer<sup>4</sup>, Felipe Arley Costa Pessoa<sup>1</sup>,  
Jansen Fernandes Medeiros<sup>3</sup>, Maria Clara Alves Santarém<sup>4</sup>

\*Farias et al. 2021. Description of three new species of biting midge of the genus *Atrichopogon* Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae) from Brazilian Amazon. Zootaxa. 2021. 4952 (2): 275–290.

[doi.org](https://doi.org)

 Zootaxa 4952 (2): 275–290  
<https://www.mapress.com/j/zt/>  
Copyright © 2021 Magnolia Press

Article

ISSN 1175-5326 (print edition)  
**ZOOTAXA**  
ISSN 1175-5334 (online edition)

<https://doi.org/10.11646/zootaxa.4952.2.4>  
<http://zoobank.org/urn:lsid:zoobank.org:pub:642A07AB-5A2F-4514-9DF2-70E5ACECC140>

### **Description of three new species of biting midge of the genus *Atrichopogon* Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae) from Brazilian Amazon**

EMANUELLE DE SOUSA FARIAS<sup>1,2,5</sup>, SANMYA SILVA DOS SANTOS<sup>1,3,6</sup>, JOKEBEDE MELYNDA DOS SANTOS PAULINO-ROSA<sup>1,4,7</sup> & FELIPE ARLEY COSTA PESSOA<sup>1,8,\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ. Laboratório de Ecologia e Doenças Transmissíveis na Amazônia, Manaus, Amazonas, Brazil.

<sup>2</sup>Instituto Oswaldo Cruz-IOC/FIOCRUZ. Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>3</sup>Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ. Programa de Bolsa de Iniciação Científica – PIBIC/CNPq.

<sup>4</sup>Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Interação Patógeno Hospedeiro, Manaus, Amazonas, Brazil.

<sup>5</sup>✉ [emanuellefarias82@gmail.com](mailto:emanuellefarias82@gmail.com); <https://orcid.org/0000-0001-5949-877X>

<sup>6</sup>✉ [sanmyasantos23@gmail.com](mailto:sanmyasantos23@gmail.com); <https://orcid.org/0000-0001-7377-8735>

<sup>7</sup>✉ [jokebedemelynda@gmail.com](mailto:jokebedemelynda@gmail.com); <https://orcid.org/0000-0003-2359-4836>

<sup>8</sup>✉ [facpessoa@gmail.com](mailto:facpessoa@gmail.com); <https://orcid.org/0000-0002-6318-1887>

## Artigos em coautorias (2016-2021)

\***Carvalho et al. 2016.** A study of *Culicoides* in Rondônia, in the Brazilian Amazon: species composition, relative abundance and potential vectors. *Medical and Veterinary Entomology*. 2016. doi: 10.1111/mve.12208

*Medical and Veterinary Entomology* (2016), doi: 10.1111/mve.12208

### SHORT COMMUNICATION

## **A study of *Culicoides* in Rondônia, in the Brazilian Amazon: species composition, relative abundance and potential vectors**

L. P. C. CARVALHO<sup>1,2</sup>, A. M. PEREIRA JÚNIOR<sup>3,4</sup>, E. S. FARIAS<sup>2</sup>,  
J. F. ALMEIDA<sup>5</sup>, M. S. RODRIGUES<sup>6</sup>, F. RESADORE<sup>3,4</sup>,  
F. A. C. PESSOA<sup>2</sup> and J. F. MEDEIROS<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, Brazil, <sup>2</sup>Laboratório de Ecologia de Doenças Transmissíveis da Amazônia, Instituto Leônidas e Maria Deane, Fiocruz Amazônia, Manaus, Amazonas, Brazil, <sup>3</sup>Laboratório de Entomologia, Fiocruz Rondônia, Porto Velho, Rondônia, Brazil, <sup>4</sup>Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental, Fundação Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, Rondônia, Brazil, <sup>5</sup>Programa de Pós-Graduação em Condições de Vida e Situação de Saúde na Amazônia (PPGVIDA), Instituto Leônidas e Maria Deane, Fiocruz Amazônia, Manaus, Amazonas, Brazil and <sup>6</sup>Laboratório de Bioecologia de insetos, Fundação Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, Rondônia, Brazil

\*Carvalho et al., 2017. New species records of *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) for the state of Rondônia in Brazilian Amazon. *Biodiversity Data Journal* 5: e13075. Doi: 10.3897/BDJ.5. e13075



Biodiversity Data Journal 5: e13075  
doi: 10.3897/BDJ.5.e13075



Taxonomic Paper

## **New species records of *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) for the state of Rondônia in Brazilian Amazon**

Luis Paulo Costa Carvalho<sup>†,§</sup>, Emanuelle de Sousa Farias<sup>‡</sup>, Luiz Herman Soares Gil<sup>¶</sup>, Felipe Arley Costa Pessoa<sup>‡</sup>, Jansen Fernandes Medeiros<sup>§</sup>

\*Levis et al., 2017. Persistent effects of pre-Columbian plant domestication on Amazonian forest composition. *Science* 355: 925-931. Doi 10.1126/science.aal0157

## Persistent effects of pre-Columbian plant domestication on Amazonian forest composition

C. LEVIS  F.R.C. COSTA  F. BONGERS  M. PEÑA-CLAROS  H. TER STEEGE  +149 authors [Authors Info & Affiliations](#)

### Supplementary Material for

#### Persistent effects of pre-Columbian plant domestication on Amazonian forest composition

Carolina Levis,<sup>1,2\*</sup> Flávia R.C. Costa,<sup>3</sup> Frans Bongers,<sup>2</sup> Marielos Peña-Claros,<sup>2</sup> Charles R. Clement,<sup>4</sup> André B. Junqueira,<sup>5</sup> Eduardo G. Neves,<sup>6,7</sup> Eduardo K. Tamanaha,<sup>8</sup> Fernando O.G. Figueiredo,<sup>1</sup> Rafael P. Salomão,<sup>9</sup> Carolina V. Castilho,<sup>10</sup> William E. Magnusson,<sup>3</sup> Oliver L. Phillips,<sup>11</sup> Juan Ernesto Guevara,<sup>12,13</sup> Daniel Sabatier,<sup>14</sup> Jean-François Molino,<sup>14</sup> Dairon Cárdenas López,<sup>15</sup> Abel Monteagudo Mendoza,<sup>16</sup> Nigel C.A. Pitman,<sup>17</sup> Alvaro Duque,<sup>18</sup> Percy Núñez Vargas,<sup>19</sup> Charles Eugene Zartman,<sup>3</sup> Rodolfo Vasquez,<sup>16</sup> Ana Andrade,<sup>20</sup> José Luís Camargo,<sup>20</sup> Ted R. Feldpausch,<sup>11,21</sup> Susan G.W. Laurance,<sup>22</sup> William F. Laurance,<sup>22</sup> Timothy J. Killeen,<sup>23</sup> Henrique Eduardo Mendonça Nascimento,<sup>3</sup> Juan Carlos Montero,<sup>24,25</sup> Bonifacio Mostacedo,<sup>26</sup> Iêda Leão Amaral,<sup>3</sup> Ima Célia Guimarães Vieira,<sup>9</sup> Roel Brienen,<sup>11</sup> Hernán Castellanos,<sup>27</sup> John Terborgh,<sup>28</sup> Marcelo de Jesus Veiga Carim,<sup>29</sup> José Renan da Silva Guimarães,<sup>29</sup> Luiz de Souza Coelho,<sup>3</sup> Francisca Dionízia de Almeida Matos,<sup>3</sup> Florian Wittmann,<sup>30,31</sup> Hugo F. Mogollón,<sup>32</sup> Gabriel Damasco,<sup>12</sup> Nállarett Dávila,<sup>33</sup> Roosevelt García-Villacorta,<sup>34,35</sup> Euridice N. Honorio Coronado,<sup>11,36</sup> Thaise Emilio,<sup>3,37</sup> Diogenes de Andrade Lima Filho,<sup>3</sup> Juliana Schiatti,<sup>3</sup> Priscila Souza,<sup>3</sup> Natalia Targhetta,<sup>38</sup> James A. Comiskey,<sup>39,40</sup> Beatriz S. Marimon,<sup>41</sup> Ben-Hur Marimon Jr.,<sup>41</sup> David Neill,<sup>42</sup> Alfonso Alonso,<sup>43</sup> Luzmila Arroyo,<sup>44</sup> Fernanda Antunes Carvalho,<sup>3,45</sup> Fernanda Coelho de Souza,<sup>3,11</sup> Francisco Dallmeier,<sup>46</sup> Marcelo Petratti Pansonato,<sup>3,47</sup> Joost F. Duivenvoorden,<sup>48</sup> Paul V.A. Fine,<sup>12</sup> Pablo R. Stevenson,<sup>49</sup> Alejandro Araujo-Murakami,<sup>44</sup> Gerardo A. Aymard C.,<sup>50</sup> Chris Baraloto,<sup>51</sup> Dário Dantas do Amaral,<sup>9</sup> Julien Engel,<sup>14,51,52</sup> Terry W. Henkel,<sup>53</sup> Paul Maas,<sup>54</sup> Pascal Petronelli,<sup>55</sup> Juan David Cardenas Revilla,<sup>3</sup> Juliana Stropp,<sup>56</sup> Doug Daly,<sup>57</sup> Rogerio Gribel,<sup>3</sup> Marcos Ríos Paredes,<sup>58</sup> Marcos Silveira,<sup>59</sup> Raquel Thomas-Caesar,<sup>60</sup> Tim R. Baker,<sup>11</sup> Naara Ferreira da Silva,<sup>61</sup> Leandro Valle Ferreira,<sup>9</sup> Carlos A. Peres,<sup>62</sup> Miles R. Silman,<sup>63</sup> Carlos Cerón,<sup>64</sup> Fernando Cornejo Valverde,<sup>65</sup> Anthony Di Fiore,<sup>66</sup> Eliana M. Jimenez,<sup>67</sup> Maria Cristina Peñuela Mora,<sup>68</sup> Marisol Toledo,<sup>25</sup> Edalcilio Marques Barbosa,<sup>3</sup> Luiz Carlos de Matos Bonates,<sup>3</sup> Nicolás Castaño Arboleda,<sup>69</sup> **Emanuelle de Sousa Farias,<sup>70,71</sup> Alfredo Fuentes,<sup>72,73</sup> Jean-Louis Guillaumet,<sup>74</sup> Peter Møller**

\*Almeida et al., 2017. Description of two new species of *Palpomyia* Meigen (Diptera: Ceratopogonidae) from the Brazilian Amazon. *EntomoBrasilis* 10: 105-110.

DOI: <http://dx.doi.org/10.12741/ebrasilis.v10i2.607>



[doi:10.12741/ebrasilis.v10i2.607](https://doi.org/10.12741/ebrasilis.v10i2.607)

e-ISSN 1983-0572

Publication of the project *Entomologistas do Brasil*

[www.ebras.bio.br](http://www.ebras.bio.br)

Creative Commons Licence v4.0 (BY-NC-SA)

Copyright © EntomoBrasilis

Copyright © Author(s)

*Taxonomy and Systematic / Taxonomia e Sistemática*

## Description of two new species of *Palpomyia* Meigen (Diptera: Ceratopogonidae) from the Brazilian Amazon

Registered on ZooBank: [urn:lsid:zoobank.org:pub:EB1EDD7B-351E-4B60-8F3E-59F05C388F24](http://urn:lsid:zoobank.org:pub:EB1EDD7B-351E-4B60-8F3E-59F05C388F24)

*Palpomyia amazonensis* sp. nov.: [urn:lsid:zoobank.org:act:E7E03E77-67B2-402E-9E0E-355E6F7AC598](http://urn:lsid:zoobank.org:act:E7E03E77-67B2-402E-9E0E-355E6F7AC598)

*Palpomyia lanceolata* sp. nov.: [urn:lsid:zoobank.org:act:704D7EE3-F301-447A-957D-3FBEE090499](http://urn:lsid:zoobank.org:act:704D7EE3-F301-447A-957D-3FBEE090499)

Jessica Feijó Almeida<sup>1</sup>, Emanuelle de Sousa Farias<sup>1</sup>✉, Ronildo Baiatone Alencar<sup>2</sup> & Felipe Arley Costa Pessoa<sup>1</sup>

1. Instituto Leônidas e Maria Deane-ILMD/FIOCRUZ-AM. 2. Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia-INPA.

*EntomoBrasilis* 10 (2): 118-112 (2017)

\*Gomes et al., 2018. Species Distribution Modelling: Contrasting presence-only models with plot abundance data. *Scientific Reports* 8: 1-12. doi: 10.1038/s41598-017-18927-1.

# SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

## Species Distribution Modelling: Contrasting presence-only models with plot abundance data

Received: 22 May 2017  
Accepted: 20 December 2017  
Published online: 17 January 2018

Vitor H. F. Gomes<sup>1,2</sup>, Stéphanie D. IJff<sup>3,4</sup>, Niels Raes<sup>3</sup>, Iêda Leão Amaral<sup>5</sup>, Rafael P. Salomão<sup>2</sup>, Luiz de Souza Coelho<sup>5</sup>, Francisca Dionízia de Almeida Matos<sup>5</sup>, Carolina V. Castilho<sup>6</sup>, Diogenes de Andrade Lima Filho<sup>5</sup>, Dairon Cárdenas López<sup>7</sup>, Juan Ernesto Guevara<sup>8,9</sup>, William E. Magnusson<sup>10</sup>, Oliver L. Phillips<sup>11</sup>, Florian Wittmann<sup>12,13</sup>, Marcelo de Jesus Veiga Carim<sup>14</sup>, Maria Pires Martins<sup>5</sup>, Mariana Victória Irumé<sup>5</sup>, Daniel Sabatier<sup>15</sup>, Jean-François Molino<sup>5</sup>, Olaf S. Bánki<sup>3</sup>, José Renan da Silva Guimarães<sup>14</sup>, Nigel C. A. Pitman<sup>16</sup>, Maria Teresa Fernandez Piedade<sup>17</sup>, Abel Monteagudo Mendoza<sup>18</sup>, Bruno Garcia Luize<sup>19</sup>, Eduardo Martins Venticinqu<sup>20</sup>, Evelyn Márcia Moraes de Leão Novo<sup>21</sup>, Percy Núñez Vargas<sup>22</sup>, Thiago Sanna Freire Silva<sup>23</sup>, Angelo Gilberto Manzatto<sup>24</sup>, John Terborgh<sup>25</sup>, Neidiane Farias Costa Reis<sup>26</sup>, Juan Carlos Montero<sup>27,5</sup>, Katia Regina Casula<sup>26</sup>, Beatriz S. Marimon<sup>28</sup>, Ben-Hur Marimon<sup>28</sup>, Euridice N. Honorio Coronado<sup>29,11</sup>, Ted R. Feldpausch<sup>30</sup>, Alvaro Duque<sup>31</sup>, Charles Eugene Zartman<sup>5</sup>, Nicolás Castaño Arboleda<sup>7</sup>, Timothy J. Killeen<sup>32</sup>, Bonifacio Mostacedo<sup>33</sup>, Rodolfo Vasquez<sup>18</sup>, Jochen Schöngart<sup>17</sup>, Rafael L. Assis<sup>17</sup>, Marcelo Brilhante Medeiros<sup>34</sup>, Marcelo Fragomeni Simon<sup>34</sup>, Ana Andrade<sup>35</sup>, William F. Laurance<sup>36</sup>, José Luis Camargo<sup>35</sup>, Layon O. Demarchi<sup>17</sup>, Susan G. W. Laurance<sup>36</sup>, Emanuelle de Sousa Farias<sup>37,38</sup>, Henrique Eduardo Mendonça Nascimento<sup>5</sup>, Juan David Cardenas Revilla<sup>5</sup>, Adriano Quaresma<sup>17</sup>, Flavia R. C. Costa<sup>5</sup>, Ima

\*Steege et al 2019. Rarity of monodominance in hyperdiverse Amazonian forests. *Scientific Reports*. 2019; 9:13822. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50323-9>

[www.nature.com/scientificreports](http://www.nature.com/scientificreports)

**SCIENTIFIC  
REPORTS**  
nature research

OPEN

## Rarity of monodominance in hyperdiverse Amazonian forests

Received: 14 May 2019  
Accepted: 2 September 2019  
Published online: 25 September 2019

Hans ter Steege<sup>1,2</sup>, Terry W. Henkel<sup>3</sup>, Nora Helal<sup>1</sup>, Beatriz S. Marimon<sup>4</sup>, Ben Hur Marimon-Junior<sup>4</sup>, Andreas Huth<sup>5</sup>, Jürgen Groeneveld<sup>5,6</sup>, Daniel Sabatier<sup>7</sup>, Luiz de Souza Coelho<sup>8</sup>, Diogenes de Andrade Lima Filho<sup>8</sup>, Rafael P. Salomão<sup>9,10</sup>, Iêda Leão Amaral<sup>8</sup>, Francisca Dionízia de Almeida Matos<sup>8</sup>, Carolina V. Castilho<sup>11</sup>, Oliver L. Phillips<sup>12</sup>, Juan Ernesto Guevara<sup>13,14</sup>, Marcelo de Jesus Veiga Carim<sup>15</sup>, Dairon Cárdenas López<sup>16</sup>, William E. Magnusson<sup>17</sup>, Florian Wittmann<sup>18,19</sup>, Mariana Victória Irueme<sup>8</sup>, Maria Pires Martins<sup>8</sup>, José Renan da Silva Guimarães<sup>15</sup>, Jean-François Molino<sup>7</sup>, Olaf S. Bánki<sup>20</sup>, Maria Teresa Fernandez Piedade<sup>21</sup>, Nigel C. A. Pitman<sup>22</sup>, Abel Monteagudo Mendoza<sup>23</sup>, José Ferreira Ramos<sup>8</sup>, Bruno Garcia Luize<sup>24</sup>, Evlyn Márcia Moraes de Leão Novo<sup>25</sup>, Percy Núñez Vargas<sup>26</sup>, Thiago Sanna Freire Silva<sup>27</sup>, Eduardo Martins Venticinque<sup>28</sup>, Angelo Gilberto Manzatto<sup>29</sup>, Neidiane Farias Costa Reis<sup>30</sup>, John Terborgh<sup>31,32</sup>, Katia Regina Casula<sup>30</sup>, Euridice N. Honorio Coronado<sup>33,12</sup>, Juan Carlos Montero<sup>34,8</sup>, Ted R. Feldpausch<sup>35,12</sup>, Alvaro Duque<sup>36</sup>, Flávia R. C. Costa<sup>8</sup>, Nicolás Castaño Arboleda<sup>16</sup>, Jochen Schöngart<sup>21</sup>, Timothy J. Killeen<sup>37</sup>, Rodolfo Vasquez<sup>23</sup>, Bonifacio Mostacedo<sup>38</sup>, Layon O. Demarchi<sup>21</sup>, Rafael L. Assis<sup>39</sup>, Chris Baraloto<sup>40</sup>, Julien Engel<sup>7,40</sup>, Pascal Petronelli<sup>41</sup>, Hernán Castellanos<sup>42</sup>, Marcelo Brillhante de Medeiros<sup>43</sup>, Adriano Quaresma<sup>21</sup>, Marcelo Fragomeni Simon<sup>43</sup>, Ana Andrade<sup>44</sup>, José Luís Camargo<sup>44</sup>, Susan G. W. Laurance<sup>32</sup>, William F. Laurance<sup>32</sup>, Lorena M. Rincón<sup>8</sup>, Juliana Schietti<sup>8</sup>, Thaiane R. Sousa<sup>8</sup>, **Emanuelle de Sousa Farias**<sup>45,46</sup>, Maria Aparecida Lopes<sup>47</sup>, José Leonardo Lima Magalhães<sup>48,49</sup>

\* Steege et al 2020. Biased-corrected richness estimates for the Amazonian tree flora. Scientific Reports. 2020; 10:10130 <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66686-3>.

[www.nature.com/scientificreports](http://www.nature.com/scientificreports)

**SCIENTIFIC  
REPORTS**

nature research



OPEN

## Biased-corrected richness estimates for the Amazonian tree flora

Hans ter Steege<sup>1,2</sup>, Paulo I. Prado<sup>3</sup>, Renato A. F. de Lima<sup>1,3</sup>, Edwin Pos<sup>4</sup>, Luiz de Souza Coelho<sup>5</sup>, Diogenes de Andrade Lima Filho<sup>5</sup>, Rafael P. Salomão<sup>6,7</sup>, Iêda Leão Amaral<sup>5</sup>, Francisca Dionízia de Almeida Matos<sup>5</sup>, Carolina V. Castilho<sup>8</sup>, Oliver L. Phillips<sup>9</sup>, Juan Ernesto Guevara<sup>10,11</sup>, Marcelo de Jesus Veiga Carim<sup>12</sup>, Dairon Cárdenas López<sup>13</sup>, William E. Magnusson<sup>14</sup>, Florian Wittmann<sup>15,16</sup>, Maria Pires Martins<sup>5</sup>, Daniel Sabatier<sup>17</sup>, Mariana Victória Ireme<sup>5</sup>, José Renan da Silva Guimarães<sup>12</sup>, Jean-François Molino<sup>17</sup>, Olaf S. Bánki<sup>1</sup>, Maria Teresa Fernandez Piedade<sup>18</sup>, Nigel C. A. Pitman<sup>19</sup>, José Ferreira Ramos<sup>5</sup>, Abel Monteagudo Mendoza<sup>20</sup>, Eduardo Martins Venticinque<sup>21</sup>, Bruno Garcia Luize<sup>22</sup>, Percy Núñez Vargas<sup>23</sup>, Thiago Sanna Freire Silva<sup>24</sup>, Evlyn Márcia Moraes de Leão Novo<sup>25</sup>, Neidiane Farias Costa Reis<sup>26</sup>, John Terborgh<sup>27,28</sup>, Angelo Gilberto Manzatto<sup>29</sup>, Katia Regina Casula<sup>26</sup>, Euridice N. Honorio Coronado<sup>30,30</sup>, Juan Carlos Montero<sup>5,31</sup>, Alvaro Duque<sup>32</sup>, Flávia R. C. Costa<sup>5</sup>, Nicolás Castaño Arboleda<sup>13</sup>, Jochen Schöngart<sup>18</sup>, Charles Eugene Zartman<sup>5</sup>, Timothy J. Killeen<sup>33</sup>, Beatriz S. Marimon<sup>34</sup>, Ben Hur Marimon-Junior<sup>34</sup>, Rodolfo Vasquez<sup>20</sup>, Bonifacio Mostacedo<sup>35</sup>, Layon O. Demarchi<sup>18</sup>, Ted R. Feldpausch<sup>9,36</sup>, Julien Engel<sup>17,37</sup>, Pascal Petronelli<sup>38</sup>, Chris Baraloto<sup>37</sup>, Rafael L. Assis<sup>39</sup>, Hernán Castellanos<sup>40</sup>, Marcelo Fragomeni Simon<sup>41</sup>, Marcelo Brilhante de Medeiros<sup>41</sup>, Adriano Quaresma<sup>18</sup>, Susan G. W. Laurance<sup>28</sup>, Lorena M. Rincón<sup>5</sup>, Ana Andrade<sup>42</sup>, Thaiane R. Sousa<sup>5</sup>, José Luís Camargo<sup>42</sup>, Juliana Schietti<sup>5</sup>, William F. Laurance<sup>28</sup>, Helder Lima de Queiroz<sup>43</sup>, Henrique Eduardo Mendonça Nascimento<sup>5</sup>, Maria Aparecida Lopes<sup>44</sup>, **Emanuelle de Sousa Farias**<sup>45,46</sup>, José Leonardo Lima Magalhães<sup>47,48</sup>, Roel Brienen<sup>9</sup>, Gerardo A. Aymard C.<sup>49</sup>, Juan David Cardenas Revilla<sup>5</sup>, Ima Célia Guimarães Vieira<sup>7</sup>, Bruno Barçante Ladvoat Cintra<sup>50</sup>, Pablo R. Stevenson<sup>51</sup>,



Artigos aceitos Co-autoria

Pos et al. The Maximum Entropy Formalism of statistical mechanics in a biological application: a quantitative analysis of tropical forest ecology.

bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2021.03.31.437717>; this version posted April 1, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

1 **Title:** The Maximum Entropy Formalism of statistical mechanics in a biological

2 application: a quantitative analysis of tropical forest ecology.

3

4 **Authors:** Edwin Pos\*,1,2 Luiz de Souza Coelho,3 Diogenes de Andrade Lima  
 5 Filho,3 Rafael P. Salomão,4,5 Iêda Leão Amaral,3 Francisca Dionizia de Almeida  
 6 Matos,3 Carolina V. Castilho,6 Oliver L. Phillips,7 Juan Ernesto Guevara,8,9 Marcelo  
 7 de Jesus Veiga Carim,10 Dairon Cárdenas López,11 William E. Magnusson,12  
 8 Florian Wittmann,13,14 Mariana Victória Irueme,3 Maria Pires Martins,3 Daniel  
 9 Sabatier,15 José Renan da Silva Guimarães,10 Jean-François Molino,15 Olaf S.  
 10 Bánki,2 Maria Teresa Fernandez Piedade,16 Nigel C.A. Pitman,17 Abel Monteagudo  
 11 Mendoza,18 José Ferreira Ramos,3 Joseph E. Hawes,19 Everton José Almeida,20  
 12 Luciane Ferreira Barbosa,20 Larissa Cavalheiro,20 Márcia Cléia Vilela dos Santos,20  
 13 Bruno Garcia Luize,21 Evelyn Márcia Moraes de Leão Novo,22 Percy Núñez  
 14 Vargas,23 Thiago Sanna Freire Silva,24 Eduardo Martins Venticinque,25 Angelo  
 15 Gilberto Manzatto,26 Neidiane Farias Costa Reis,27 John Terborgh,28,29 Katia  
 16 Regina Casula,27 Euridice N. Honorio Coronado,30,7 Juan Carlos Montero,31,3  
 17 Beatriz S. Marimon,32 Ben Hur Marimon-Junior,32 Ted R. Feldpausch,33,7 Alvaro  
 18 Duque,34 Chris Baraloto,35 Nicolás Castaño Arboleda,11 Julien Engel,15,35 Pascal  
 19 Petronelli,36 Charles Eugene Zartman,3 Timothy J. Killeen,37 Rodolfo Vasquez,18  
 20 Bonifacio Mostacedo,38 Rafael L. Assis,39 Jochen Schöngart,16 Hernán  
 21 Castellanos,40 Marcelo Brilhante de Medeiros,41 Marcelo Fragomeni Simon,41 Ana  
 22 Andrade,42 José Luís Camargo,42 Layon O. Demarchi,16 William F. Laurance,29  
 23 Susan G.W. Laurance,29 **Emanuelle de Sousa Farias**,43,44 Maria Aparecida Lopes,45  
 24 José Leonardo Lima Magalhães,46,47 Henrique Eduardo Mendonça Nascimento,3  
 25 Helder Lima de Queiroz,48 Gerardo A. Aymard C.,49 Roel Brienen,7 Juan David  
 26 Cardenas Revilla,3 Flávia R.C. Costa,3 Adriano Quaresma,16 Ima Célia Guimarães

## Resumos em congresso

\* Eric Fabricio Marialva dos Santos, Andreza carvalho da Silva, Emanuelle de Sousa Farias, Claudia Maria Rios Velasquez e Felipe Arley Costa Pessoa. Life cycle, fertility and longevity of *Migonemyia migonei* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae), under laboratory conditions. XXV Congresso Brasileiro de Parasitologia, realizado em Búzios, de 03 a 06 de setembro de 2017, no Rio de Janeiro.

\* Eric Fabricio Marialva dos Santos, Andreza carvalho da Silva, Emanuelle de Sousa Farias, Claudia Maria Rios Velasquez e Felipe Arley Costa Pessoa. Oviposition preference on different

substrates, under laboratory conditions of *Migonemyia migonei* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). XXV Congresso Brasileiro de Parasitologia, realizado em Búzios, de 03 a 06 de setembro de 2017, no Rio de Janeiro.

\*Eric Fabricio Marialva dos Santos, Andreza carvalho da Silva, Emanuelle de Sousa Farias, Nagila Francinete costa Secundino, Claudia Maria Rios Velasquez e Felipe Arley Costa Pessoa. Biologia de *Migonemyia migonei*, vetor de *Leishmania brasiliensis* em condições de laboratório. 54º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Olinda-PE, 02 a 05 de setembro 2018.

\* Jokebede Melynda dos Santos Paulino Rosa, Emanuelle de Sousa Farias, Jordam Wiliam Pereira Silva e Felipe Arley Costa Pessoa. Morfometria Geométrica de asas de espécies de *Culicoides* do grupo *guttatus* (Diptera: Ceratopogonidae). 54º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Olinda-PE, 02 a 05 de setembro 2018.

\* Jokebede Melynda dos Santos Paulino Rosa, Emanuelle de Sousa Farias e Felipe Arley Costa Pessoa. Fauna de maruins do grupo *guttatus* (Diptera: *Culicoides*: Ceratopogonidae), na Amazônia Central Brasileira. 3º Congresso Amazônico de Iniciação Científica. Faculdade La Salles, Manaus-AM. 25 a 29 de junho de 2018.

\*Farias, E. De Sousa; Paulino-Rosa, J. M. S.; Santos, S. S.; Pereira-Silva, J. W.; Coelho, L. S.; Pessoa, F. A. C. Integrated taxonomy to elucidate the diversity and taxonomic limits of biting midges (*Culicoides* and *Leptoconops*, Diptera: Ceratopogonidae) in the Brazilian Amazon, 2019. (Outra, Apresentação de Trabalho). Local: UFMG Veterinary School; Cidade: Belo Horizonte, MG; Evento: Gnatwork workshop; Inst.promotora/financiadora: The Pirbright Institute

\* Farias, E. S.; Paulino-Rosa, J. M. S.; Santos, S. S.; Pereira-Silva, J. W.; Coelho, Luiz Souza; Pessoa, FAC. Maruins (Diptera: Ceratopogonidae) do Baixo Amazonas, Estado do Pará, Brasil,

incluído novo registro, 2019. (Simpósio, Apresentação de Trabalho) Local: Universidade Federal do Amazonas - UFAM; Cidade: Manaus-AM; Evento: Simpósio de Zoologia da Amazônia; Inst.promotora/financiadora: Universidade Federal do Amazonas - UFAM

### **Prêmios**

\*O artigo “Persistent effects of pre-Columbian plant domestication on Amazonian forest composition”, foi contemplado com o prêmio William Cooper 2020, da Ecological Society of America – ESA, que homenageia autores de publicações de destaque nos campos da geobotânica, ecologia fisiográfica, sucessão vegetal ou na distribuição de plantas em gradientes ambientais. O Artigo contemplado: Persistent effects of pre-Columbian plant domestication on Amazonian forest composition. Levis et al., Science 355, 925–931 (2017).

### **Coorientações de Iniciação científica**

\*Jhonata Andrade Santiago. Caracterização genética e morfométrica entre duas populações de *Migonemyia migonei* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae), vetores de leishmaniose na América do Sul. 2020. Iniciação científica - Instituto Leônidas & Maria Deane/FIOCRUZ-AM Referências adicionais: Brasil/Português.

\*Sanmya Silva dos Santos. Fauna de *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) na Amazônia Central Brasileira: Identificação morfológica e genética de espécies do grupo *guttatus*.. 2020. Iniciação científica - Instituto Leônidas & Maria Deane/FIOCRUZ-AM Referências adicionais: Brasil/Português.

\*Jhonata Andrade Santiago. Biologia e estudos morfométricos sobre duas populações de *Migonemyia migonei* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) em laboratório. 2019. Iniciação científica - Instituto Leônidas & Maria Deane/FIOCRUZ-AM Inst. financiadora: Fundação de

Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas Palavras-chave: Leishmaniose, especiação, alopatría, vetor Referências adicionais: Brasil/Português.

\*Sanmya Silva dos Santos. Fauna de *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae), na Amazônia Central Brasileira: Morfologia e Morfometria geométrica de asas do grupo *guttatus*. 2018. Iniciação científica - Instituto Leônidas & Maria Deane/FIOCRUZ-AM Inst. financiadora: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico Referências adicionais: Brasil/Português.

\*Jokebede Melynda dos Santos Paulino Rosa. Fauna de *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae), na Amazônia Central Brasileira: Morfologia e Morfometria geométrica de asas do grupo *guttatus*. 2017. Iniciação científica - Instituto Leônidas & Maria Deane/FIOCRUZ-AM Inst. financiadora: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico Referências adicionais: Brasil/Português.

\*Andreza Carvalho da Silva. Ciclo de vida e fecundidade de *Migonemyia migonei* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae), in vitro, Manaus, Amazonas. 2016. Iniciação científica - Instituto Leônidas & Maria Deane/FIOCRUZ-AM Inst. financiadora: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas Referências adicionais: Brasil/Português.

### **Orientação em Andamento- TCC**

\*Jhonata Andrade Santiago. Biologia e estudos morfométricos entre duas populações de *Migonemyia migonei* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae), vetores de leishmaniose na América do Sul. disciplina de trabalho de conclusão de curso (TCC I E TCC II). Universidade Nilton Lins.

### **Mobilidade acadêmica**

**Jacenir Mallet, PhD** Pesquisadora Titular

Chefe do Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Entomológica de Diptera e Hemiptera do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ.

**Maria Luiza Felipe Bauer** Curadora da Coleção de Ceratopogonidae (CCER/FIOCRUZ)

Laboratório de Diptera, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ.

**Yara Traub-Cseko, PhD** Pesquisadora Titular

Chefe do Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas e Vetores. Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ.