

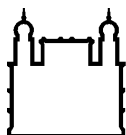
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Biologia Celular e Molecular

**SISTEMÁTICA DE FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA, PSYCHODIDAE,  
PHLEBOTOMINAE) NEOTROPICAIS COM ÊNFASE NAS ESPÉCIES QUE  
OCORREM NO BRASIL**

**ISRAEL DE SOUZA PINTO**

Rio de Janeiro  
Dezembro de 2014



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Doutorado em Biologia Celular e Molecular**

***ISRAEL DE SOUZA PINTO***

SISTEMÁTICA DE FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA, PSYCHODIDAE,  
PHLEBOTOMINAE) NEOTROPICAIS COM ÊNFASE NAS ESPÉCIES QUE  
OCORREM NO BRASIL

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz  
como parte dos requisitos para obtenção do título  
de Doutor em Ciências

**Orientador:** Prof. Dr. Alexandre Afranio Peixoto

**RIO DE JANEIRO**  
Dezembro de 2014

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

P659 Pinto, Israel de Souza

Sistemática de flebotomíneos (diptera, psychodidae, phlebotominae) neotropicais com ênfase nas espécies que ocorrem no Brasil / Israel de Souza Pinto. – Rio de Janeiro, 2014.

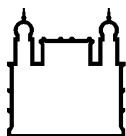
xix, 222 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2014.

Bibliografia: f. 177-203

1. Biodiversidade. 2. Phlebotominae. 3. Taxonomia integrativa. 4. Sistemática molecular. I. Título.

CDD 595.772



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Doutorado em Biologia Celular e Molecular**

**ISRAEL DE SOUZA PINTO**

**SISTEMÁTICA DE FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA, PSYCHODIDAE,  
PHLEBOTOMINAE) NEOTROPICAIS COM ÊNFASE NAS ESPÉCIES QUE  
OCORREM NO BRASIL**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Alexandre Afranio Peixoto**

**Aprovada em: 22 / 12 / 2014**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dr. Fernando Araújo Monteiro – IOC/Fiocruz - presidente**

**Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Camila Junqueira Mazzoni – Berlin Center for Genomics in  
Biodiversity Research**

**Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla – UNESP/SP**

**Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Elisa Cupolillo – IOC/Fiocruz**

**Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Renata Schama Lelis – IOC/Fiocruz**

Rio de Janeiro, 22 de dezembro de 2014

**Em memória de um amigo, de um orientador, de um cientista e de um pai: Alexandre Afrânio Peixoto**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Senhor Deus em quem deposito minha confiança.

Ao Alexandre que meu deu a feliz oportunidade de ser seu orientando. E que durante o tempo em que estivemos juntos me ensinou ciências de várias maneiras. Ensinou-me humildade, sensatez, alegria e, principalmente, amizade. Muito obrigado Alexandre, estarás sempre em minha memória.

Aos meus pais, irmão, sobrinhos, namorada e família. Vocês sempre foram âncoras que me seguraram em terreno firme e cordas que me sustentaram em meio às turbulências.

Aos alunos que me auxiliaram no decorrer desse trabalho, em especial à Bruna Dias das Chagas e à Fernanda Benevides. Essas foram pacientes mestres, aprendizes e amigas durante essa jornada.

Ao Kiko, ao Vigoder e à Saori por me ensinarem um pouco do muito que sabem. Pela paciência em ajudar. Pelas companhias durante os trabalhos de campo. Pelo auxílio nos trabalhos de laboratório, incluindo análise de dados.

Ao Robson, Rafaela e Lourdes, cujos trabalhos foram essenciais para os desenvolvimento e finalização dessa tese.

A todos os amigos e componentes do Laboratório de Biologia Molecular de Insetos: Guga, Rayane, João, Pablo, Márcio, Renata, Karine, Paulo, Thaís e Denise.

Ao pessoal da secretaria acadêmica do IOC pela diligência e pela competência em ajudar e sanar todas as dúvidas em relação às burocracias, em especial a Daniele Lobato e ao Eduardo.

À coordenação da Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, professores Leila Mendonça e Milton Ozório, pelos inúmeros auxílios de viagens para congressos e trabalhos de campo.

Ao pessoal da plataforma de sequenciamento do IOC, em especial Renata, Beatriz e Aline pela ajuda e amizade nesses anos.

A Andressa Fuzari pelo auxílio com a montagem de insetos e pela amizade.

Aos professores Aloísio Falqueto, Adelson Ferreira, Gustavo Leite e Claudiney Biral pelas contínuas ajudas e por continuarem sendo bases fortes do meu crescimento científico e terem auxiliado nesses trabalhos da tese.

Aos doutores Elisa Cupolillo e Reginaldo Brazil pela amizade nas fases tranquilas, e pelo ombro forte nos períodos complexos durante essa tese.

Aos doutores Reinaldo Brito e Paulo Ribolla que se dispuseram em ajudar de todas as formas possíveis quando as dificuldades apareceram.

Aos doutores José Dilermando Andrade Filho, Paloma Shimabukuro e Eunice Galati pela ajuda com a identificação morfológica dos espécimes, pela amizade e pelas colaborações.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisas em Leishmaniose: Barbara, Carol, Mariana, Selma e Gabriel.

Aos amigos pessoais do dia a dia. Em especial ao Valmir e Antonio Teva que sempre ajudaram de modo especial.

Aos amigos do Laboratório de Genética de Populações e Evolução da Universidade Federal de São Carlos: André, Lívia, Emeline, Júlia, Aline, Mário, Isabela, Andrea, Felipe, Cris, Vitor, Carlos, Natália e Janaína. Em especial a Samiruda e ao Ricardo pelo bom papo, hospedagem e inúmeras caronas.

Ao doutor Gabriel Grimaldi pelas colaborações científicas.

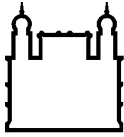
Ao Thieres Marassati e ao Helder Rezende pelas colaborações científicas.

Às amigas Dra. Constança Britto, Thais Pereira e Daniela Pereira do Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas do IOC pelas colaborações.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo auxílio financeiro.

**“Começamos a examinar esses flebótomos às oito horas da noite;... Éramos muito novos e aquilo era novidade, uma coisa que ninguém nunca tinha visto antes, ninguém sabia se este bicho era transmissor da leishmânia. Se eles pegavam, podiam ser transmissores também.” *In Brito et al. (1994) Leônidas Deane: aventuras na pesquisa.***





Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

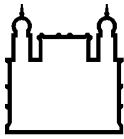
### SISTEMÁTICA DE FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA, PSYCHODIDAE, PHLEBOTOMINAE) NEOTROPICAIS COM ÊNFASE NAS ESPÉCIES QUE OCORREM NO BRASIL

#### RESUMO

#### TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Israel de Souza Pinto**

Os flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) são uma das maiores preocupações para a saúde pública como transmissores dos parasitos que causam leishmanioses. Assim, estudos integrativos envolvendo a distribuição geográfica, os aspectos ecológicos e a sistemática desses insetos são necessários para a confecção de ferramentas acuradas de combate a esses insetos e, conseqüentemente, para o controle das leishmanioses. Aqui utilizamos o fragmento de 658-pb do gene mitocondrial *citocromo c oxidase subunidade I* (COI), conhecido como código de barras de DNA, para identificar diversas espécies de flebotomíneos obtidas durante levantamentos de fauna de diversas regiões brasileiras. Além do COI, utilizamos também fragmentos do gene *period* para estudar as espécies do complexo *Lutzomyia longipalpis*. Ao todo, 576 espécimes pertencentes a 47 espécies foram identificados morfológicamente e tiveram seu DNA genômico extraído e o fragmento do COI amplificado e sequenciado. Também foram amplificados e sequenciados um fragmento de 266-pb do gene *period* para oito populações de *Lu. longipalpis* ainda não amostradas e um fragmento de 446-pb para outras onze populações ineditamente estudadas. O uso do gene COI se mostrou útil para identificação de aproximadamente 90 % das espécies analisadas. As análises do COI sugeriram a presença de diversidade críptica para quatro espécies: *Evandromyia edwardsi*, *Pintomyia monticola*, *Psathyromyia bigeniculata* e *Sciopemyia microps*. As análises também salientaram a necessidade de revisão morfológica do gênero *Sciopemyia* devido a alta divergência genética entre suas espécies. Ainda, foi possível estabelecer a associação entre machos e suas respectivas fêmeas para os gêneros *Brumptomyia*, *Evandromyia* e *Pressatia* cujas fêmeas são muito semelhantes. Também permitiu corrigir uma identificação morfológica errônea de uma espécie do gênero *Brumptomyia*. Porém, o código de barras de DNA não foi útil para diferenciar espécies com fortes indícios de introgressão como as do complexo *Lu. longipalpis*. Por outro lado, as análises de um fragmento de 266-pb do gene *period* para populações da espécie de *Lu. longipalpis* com som do tipo *burst* permitiram aumentar o conhecimento sobre a distribuição geográfica dessa espécie, apontar possíveis fatores históricos que modelaram essa distribuição e corroborar dados previamente publicados com respeito à homogeneidade genética dessa espécie. Já as análises de outras onze novas populações utilizando um fragmento de 446-pb permitiram discriminar populações sem som de cópula gravado pertencentes a espécie com som de cópula do tipo *burst* das com sons de cópula do tipo pulsado. Ainda, dentro das espécies com sons de cópula do tipo pulsado, essas análises sugeriram uma discriminação entre a espécie com som de cópula pulsado do tipo 1 e as demais. Os resultados reforçaram a necessidade da identificação molecular para complementar aqueles obtidos com a identificação morfológica e também a utilidade da identificação molecular em descobrir diversidade críptica dentro de algumas espécies de flebotomíneos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### SYSTEMATICS OF NEOTROPICAL SAND FLIES (DIPTERA, PSYCHODIDAE, PHLEBOTOMINAE) WITH EMPHASIS IN THE BRAZILIAN SPECIES

#### ABSTRACT

#### PHD THESIS IN CELULAR AND MOLECULAR BIOLOGY

**Israel de Souza Pinto**

Sand flies (Diptera, Psychodidae) are of greatest public health concern as the main vectors of parasites that cause leishmaniasis. Therefore, integrative approaches encompassing sand flies geographic distribution, ecological aspects and systematics are required to produce accurate combat tools against these insects and, consequently, for leishmaniasis control. Here we used a 658-bp fragment of the mitochondrial gene *cytochrome c oxidase subunit I* (COI), known as DNA barcode, to identify sand flies species collected during fauna surveys in several Brazilian regions. Furthermore, we also used *period* gene fragments to study sibling species within the *Lutzomyia longipalpis* complex. A total of 576 specimens belonging to 47 species were morphologically identified and their genomic DNA was extracted and a COI gene fragment was amplified and sequenced. Also were amplified and sequenced 266-bp fragments of the *period* gene for eight *Lu. longipalpis* populations not analyzed so far and 446-bp fragments for eleven recently collected *Lu. longipalpis* populations. The COI gene was useful to discriminate approximately 90 % of the analyzed species. The DNA barcode analyses suggested cryptic diversity within four species: *Evandromyia edwardsi*, *Pintomyia monticola*, *Psathyromyia bigeniculata* and *Sciopemyia microps*. The analyses also highlighted the necessity of morphological revision for the *Sciopemyia* genus due to high genetic divergence among its species. Therefore it was possible to establish association between males and their females within the genera *Brumptomyia*, *Evandromyia* and *Pressatia* which are very similar. Also, it allowed to correct a morphological misidentification of one species belonging to the *Brumptomyia* genus. However, the DNA barcode was not useful to discriminate among species with strong evidence of introgression such as the *Lu. longipalpis* sibling species. On the other hand, the analyses of the 266-bp fragment of the gene *period* for the populations of the sibling species producing burst-type copulations songs revealed possible historical factors that shaped this geographic distribution and corroborated previous data regarding the genetic homogeneity of this sibling species. The analyses of eleven recently collected populations using a 446-bp fragment of the *period* gene discriminated between populations with no recorded copulation song belonging to the burst-type sibling species from populations belonging to the pulse-types sibling species. Also, within the sibling species with pulse-types copulation songs, it was possible to discriminate between the sibling species with pulse-type 1 copulation song from the others. The results reinforced the necessity of molecular identification to complement results obtained by morphological identification and showed the utility of the molecular identification to discover cryptic diversity within some sand fly species.

## ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	<b>VIII</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>IX</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1. Sistemática de Phlebotominae.....	1
1.1.1. Sistemática de Phlebotominae neotropicais.....	3
1.2. Espécies crípticas de Phlebotominae neotropicais.....	10
1.3. Sistemática molecular de Phlebotominae neotropicais.....	11
1.3.1. Os códigos de barra de DNA.....	15
1.3.2. O complexo <i>Lutzomyia longipalpis</i> .....	17
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>20</b>
2.1. Objetivo geral.....	20
2.2. Objetivos específicos.....	20
<b>3. CAPÍTULO 1 - Aspectos ecológicos e epidemiológicos da fauna de flebotomíneos do Monumento Natural dos Pontões Capixabas, estado do Espírito Santo, Sudeste do Brasil</b>	<b>21</b>
<b>4. CAPÍTULO 2 - Primeiro registro de <i>Brumptomyia ortizi</i> (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) no estado do Rio de Janeiro, Sudeste do Brasil</b>	<b>31</b>
<b>5. CAPÍTULO 3 - Código de barras de DNA de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) neotropicais: identificação e descoberta de espécies para o Brasil</b>	<b>41</b>
<b>6. CAPÍTULO 4 - Sistemática molecular de flebotomíneos neotropicais: o complexo <i>Lutzomyia longipalpis</i></b>	<b>110</b>
6.1. Análise da diferenciação molecular de oito populações de <i>Lutzomyia longipalpis</i> utilizando um fragmento de 266 pb do gene <i>period</i> .....	110
6.1.1. Metodologia.....	110
6.1.2. Resultados.....	114
6.2. Caracterização molecular de onze populações brasileiras do complexo <i>Lutzomyia longipalpis</i> (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) utilizando um fragmento do gene <i>period</i> de 446 pb..	126
6.2.1. Metodologia.....	126
6.2.1.1. Amostragem de flebotomíneos.....	126
6.2.1.2. Extração do DNA genômico, amplificação e sequenciamento do fragmento do gene <i>period</i> .....	126
6.2.1.3. Análises de sequências e filogenéticas.....	127
6.2.2. Resultados.....	128
<b>7. DISCUSSÃO</b>	<b>161</b>
7.1. Sistemática morfológica e levantamentos de fauna de flebotomíneos.....	161
7.2. Sistemática molecular de flebotomíneos neotropicais: os códigos de barras de DNA.....	166
7.3. Sistemática molecular de flebotomíneos neotropicais: o complexo <i>Lutzomyia longipalpis</i> .....	171

<b>8. CONCLUSÕES</b>	<b>178</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>179</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1.1 .....	6
Figura 1.2 .....	7
Figura 1.3 .....	8
Figura 1.4 .....	9
Figura 3.1 .....	24
Figura 4.1 .....	40
Figura 5.1 .....	69
Figura 5.2 .....	70
Figura 5.3 .....	71
Figura 5.4 .....	73
Figura 5.5 .....	80
Figura 5.6 .....	81
Figura 5.7 .....	82
Figura 5.8 .....	83
Figura 5.9 .....	84
Figura 5.10 .....	85
Figura 5.11 .....	86
Figura 5.12 .....	86
Figura 5.13 .....	87
Figura 5.14 .....	87
Figura 5.15 .....	88
Figura 5.16 .....	88
Figura 5.17 .....	89
Figura 5.18 .....	89
Figura 5.19 .....	90
Figura 5.20 .....	90
Figura 5.21 .....	91
Figura 5.22 .....	91
Figura 5.23 .....	92
Figura 5.24 .....	92
Figura 5.25 .....	93
Figura 6.1.1 .....	118
Figura 6.1.2 .....	119
Figura 6.2.1 .....	133
Figura 6.2.2 .....	136
Figura 6.2.3 .....	144
Figura 6.2.4 .....	145
Figura 6.2.5 .....	146
Figura 6.2.6 .....	147
Figura 6.2.7 .....	148
Figura 6.2.8 .....	149

## ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1.1 .....	2
Tabela 3.1 .....	26
Tabela 3.2 .....	27
Tabela 5.1 .....	94
Tabela 5.2 .....	98
Tabela 5.3 .....	109
Tabela 6.1.1 .....	120
Tabela 6.1.2 .....	121
Tabela 6.1.3 .....	122
Tabela 6.1.4 .....	123
Tabela 6.1.5 .....	124
Tabela 6.1.6 .....	125
Tabela 6.2.1 .....	150
Tabela 6.2.2 .....	151
Tabela 6.2.3 .....	152
Tabela 6.2.4 .....	153
Tabela 6.2.5 .....	156
Tabela 6.2.6 .....	157
Tabela 6.2.7 .....	158
Tabela 6.2.8 .....	159

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	Celsius degrees
µL	microliters
µM	micromoles
12SRNAr	gene mitocondrial ribossômico 12S
1S	uma pinta
1S	Sobral 1 pinta
28SRNAr	gene nuclear ribossômico 28S
2S	duas pintas
2S	Sobral 2 pintas
A	Adenine
a.s.l.	at the sea level
ABGD	Automatic Barcode Gap Discovery
ACI	Araci
ACI	Araci
AFC	Afonso Cláudio
Afc	Afonso Cláudio
AfC	Afonso Cláudio
aff.	affinis
AIC	método de Akaike
AL	Alagoas
ALC	Alfredo Chaves
AMOVA	análise de variância molecular
ARN	Alto Rio Novo
ART	Araçatuba
B1	bloco 1
B2	bloco 2
BA	Bahia
BAG	Baixo Guandu
BAG	Barra de Guaratiba
Bar	Barcarena
BARC	Barcarena
BG	Barra de Guaratiba
Bi_fla	<i>Bichromomyia flaviscutellata</i>
BJI	Bom Jesus do Itabapoana
BOLD	Barcode of Life Database
bp	base pairs
Br.	<i>Brumptomyia</i>
Br_cun	<i>Brumptomyia cunhai</i>
Br_nit	<i>Brumptomyia nitzulescui</i>
Br_ort	<i>Brumptomyia ortizi</i>
Br_sp	<i>Brumptomyia</i> spp.
C	Cytosine
CAC	Cáceres
CAC	Cáceres
Cam	Camará
CDC	Center of Disease Control
CE	Ceará
CL	Cutaneous leishmaniasis
CMR	Camará
CMT	Cametá

COI	<i>citocromo c oxidase subunidade I</i>
COLFLEB	Coleção de Flebotomíneos
CVG	Cavunge
D <sub>c</sub>	distância do clado
Dec.	december
D <sub>n</sub>	distância do clado aninhado
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DOM	Domingos Martins
E1S	Estrela 1S
ES	Espírito Santo
Est	Estrela
Est1S	Estrela 1S
Est2S	Estrela 2S
Ev.	<i>Evandromyia</i>
Ev_car	<i>Evandromyia carmelinoi</i>
Ev_edw	<i>Evandromyia edwardsi</i>
Ev_len	<i>Evandromyia lenti</i>
Ev_sp	<i>Evandromyia</i> spp.
Ev_ter	<i>Evandromyia termitophila</i>
Ev_tup	<i>Evandromyia tupynambai</i>
Ex_fir	<i>Expapillata firmatoi</i>
F	Forest
F <sub>CT</sub>	Coefficiente de variação entre populações
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
F <sub>ST</sub>	Índice de fixação
G	Guanine
H	Shannon's index
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IBI	Ibitirama
ICZN	International Code of Zoological nomenclature
Ipa	Ipanema
IPA	Ipanema
IPEMA	Instituto de Pesquisas da Mata Atlântica
ITA	Itaguaçu
Ita	Itamaracá
ITM	Itamaracá
IUN	Iúna
J	Equitability index
J1S	Jaíba 1S
J2S	Jaíba 2S
Jac	Jacobina
JAC	Jacobina
Jai	Jaíba
Jai1S	Jaíba 1S
Jai2S	Jaíba 2S
JON	João Neiva
K2P	Kimura 2-parameters
L.	<i>Leishmania</i>
LAP	Lapinha
LAS	Lassance
Le.	<i>Leishmania</i>
Lu.	<i>Lutzomyia</i>



Lu_ale	<i>Lutzomyia alencari</i>
Lu_cru	<i>Lutzomyia cruzi</i>
Lu_dis	<i>Lutzomyia dispar</i>
Lu_ren	<i>Lutzomyia renei</i>
Lu_sp	<i>Lutzomyia</i> sp.
m	metros
MAN	Mantenópolis
MAR	Marilândia
Mar	Marajó
MAR	Marajó
Mes	Mesquita
MES	Mesquita
MG	Minas Gerais
<i>Mg.</i>	<i>Migonemyia migonei</i>
Mg_mig	<i>Migonemyia migonei</i>
Mi_cap	<i>Micropygomyia capixaba</i>
Mi_ech	<i>Micropygomyia echinatopharynx</i>
Mi_fer	<i>Micropygomyia ferreirana</i>
Mi_per	<i>Micropygomyia peresi</i>
Mi_qui	<i>Micropygomyia quinquefer</i>
Mi_sch	<i>Micropygomyia schreiberi</i>
min.	minutes
ml	mililitros
mm	milímetros
MT	Mato Grosso
<i>Mt.</i>	<i>Martinsmyia</i>
mtDNA	mitochondrial DNA
Nat	Natal
NAT	Natal
$n_h$	número de haplótipos
$n_i$	número de indivíduos
NJ	Neighbor-Joining
NMPC	Natural Monumento of Pontões Capixabas
Npo	Nova Porteirinha
NPO	Nova Porteirinha
NPO	Nova Porteirinha
NRB1	bloco não recombinante 1
NRB2	bloco não recombinante 2
$n_s$	número de sequências das amostras
NUMT	nuclear copies of mitochondrial DNA
<i>Ny.</i>	<i>Nyssomyia</i>
Ny_int	<i>Nyssomyia intermedia</i>
Ny_whi	<i>Nyssomyia whitmani</i>
Ny_yui	<i>Nyssomyia yuilli yuilli</i>
O	oeste
Oct.	october
OLI	Olindina
P	peridomicily
P1S	Palmas 1S
P2S	Palmas 2S
PA	Pará
<i>Pa.</i>	<i>Psathyromyia</i>

Pa_big	<i>Psathyromyia bigeniculata</i>
Pa_lim	<i>Psathyromyia limai</i>
Pa_lut	<i>Psathyromyia lutziana</i>
Pa_pas	<i>Psathyromyia pascalei</i>
Pa_pel	<i>Psathyromyia pelloni</i>
Pal	Palmas
Pal 2S	Palmas 2S
Pal1S	Palmas 1S
PAN	Pancas
Pan	Pancas
PAN	Pancas
Pas	Passira
PAS	Passira
PAST	Paleontological Statistics
pb	pares de base
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Pernambuco
<i>Ph.</i>	<i>Phlebotomus</i>
<i>Pi.</i>	<i>Pintomyia</i>
Pi_bia	<i>Pintomyia bianchigalatae</i>
Pi_fis	<i>Pintomyia fischeri</i>
Pi_mis	<i>Pintomyia misionensis</i>
Pi_mon	<i>Pintomyia monticola</i>
PIR	Pirenópolis
PIR	Pirenópolis
PNA	Porto Nacional
Pr_cho	<i>Pressatia choti</i>
Pr_sp	<i>Pressatia</i> spp.
<i>Ps.</i>	<i>Psychodopygus</i>
Ps_ayr	<i>Psychodopygus ayrozai</i>
Ps_dav	<i>Psychodopygus davis</i>
Ps_hir	<i>Psychodopygus hirsutus</i>
Ps_mat	<i>Psychodopygus matosi</i>
PS1	provisional species 1
PS2	provisional species 2
PS3	provisional species 3
r	estatística <i>raggedness</i>
RJ	Rio de Janeiro
RN	Rio Grande do Norte
S	species richness
S	south
S	sul
S	número de sítios polimórficos
s.	série
<i>s. l.</i>	<i>sensu lato</i>
S1S	Sobral 1S
S2S	Sobral 2S
SAL	Santa Leopoldina
SAMOVA	Spatial Analyses of Molecular Variance
SAT	Santa Teresa
Sc.	<i>Sciopemyia</i>
Sc_mic	<i>Sciopemyia microps</i>

Sc_sor	<i>Sciopemyia sordellii</i>
Sc_sp	<i>Sciopemyia</i> spp.
SEAMA	Secretaria de Estado do Meio Ambiente e Recursos Hídricos
Sept.	september
SMJ	Santa Maria de Jetibá
Sob	Sobral
SSD	desvio da somados quadrados
T	total
T	Thymine
TER	Teresina
Ter1S	Teresina 1S
Th_via	<i>Trichophoromyia viannamartinsi</i>
TO	Tocantins
VL	Visceral leishmaniasis
VPA	Vila Pavão
W	west
WEG	Wenceslau Guimarães
WHO	World Health Organization
$\theta$	parâmetro neutro
$\pi$	número médio de diferenças par-a-par

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Sistemática de Phlebotominae

Psychodidae é uma das mais antigas famílias da ordem Diptera com os primeiros registros datando da Era Mesozóica (Jurássico ou Triássico) (Ansorge 1994, Blagoderov et al. 2007, Curler & Moulton 2012). Atualmente, é composta de mais de 3000 espécies descritas e está dividida em seis subfamílias: Horaiellinae, Sycoracinae, Trichomyiinae, Bruchomyiinae, Phlebotominae e Psychodinae (Duckhouse 1973, Pape et al. 2011, Curler & Moulton 2012).

Lewis *et al.* (1977) usando dados de publicações antigas e de difícil acesso fizeram uma revisão histórica sobre a taxonomia da família Psychodidae e da subfamília Phlebotominae. De acordo com esses autores, a primeira espécie de flebotomíneo foi descrita como *Bibio papatasi* (Scopoli 1786), mas o autor não colocou a espécie em nenhum grupo supragenérico. Cinco décadas mais tarde, Rondani (1840) criou o nome *Flebotomus* para uma espécie de flebotomíneo e a colocou na tribo Flebotomidae e na família Flebotominae. O nome Flebotomidae foi mudado para Phlebotomidae por Walker (1851). Mais tarde o nome genérico seria mudado de *Flebotomus* para *Phlebotomus* para evitar confusões e promover correções de acordo com o uso das regras do Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN, 1954; Opinion 236: 199). Kertész (1903) se referiu à família como Psychodidae ao invés de Phlebotomidae, e incluiu os gêneros *Phlebotomus* e *Sycorax* na subfamília Phlebotominae. Em 1922, Tonnoir separou *Trichomyia* e *Sycorax* da subfamília Phlebotominae e criou a subfamília Trichomyiinae para eles. Sete anos depois, Alexander (1929) diferenciou Phlebotominae de Bruchomyiinae. Desse período até a década de 1970, surgiram diversas discussões sobre considerar os flebotomíneos como uma família denominada Phlebotomidae ou uma subfamília (Phlebotominae). Dentre os diversos estudos posteriores, destacou-se o publicado por Willi Hennig em 1972. Esse autor utilizou pela primeira vez análise cladística para Psychodidae e concluiu que as relações monofiléticas dos flebotomíneos com outros gêneros próximos não eram certas e tratou Phlebotominae como uma subfamília. Finalmente, Duckhouse (1973) propôs o uso das seis subfamílias (Horaiellinae, Sycoracinae, Trichomyiinae, Bruchomyiinae,

Phlebotominae e Psychodinae) que compõem a família Psychodidae atualmente (Tabela 1.1).

A subfamília Phlebotominae alberga, atualmente, mais de 800 espécies descritas, sendo que aproximadamente 500 espécies são registradas para a região Neotropical. Essa subfamília é reconhecida por abrigar espécies vetores de vírus, de bactérias e de protozoários causadores de doenças humanas como viroses, bartoneloses e leishmanioses (Lainson & Rangel 2003, Ready 2013).

**Tabela 1.1.** Resumo da revisão histórica feita por Lewis *et al.* (1977)

Autor, ano	Nível taxonômico	Contribuição
Scopoli, 1786	Espécie	Descrição da primeira espécie de flebotomíneo
Rondani & Berté, 1840	Gênero	Criou o nome <i>Flebotomus</i>
Rondani, 1840	Família	Criou o nome Flebotomidae
Walker, 1851	Família	Mudou Flebotomidae para Phlebotomidae
Kertész, 1903	Família	Referiu-se a Psychodidae ao invés de Phlebotomidae
Kertész, 1903	Subfamília	Incluiu os gêneros <i>Phlebotomus</i> e <i>Sycorax</i> em Phlebotominae
Tonnoir, 1922	Subfamília	Separou <i>Trichomyia</i> e <i>Sycorax</i> de Phlebotominae e os incluiu em Trichomyiinae
Alexander, 1929	Subfamília	Diferenciou Phlebotominae de Bruchomyiinae
Hennig, 1972	Família	Primeira análise cladística de Psychodidae
Duckhouse, 1973	Família	Propôs o uso de seis subfamílias para Psychodidae

### 1.1.1 Sistemática de Phlebotominae neotropicais

Nas Américas, os estudos de flebotomíneos se iniciaram com a descrição de duas espécies por Coquillet em 1907 (*Flebotomus cruciatus* e *Flebotomus vexator*). França (1920), utilizando fundamentalmente a morfologia da genitália masculina, criou o primeiro subgênero de flebotomíneo para o continente americano, denominado *Lutzia*, para espécie *Phlebotomus longipalpis* (Lutz & Neiva 1912). França (1924) substituiu o nome *Lutzia*, pré-ocupado, por *Lutzomyia*. França & Parrot (1921), utilizando índice alar e características das genitálias masculinas, criaram outro subgênero (*Brumptomyia*) para algumas espécies neotropicais como *Phlebotomus brumpti* Larousse 1920. Diversas outras classificações para a subfamília Phlebotominae, incluindo os flebotomíneos americanos, foram propostas e diferentes gêneros e subgêneros foram criados desde então (Theodor 1948, Fairchild 1955, Barreto 1962, Theodor 1965, Martins & Silva 1965, Hennig 1972, Duckhouse 1973, Young & Fairchild 1974, Lewis *et al.* 1977, Martins *et al.* 1978, Artemiev 1991).

Apesar dos vários estudos sobre a sistemática dessa subfamília, ainda existem controvérsias sobre a classificação dentro da subfamília. Atualmente, duas classificações tem sido as mais utilizadas pelos sistematas que estudam Phlebotominae (ver abaixo). A primeira foi baseada em similaridades de características das asas, das antenas, das espermatecas e dos cibários das fêmeas e das terminálias dos machos e dividiu os flebotomíneos americanos em três gêneros: *Warileyia*, *Brumptomyia* e *Lutzomyia*. De acordo com essa classificação o gênero *Lutzomyia* é subdividido em 15 subgêneros e 11 grupos de espécies conforme seguem abaixo (Lewis *et al.* 1977, Young & Duncan 1994).

Gênero *Warileyia* Hertig, 1948

Subgênero *Warileyia*

Subgênero *Hertigia* Fairchild, 1949

Gênero *Phlebotomus* Rondani & Berté, 1840

Subgênero *Spelaeophlebotomus* Theodor, 1948

Subgênero *Australophlebotomus* Theodor, 1948

Subgênero *Idiophlebotomus* Quate & Fairchild, 1961

Subgênero *Phlebotomus*

Subgênero *Paraphlebotomus* Theodor, 1948  
Subgênero *Synphlebotomus* Theodor, 1948  
Subgênero *Larroussius* Nitzulescu, 1931  
Subgênero *Adlerius* Nitzulescu, 1931  
Subgênero *Euphlebotomus* Theodor, 1948  
Subgênero *Anaphlebotomus* Theodor, 1948  
Uma espécie não agrupada em subgênero

Gênero *Sergentomyia* França & Parrot, 1920

Subgênero *Parvidens* Theodor & Mesghali, 1964

Subgênero *Spelaeomyia* Theodor, 1948

Subgênero *Grassomyia* Theodor, 1958

Subgênero *Sintonius* Nitzulescu, 1931

Séries *clydei*, *hospitii* e *meeseri*

Subgênero *Rondanomyia* Theodor, 1958

Subgênero *Sergentomyia*

Grupos *minuta* e *fallax*

Subgênero *Parrotomyia* Theodor, 1958

Grupo de espécies *nicnic* Theodor, 1948

Espécies não agrupadas em subgêneros: séries *simillina* e outras

Gênero *Brumptomyia* França & Parrot, 1921

Gênero *Lutzomyia* França, 1924

Subgênero *Lutzomyia*

Séries *longipalpis*, *renei* e *cruciata*

Grupo de espécies *gasparviannai*. Young & Fairchild, 1974

Grupo de espécies *migonei*. Theodor, 1965

Séries *migonei*, *evandroi* e *costalimai*

Grupo de espécies *saulensis*

Grupo de espécies *verrucarum*. Theodor, 1965

Séries *verrucarum* e *serrana*

Grupo de espécies *vespertilionis*. Theodor, 1965

Séries *vespertilionis* e *deleoni*

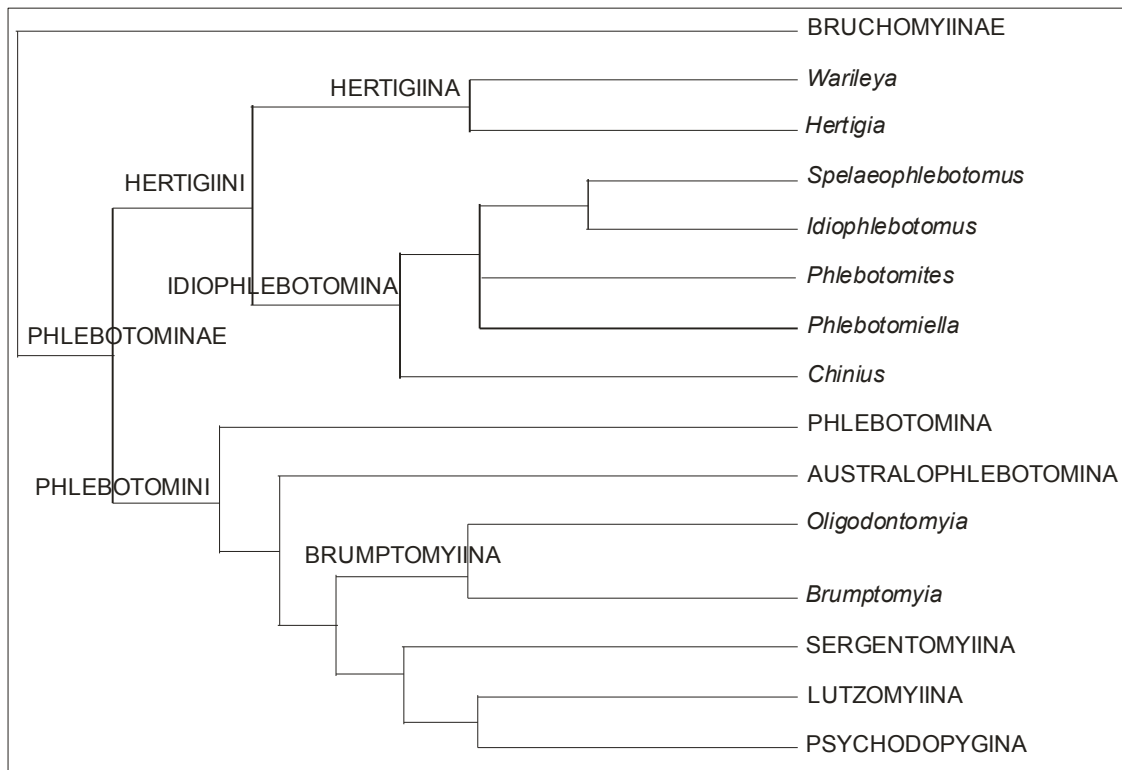
Grupo de espécies *delpozoi*. Young & Fairchild, 1974

Subgênero *Dampfomyia* Addis, 1945  
 Subgênero *Pintomyia* Costa Lima, 1932  
 Subgênero *Pressatia* Mangabeira, 1942  
 Grupo de espécies *baityi*. Theodor, 1965  
 Subgênero *Evandromyia* Mangabeira, 1941  
     Séries *infrapinosa* e *monstruosa*  
 Subgênero *Viannamyia* Mangabeira, 1941  
 Grupo de espécies *rupicola*. Young & Fairchild  
 Grupo de espécies *lanei*. Theodor, 1965  
 Grupo de espécies *shannoni*. Theodor, 1965  
 Grupo de espécies *longispina*. Theodor, 1965  
 Grupo de espécies *aragaoi*. Theodor, 1965  
     Séries *aragaoi* e *brasiliensis*  
 Grupo de espécies *dreisbachi*. Young & Fairchild, 1974  
 Subgênero *Trichophoromyia* Barreto, 1962  
 Subgênero *Nyssomyia* Barretto, 1962  
 Subgênero *Psychodopygus* Mangabeira, 1941  
     Séries *squamiventris* (= série *unisetosa* de Theodor), *panamensis*,  
     *arthuri* e espécies não agrupadas em nenhuma das anteriores  
 Grupo de espécies *vexator*. Theodor, 1965  
     Séries *vexator* e *peruensis*  
 Grupo de espécies *cayennensis*. Theodor, 1965  
     Séries *cayennensis*, *chiapanensis*, *atroclavata* e espécies não  
     agrupadas em nenhuma das anteriores  
 Grupo de espécies *oswaldoi*. Theodor, 1965  
 Grupo de espécies *pilosa*. Theodor, 1965  
 Espécies não agrupadas

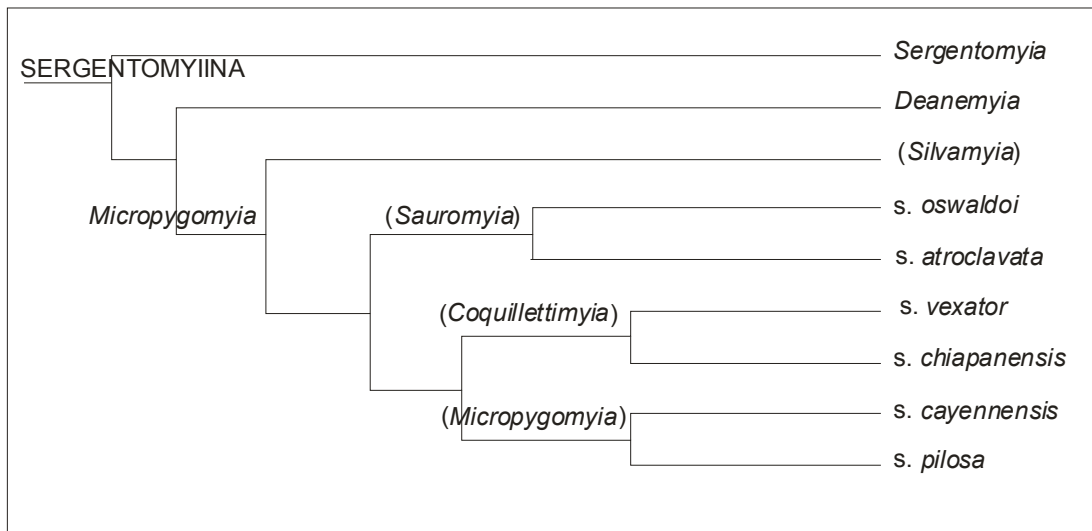
A outra classificação foi baseada na análise cladística de 88 caracteres morfológicos com ênfase nos flebotomíneos americanos e dividiu os flebotomíneos de acordo com as relações monofiléticas (Galati 1995, Galati 2003a). De acordo com essa última, Phlebotominae pode ser dividida em duas tribos: Hertigiini e Phlebotomini. Hertigiini é composta de duas subtribos Hertigiina para a América e Idiophlebotomina para o velho mundo e região Australiana. Phlebotomini é composta de seis subtribos: Phlebotomina, Australophlebotomina, Brumptomyiina,



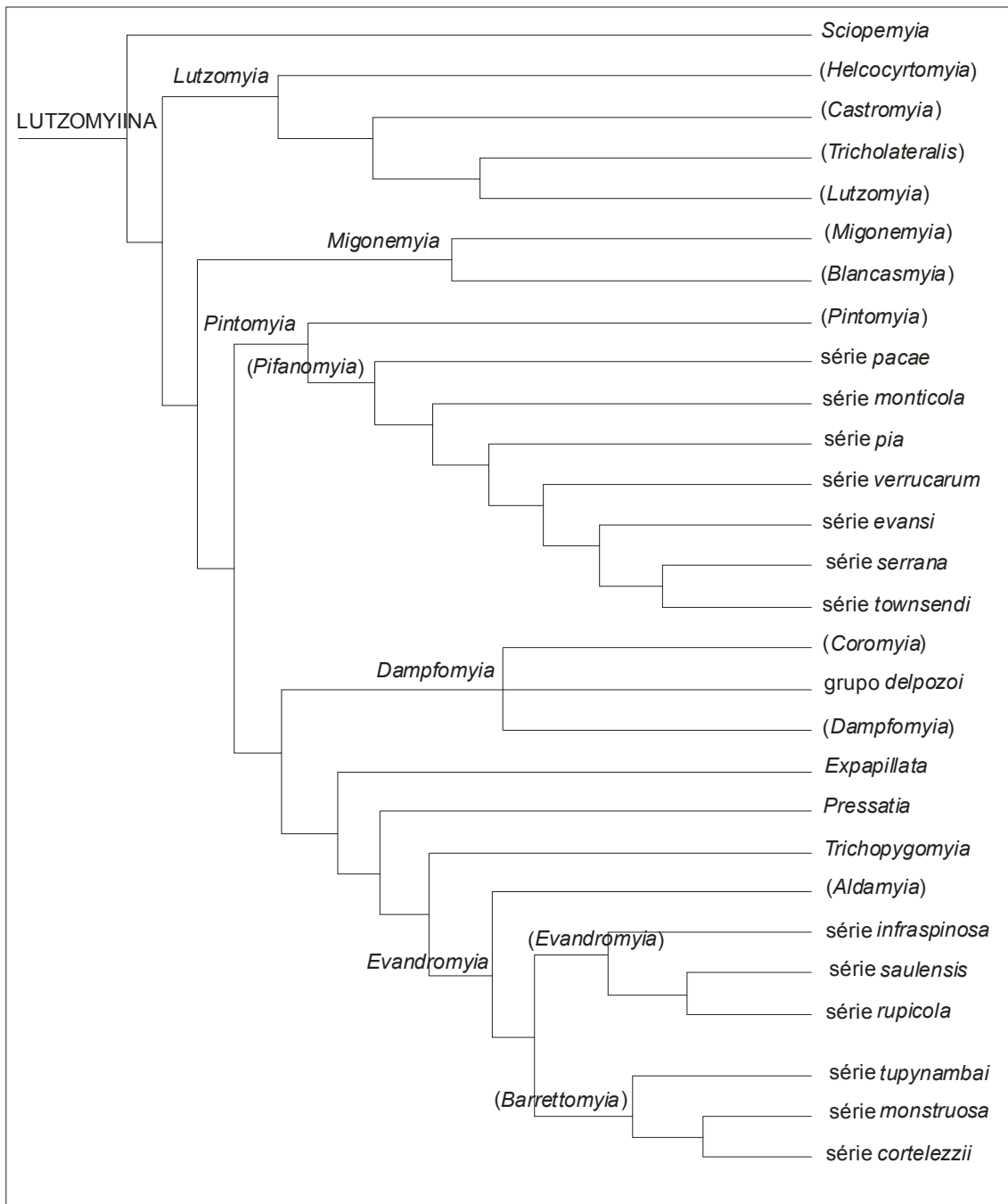
Sergentomyiina, Lutzomyiina e Psychodopygina. As espécies de flebotomíneos neotropicais estão distribuídas entre Brumptomyiina (Figura 1.1), Sergentomyiina (Figura 1.2), Lutzomyiina (Figura 1.3) e Psychodopygina (Figura 1.4). Ainda, o gênero *Edentomyia* Galati et al. 2003 apresenta características impossíveis de agrupar em quaisquer das subtribos propostas por Galati (1995). Ainda que, atualmente, as subtribos propostas por Galati (1995) não agrupem todos os gêneros de flebotomíneos, essa classificação tem sido a mais utilizada por taxonomistas sul-americanos por apresentar a primeira hipótese de relações evolutivas de parentesco e ancestralidade comum entre os táxons.



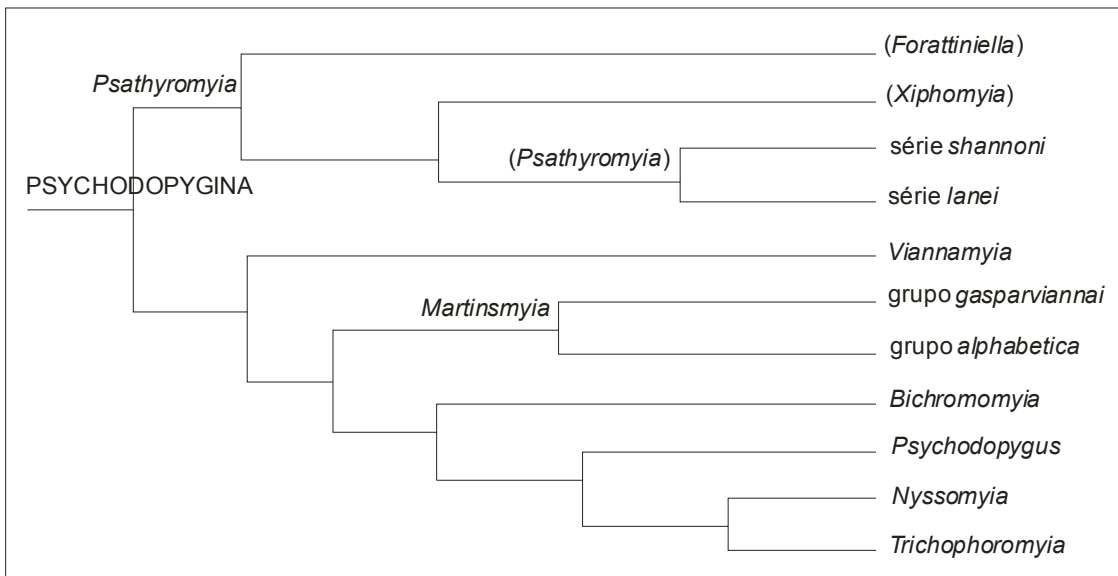
**Figura 1.1** Tribos e subtribos de Phlebotominae: os gêneros foram incluídos para Hertigiini e Brumptomyiina (Modificado a partir de Galati 1995).



**Figura 1.2.** Gêneros, subgêneros, grupos e série de espécies de *Sergentomyia* (Modificado a partir de Galati 1995). (s. = série)



**Figura 1.3.** Gêneros, subgêneros, grupos e séries de espécies de Lutzomyiina (Modificado a partir de Galati 1995).



**Figura 1.4.** Gêneros, subgêneros, grupos e séries de espécies de Psychodopygina (Modificado a partir de Galati 1995).

Mesmo apesar das diferenças quanto ao número de gêneros entre essas classificações, todas duas são similares no fato de que consideram apenas as espécies reconhecidas morfologicamente e consideram apenas caracteres morfológicos para o reconhecimento das mesmas. Assim, complexos de espécies crípticas em processo incipiente de especiação, em que o tempo ainda não foi longo o suficiente para a evolução de características morfológicas diferenciais entre elas, são tratadas como um único táxon. Isso representa uma perda de informação biológica e, conseqüentemente, de conhecimento da biodiversidade. Hebert e colaboradores (2003a) pontuaram outros pontos importantes de limitações na taxonomia exclusivamente morfológica. Primeiro, as plasticidade fenotípica e variabilidade nos caracteres morfológicos empregados para reconhecimento de espécies podem levar a identificações incorretas. Em flebotomíneos, existem casos de anomalias e variações morfológicas que poderiam levar a identificações errôneas (Andrade-Filho *et al.* 2004, Galati *et al.* 2010, Pinto *et al.* 2010b, Sanguinette *et al.* 2013). Por exemplo, variações bilaterais no número de espinhos do gonóstilo já foram registradas para *Micropygomyia schreiberi* (Andrade-Filho *et al.* 2004) e para *Ny. intermedia* (Pinto *et al.* 2010b) e a análise morfométrica de diversos outros caracteres para diferentes indivíduos permitiu aos autores concluir que se tratavam de indivíduos com anomalias ao invés de uma espécie nova com número maior de espinhos. Todavia, em alguns casos anomalias de fato levaram a descrições errôneas (Coutinho & Barretto 1940, Shannon & Del Ponte 1927). Foi

citada na descrição do macho de *Martinsmyia alphabetica* (Coutinho & Barretto 1940) a presença de seis espinhos no gonóstilo. Contudo, mais tarde, foi verificado que os espécimes apresentavam anomalia bilateral no gonóstilo (um espinho a mais de cada lado) e que cinco espinhos no gonóstilo era o número real para a espécie (Barretto 1943). Outra limitação da taxonomia exclusivamente morfológica é que as chaves de identificação morfológica são empregadas apenas para um estágio de vida particular (ovo, larva ou adulto para insetos, por exemplo) ou sexo e muitos indivíduos não podem ser identificados. Em flebotomíneos, por exemplo, na maior parte dos estudos com larvas no Brasil, a identificação só é realizada quando essas se tornam adultos (Vieira *et al.* 2012, Feliciangeli 2004, Casanova *et al.* 2013). Por último, as chaves de identificação morfológica frequentemente demandam alto nível de expertise do taxonomista para evitar identificação errônea. Nesse sentido, o uso de novas ferramentas promissoras para a diagnose da diversidade biológica deve ser incentivado em conjunto com as técnicas já existentes de taxonomia morfológica.

## **1.2. Espécies crípticas em Phlebotominae neotropicais**

Um dos desafios para o aumento do conhecimento e para a descrição da diversidade biológica atual é o reconhecimento de espécies crípticas. Espécies crípticas podem ser definidas como espécies que são morfológicamente indistinguíveis, mas que podem ser distinguidas com técnicas moleculares. Assim, os métodos de identificação usando morfologia subestimam a diversidade por não serem suficientes para discriminar entre essas espécies.

Para flebotomíneos, o complexo *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva 1912) tem sido o grupo de espécies crípticas mais estudado na região Neotropical (Ward *et al.* 1983, 1985, 1986, 1988, Lanzaro *et al.* 1993, Bauzer *et al.* 2002 a,b, Araki & Melim *et al.* 2013). Esse complexo de espécies é dividido atualmente em dois grupos principais: um primeiro grupo, mais homogêneo, composto por uma espécie com som de cópula do tipo *burst* e feromônio do tipo cembreno-1, e um segundo grupo formado por espécies incipientes com diferentes feromônios e combinações de som de cópula do tipo pulsado (Araki *et al.* 2009). Além de *Lu. longipalpis*, a existência de outros complexos de espécies crípticas de flebotomíneos tem sido proposta para a região Neotropical.

*Nyssomyia umbratilis* (Ward & Fraiha 1977), um importante vetor de *Leishmania guyanensis* Floch, 1954, apresentou biologia significativamente distinta

quando foram comparadas populações de diferentes margens do rio Negro, estado do Amazonas, mesmo não apresentando diferenças morfológicas entre elas, o que fortemente indicou a presença de um complexo de espécies crípticas (Justiniano *et al.* 2004). Esse indício foi corroborado por análises moleculares utilizando o gene mitocondrial *citocromo c oxidase subunidade I* (COI). Essas análises genéticas mostraram que populações de diferentes lados do rio Negro formaram dois clados distintos com alta diferenciação genética e sem haplótipos compartilhados entre eles (Scarpassa & Alencar 2012).

Ainda para o gênero *Nyssomyia*, alguns autores tem usado o termo complexo de espécies crípticas para *Nyssomyia neivai* (Pinto 1926) e *Ny. intermedia* (Galati *et al.* 2010d, Godoy *et al.* 2014). Todavia, tanto machos quanto fêmeas dessas espécies podem ser diferenciados morfológicamente (Andrade-Filho *et al.* 2003) e, assim, conceitualmente são um complexo de espécies similares, mas não de espécies crípticas. O mesmo termo, pelos mesmos motivos anteriores, foi erroneamente utilizado para duas espécies do gênero *Lutzomyia*: *Lutzomyia ceferinoi* (Ortiz & Alvarez, 1963) e *Lutzomyia erwindonaldi* (Ortiz, 1978) (Cazorla 2009). Os machos das duas espécies apresentam diferenças morfológicas (Young & Duncan 1994) e as fêmeas também podem ser diferenciadas usando morfometria (Cazorla 2009). Assim, conceitualmente, a presença de espécies crípticas tem sido indicada pelo uso de sistemática molecular, isto é, estudos que empregam técnicas de biologia molecular para fazer inferências populacionais e filogenéticas.

### **1.3. Sistemática molecular de Phlebotominae neotropicais**

Os estudos de sistemática molecular de flebotomíneos da região Neotropical foram, inicialmente, focados no uso de eletroforese de enzimas para caracterizarem variações intraespecíficas ou para estabelecerem relações evolutivas entre diferentes táxons (Lanzaro *et al.* 1993, Dujardin *et al.* 1999). Até o final dos anos 90, devido aos altos custos, os números de populações e de espécies analisados geralmente eram bem reduzidos. Por exemplo, para estudos do complexo de espécies crípticas de *Lu. longipalpis*, ainda controverso naquela época, o número não ultrapassava sete populações (Lanzaro *et al.* 1993, Dujardin *et al.* 1997, Munstermann *et al.* 1998, Mukhopadhyay *et al.* 1998). Para estudos filogenéticos, o número de espécies também era bem reduzido (Dujardin *et al.* 1999). Isso, associado às limitações da técnica da eletroforese de enzimas, como perda de

informação de variação genética devido à redundância do código genético, gerou resultados controversos em relação à existência de um complexo de espécie para *Lu. longipalpis*. Alguns desses apontaram que *Lu. longipalpis* não era um complexo de espécies (Munstermann *et al.* 1998), enquanto outros apontaram a existência do complexo (Lanzaro *et al.* 1998). Os resultados obtidos para os estudos filogenéticos também foram controversos. Por exemplo, os espécimes do gênero *Phlebotomus* Rondani & Berté, 1840 foram mais proximamente relacionados aos do gênero *Lutzomyia* do que os espécimes do gênero *Psychodopygus* Mangabeira, 1941 (Dujardin *et al.* 1999), enquanto o esperado era o contrário (Galati 1995). Isso foi discutido pelos autores que salientaram que tal fato devia ser interpretado com cuidado e poderia ser um viés da análise fenética por eles usada (Dujardin *et al.* 1999).

No final da década de 90 e, principalmente, na primeira parte dos anos 2000, com a evolução das técnicas de biologia molecular, começaram os estudos de sistemática molecular envolvendo sequenciamento de pequenas sequências de DNA para os flebotomíneos neotropicais. Esses estudos podem ser divididos em populacionais e filogenéticos (Marcondes *et al.* 1997, Depaquit *et al.* 1998, Mutebi *et al.* 1998, Aransay *et al.* 2002, Arrivilaga *et al.* 2002, 2003, Bauzer *et al.* 2002a,b, Lins *et al.* 2002, Mazzoni *et al.* 2002).

No que se referem aos estudos populacionais, estes foram focados principalmente nas espécies transmissoras de parasitos causadores de leishmanioses. Para *Lu. longipalpis*, principal vetor de *Le. infantum*, estudos utilizando genes nucleares relacionados aos ritmos circadianos e aos sons de cópula dos machos sedimentaram a hipótese de se tratar de um complexo de espécies (Bauzer *et al.* 2002 a,b). Todavia a existência do complexo para o Brasil ainda era controverso, principalmente pela análise de genes mitocondriais e microssatélites (Arrivilaga *et al.* 2002, 2003, Watts *et al.* 2005). Para os principais vetores de *Leishmania braziliensis* (principal responsável pelas formas cutâneas de leishmanioses no Brasil), como *Ny. intermedia*, *Ny. neivai* e *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939), tanto o gene nuclear *period* (Mazzoni *et al.* 2006) quanto o mitocondrial citocromo *b* (Ready *et al.* 1997, Marcondes *et al.* 1997) salientaram a baixa diferenciação genética e apontaram fortes indícios de introgressão entre essas espécies, o que possivelmente justifica a pequena diferenciação morfológica entre elas (Andrade-Filho *et al.* 2003).

Filogeneticamente, a monofilia dos flebotomíneos neotropicais foi sugerida por meio da análise de sequências de fragmento do domínio D2 do DNA ribossomal para três espécies neotropicais [*Lu. longipalpis*, *Pintomyia youngi* (Feliciangeli & Mutillo, 1985) e *Migonemyia migonei* (França, 1920)] e de seis espécies do velho mundo (Depaquit *et al.* 1998) e da subunidade 18S do DNA ribossomal para exemplares de *Lu. longipalpis* e *Psathyromyia shannoni* (Dyar, 1929) (Aransay *et al.* 2000). Além da monofilia dos flebotomíneos neotropicais, foi sugerido também que o gênero *Sergentomyia* é mais proximamente relacionado aos flebotomíneos neotropicais (Depaquit *et al.* 1998, Aransay *et al.* 2000), o que também foi proposto por filogenia morfológica (Galati 1995). Além desses dois trabalhos pioneiros, três outros encontraram resultados corroborando o proposto pela filogenia morfológica. No primeiro, Lins e colaboradores (2002) estudaram a evolução da região IVS6 do gene *cacophony* para oito espécies de flebotomíneos neotropicais e *Phlebotomus duboscqi* Neveu-Lemaire, 1906 como grupo externo e encontraram resultados em favor da monofilia dos gêneros *Nyssomyia* Barretto, 1962 *sensu* Galati, 1995 [*Ny. intermedia*, *Ny. whitmani* e *Nyssomyia umbratilis* (Ward & Fraiha, 1977)] e *Evandromyia* Mangabeira, 1941 [*Evandromyia lenti* (Mangabeira, 1938) e *Evandromyia evandroi* (Costa Lima & Antunes, 1936)]. Ainda, encontraram evidência de que o grupo migonei proposto por Young & Duncan, 1994 não representa um grupo monofilético (Lins *et al.* 2002). No segundo, Mazzoni e colaboradores (2002) estudaram a evolução do gene *period* para oito espécies e *Ph. duboscqi* como grupo externo e também encontraram evidências em favor da hipótese de monofilia dos gêneros *Nyssomyia sensu* Galati, 1995 e *Lutzomyia sensu* Galati, 1995, embora este com pouco suporte de *bootstrap*. Também encontraram evidência de que o grupo migonei proposto por Young & Duncan, 1994 não representa um grupo monofilético. No terceiro, Torgerson e colaboradores (2003) realizaram uma análise filogenética de 13 espécies de flebotomíneos neotropicais, utilizando sequências do gene mitocondrial citocromo *b*, e também evidenciaram, como proposto pela filogenia morfológica, as monofilias dos gêneros *Nyssomyia* [*Ny. whitmani* e *Nyssomyia hernandezii* (Ortiz, 1965)] e *Pintomyia* Costa Lima, 1932 *sensu* Galati, 1995 [*Pintomyia ovallesi* (Ortiz, 1952) e *Pintomyia townsendi* (Ortiz, 1959)] e do subgênero *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *sensu* Galati, 1995 [*Lu. longipalpis* e *Lutzomyia pseudolongipalpis* (Arrivillaga & Feliciangeli, 2001)]. Também evidenciaram a parafilia do grupo migonei *sensu* Young & Duncan, 1994. O mesmo estudo apresentou resultados controversos utilizando nove *loci* de enzimas, pois espécies



muito similares geneticamente e morfológicamente, como *Lu. longipalpis* e *Lu. pseudolongipalpis*, não foram agrupadas juntas (Torgerson *et al.* 2003). Mesmo com resultados mais robustos e mais congruentes com as análises morfológicas em relação aos estudos envolvendo eletroforese de enzimas, esses primeiros estudos envolvendo sequenciamento de DNA geralmente analisaram poucas populações ou espécies para apenas um *locus*. Isso possivelmente ocorreu devido aos altos custos dos processos de preparação e de sequenciamento das amostras e também pela dificuldade para obter primers funcionando.

A partir de meados dos anos 2000, com o aprimoramento das técnicas de preparação de amostras, como a de clonagem gênica para estudos populacionais, e o barateamento dos processos de sequenciamento das amostras, os estudos de sistemática molecular começaram a avaliar diferentes *loci* e/ou um número maior de populações ou espécies (Beati *et al.* 2004, Mazzoni *et al.* 2008, Araki *et al.* 2009, Lins *et al.* 2012, Araki & Ferreira *et al.* 2013).

Os estudos de genética populacional sedimentaram a hipótese de que *Lu. longipalpis* é um complexo de espécies, inclusive no Brasil (Araki *et al.* 2009, Lins *et al.* 2012, Araki & Ferreira *et al.* 2013). Também demonstraram a ocorrência de introgressão de *Ny. intermedia* para *Ny. whitmani* para três dos dez *loci* analisados para uma área de simpatria dessas duas espécies no sudeste do Brasil (Mazzoni *et al.* 2008).

Filogeneticamente, foram usados fragmentos do gene mitocondrial da subunidade ribossomal menor (12SRNAr) e do gene nuclear da subunidade maior (28SRNAr) para inferir as relações evolutivas entre 32 espécies de flebotomíneos neotropicais (Beati *et al.* 2004). No geral, esse estudo corroborou diversos aspectos da filogenia com base em caracteres morfológicos proposta para os flebotomíneos neotropicais (Galati 1995). Por exemplo, esse estudo evidenciou a monofilia de quatro gêneros *sensu* Galati, 1995: *Nyssomyia*, *Psychodopygus* Mangabeira, 1941, *Trichophoromyia* Barretto, 1962 e *Viannamyia* Mangabeira, 1941. Também evidenciou que a espécie *Bichromomyia flaviscutellata* (Mangabeira, 1942) é mais evolutivamente relacionada ao gênero *Trichophoromyia*, e não é agrupada com os espécimes do gênero *Nyssomyia sensu* Galati, 1995. Isso é diferente do proposto por Young & Duncan, 1994 que em sua classificação coloca essa espécie dentro do subgênero *Nyssomyia*. Ainda, corroborou o fato de que o grupo migonei proposto Young & Duncan (1994) não é um grupo monofilético e, por fim, também corroborou a divisão dos flebotomíneos neotropicais em duas subtribos: *Psychodopygina sensu*

Galati, 1995 e *Lutzomyia sensu Galati, 1995*. Esse estudo realizado por Beati e colaboradores (2004), por outro lado, também teve como objetivo o uso da identificação molecular das espécies de flebotomíneos analisadas utilizando os dois genes (12SRNAr e 28SRNAr). Os espécimes identificados morfológicamente para uma determinada espécie compuseram ramos monofiléticos respectivos à sua espécie, o que permitiu inferir que a identificação molecular poderia se tornar uma ferramenta confiável no auxílio da identificação morfológica de flebotomíneos neotropicais.

Mesmo com os resultados promissores obtidos com genes ribossomais (Beati *et al.* 2004), somente recentemente a ferramenta de identificação molecular de espécies de flebotomíneos neotropicais vem sendo mais utilizada (Azpúrua *et al.* 2010, Gutiérrez *et al.* 2014). Isso se deve principalmente a maior aceitação, por parte dos taxonomistas de diferentes grupos de animais, de um método de identificação molecular baseado na amplificação de um pequeno fragmento do gene mitocondrial *citocromo oxidase c subunidade I*, conhecido como código de barras de DNA (Hebert *et al.* 2003a,b).

### **1.3.1. Sistemática molecular de flebotomíneos: Os códigos de barra de DNA**

O uso dos códigos de barras de DNA tem ganhado grande aceitação por parte de taxonomistas e tem sido empregado para os mais diversos táxons como aves, mamíferos, aracnídeos e insetos, incluindo flebotomíneos (Barret & Hebert 2005, Clare *et al.* 2007, Rivera & Currie 2009, Azpúrua *et al.* 2010, Kumar *et al.* 2012, Gutiérrez *et al.* 2014, Rivera & Currie 2009). Um dos alvos comumente empregados como código de barras de DNA é um pequeno fragmento do gene mitocondrial *citocromo oxidase c subunidade I* (COI), cuja análise, de uma forma geral, permite a discriminação dos seres vivos (Hebert *et al.* 2003a,b).

Para o continente asiático, Kumar e colaboradores (2012) usaram os códigos de barras de DNA, empregando COI, para estudar sete espécies morfológicamente distintas de flebotomíneos da Índia pertencentes a dois gêneros: *Phlebotomus* e *Sergentomyia*. Os resultados obtidos mostraram que o método foi útil para discriminar entre as espécies previamente identificadas morfológicamente. Ainda,

separou os indivíduos de uma das espécies em dois grupos geneticamente distintos, levantando forte indício de que se trata de um complexo de espécies crípticas.

Para o continente americano, Azpurua e colaboradores (2010), em um trabalho sobre infecção de flebotomíneos por bactérias do gênero *Wolbachia* e por protozoários do gênero *Leishmania*, utilizaram o fragmento do gene COI para dar suporte aos dados de identificação morfológica das espécies de flebotomíneos analisadas. Esses autores também destacaram a capacidade da identificação molecular utilizando códigos de barra de DNA de reconhecer 16 das 18 espécies identificadas morfológicamente, assim como sugeriram a existência de espécies crípticas para duas diferentes espécies [*Lutzomyia gomezi* (Nitzulescu, 1931) e *Dampfomyia vespertilionis* (Fairchild & Hertig, 1947)].

Ainda no continente americano, Gutiérrez e colaboradores (2014) também testaram a utilidade dos códigos de barra de DNA para a identificação de flebotomíneos na Colômbia. Esses autores analisaram um total de 148 espécimes pertencentes a 36 espécies identificadas morfológicamente coletadas em diferentes regiões daquele país. Eles seqüenciaram um fragmento de aproximadamente 700 pares de base do gene COI e utilizaram o modelo de Kimura-2-parâmetros (Kimura 1980) para estimar a divergência nucleotídica par-a-par entre os indivíduos. Os resultados mostraram uma baixa divergência intra-específica (variando de 0,00 até 0,06) e uma alta divergência interespecífica (variando de 0,09 até 0,26). Os autores inclusive pontuaram a existência de um intervalo de valores sem sobreposição das divergências intra e interespecíficas conhecido como “*Barcode gap*”, cuja definição é: a divergência entre indivíduos pertencentes à mesma espécie é menor do que a divergência entre indivíduos de diferentes espécies. Esse é um forte critério de delimitação de espécies usando os códigos de barra de DNA. Os autores concluíram que para os flebotomíneos da Colômbia a identificação molecular por meio de códigos de DNA foi útil e reconheceu corretamente as espécies identificadas morfológicamente.

Assim, tanto para o velho mundo quanto para as Américas, a identificação molecular de espécies utilizando os códigos de barra de DNA tem se mostrado útil e capaz de discriminar entre as espécies previamente identificadas morfológicamente e, ainda, em alguns casos descobrindo espécies crípticas entre os táxons analisados (Azpurua *et al.* 2010, Kumar *et al.* 2012, Gutiérrez *et al.* 2014). Ainda assim, não existem estudos testando a utilidade dessa ferramenta para a identificação de espécies brasileiras de flebotomíneos e avaliação de espécies crípticas já relatadas,

como, por exemplo, as do complexo *Lu. longipalpis* (Bauzer *et al.* 2002a,b, Araki *et al.* 2009, 2013, Lins *et al.* 2012).

### 1.3.2 Sistemática molecular de flebotomíneos: O complexo

#### *Lutzomyia longipalpis*

O complexo *Lu. longipalpis* vem sendo amplamente estudado nas Américas nos últimos anos. Os primeiros estudos para testar a hipótese de *Lu. longipalpis* ser um complexo de espécies foram feitos por Ward e colaboradores (1983, 1985, 1986, 1988). Esses autores realizaram cruzamentos entre populações com diferenças no número de pintas (região de adensamento de glândulas produtoras de feromônios de acordo com Spiegel *et al.* 2002) e entre populações com mesmo número de pintas, seguindo uma observação feita por Mangabeira (1969) sobre uma variação fenotípica no número de pintas nos tergitos (uma pinta em algumas populações e duas em outras). Os resultados obtidos por Ward e colaboradores mostraram isolamento reprodutivo entre populações com diferente número de pintas, mesmo para algumas localidades em que essas populações ocorriam em simpatria como em Sobral, estado do Ceará, Brasil. Todavia, os mesmos autores observaram que algumas populações com mesmo número de pintas apresentavam relativo isolamento reprodutivo enquanto outras com número de diferentes não apresentavam. Eles então sugeriram que outros fatores pudessem estar relacionados ao isolamento entre as populações e as pintas não poderiam ser usadas como marcador confiável das diferentes populações.

Considerando a hipótese de *Lu. longipalpis* se tratar de um complexo de espécies, vários estudos foram realizados utilizando marcadores moleculares para testar essa hipótese. Os primeiros estudos foram basicamente focados no perfil eletroforético de isoenzimas. Lanzaro e colaboradores (1993), além de hibridização entre as populações, realizaram também a análise de 27 *loci* de isoenzimas para três colônias de *L. longipalpis* sendo uma do Brasil (Belo Horizonte, Minas Gerais), uma da Colômbia e uma da Costa Rica. As hibridizações entre as populações resultaram em machos inférteis. Dos *loci* estudados, onze foram monomórficos e os 16 restantes polimórficos. Os autores encontraram uma alta estruturação genética entre as populações e destacaram que cada um dos 16 *loci* polimórficos apresentou pelo menos um alelo exclusivo de uma das três populações. Ainda, encontraram

uma elevada divergência genética, cuja comparação com as divergências genéticas entre espécies próximas de flebotomíneos permitiu aos autores concluir que *Lu. longipalpis* era um complexo de espécies. Munstermann e colaboradores (1998) também utilizaram isoenzimas para estudar populações de *Lu. longipalpis* da Colômbia. Foram analisados 15 *loci* de isoenzimas para cinco populações colombianas de *Lu. longipalpis*. Apenas três *loci* foram monomórficos para todas as populações. Os autores estimaram a divergência genética com base na distância genética e observaram baixo grau de estruturação entre as populações. Também estimaram os valores dos Índices de Fixação ( $F_{ST}$ ) cujos resultados indicaram alto fluxo gênico entre as populações. O Índice de Fixação é uma medida de diferenciação populacional devido a estruturação genética e é baseado na variância das frequências alélicas entre populações e na probabilidade de identidade por descendência. Assim, o conjunto indicou que as cinco populações pertenciam ao mesmo táxon e não evidenciou a presença de mais de uma espécie na Colômbia. Mukhopadhyay e colaboradores (1998) estudaram as frequências de alelos eletroforéticos de 15 *loci* de isoenzimas para sete populações brasileiras de *Lu. longipalpis*. Os resultados indicaram, em geral, baixa divergência genética entre as populações, embora as populações de Lapinha (Minas Gerais) e de Jacobina (Bahia), mais interiores do continente, demonstrassem divergência genética um pouco maior em relação às populações da região amazônica e da região costeira do nordeste brasileira. Os autores, então, concluíram que *Lu. longipalpis* no Brasil se tratava de uma única espécie, mas geneticamente heterogênea e muito polimórfica. Assim, os estudos usando isoenzimas foram controversos sobre a existência de um complexo de espécies de *Lu. longipalpis*. Embora com forte suporte para a existência do complexo para as Américas (Lanzaro *et al.* 1993, 1998), alguns autores ainda discutiram que as diferenças entre as populações americanas poderiam ser artefatos devido aos efeitos de colonização e de distância geográfica entre elas (Munstermann *et al.* 1998, Mukhopadhyay *et al.* 1998).

No início dos anos 2000, como os estudos com isoenzimas não eram conclusivos sobre a existência de um complexo de *Lu. longipalpis* no Brasil e o sequenciamento de pequenos fragmentos de DNA se tornou mais acessível, iniciaram-se os estudos utilizando sequências nucleotídicas de fragmentos de diferentes genes. Esses estudos podem ser classificados em dois grupos principais: 1) aqueles que empregaram fragmentos de genes mitocondriais e 2) aqueles que usaram fragmentos de genes nucleares. Como exemplos do primeiro grupo se

destacam os trabalhos realizados por Arrivillaga e colaboradores (2002) utilizando fragmento do gene COI e por Arrivillaga e colaboradores (2003) utilizando fragmentos dos genes COI, 12S do RNA ribossomal e 16S do RNA ribossomal. Os resultados de ambos apontaram para a presença de um complexo de espécies de *Lu. longipalpis* através de sua distribuição nas Américas, mas apenas uma espécie no Brasil, considerando a amostragem analisada. Hodgkinson e colaboradores (2003) usaram fragmento do gene citocromo b e os resultados também apontaram para a presença de apenas uma única espécie. Diferentemente, os trabalhos envolvendo os genes nucleares como *period* (Bauzer *et al.* 2002 a,b) e *cacophony* (Bottecchia *et al.* 2004) apontavam a presença de um complexo de espécies de *Lu. longipalpis* no Brasil. Esses últimos, concomitantemente, foram sendo corroborados pelas análises dos sons dos machos durante a cópula (Souza *et al.* 2002, 2004) e pelas análises dos feromônios sexuais dos machos (Hamilton *et al.* 2004, 2005). Outros trabalhos usando diferentes abordagens podem ser encontrados em uma revisão detalhada e cronológica feita por Bauzer e colaboradores (2007) sobre a presença de um complexo ou uma única espécie de *Lu. longipalpis* no Brasil.

Recentemente, os estudos sobre as populações do complexo *Lu. longipalpis* tem usado abordagens integrativas e analisado conjuntamente aspectos relacionados aos polimorfismos de diferentes genes, aos sons produzidos pelos machos durante a cópula e aos feromônios sexuais (Araki *et al.* 2009, 2013, Lins *et al.* 2012). Esses estudos, conjuntamente, corroboraram os estudos pioneiros que apontavam a presença de mais de uma espécie de *L. longipalpis* no Brasil. Araki e colaboradores (2009), por exemplo, usando o gene *period*, sons de cópula e feromônios dos machos, propuseram a existência de dois grupos principais para o complexo *Lu. longipalpis* no Brasil. Um primeiro composto de uma única espécie com os machos produzindo sons de cópula do tipo *burst* e feromônio do tipo cembreno-1, e um segundo grupo mais heterogêneo e, possivelmente, representando um número de espécies incipientes produzindo diferentes combinações de sons de cópula do tipo pulsado e feromônios. Lins e colaboradores (2012), no mesmo sentido, usando o gene *paralytic* encontraram diferenças fixas entre as populações com som do tipo *burst* e com sons do tipo pulsado. Todavia, a análise do gene *paralytic* não discriminou bem entre as espécies com sons do tipo pulsado como a do gene *period*. Assim, o gene *period* tem sido a primeira escolha nos estudos que envolvem populações de *Lu. longipalpis* com diferentes tipos de sons de cópula.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Testar diferentes abordagens de identificação, utilizando meios clássicos e moleculares, de espécies de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) neotropicais com ênfase nas espécies que ocorrem no Brasil.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Identificar morfologicamente diferentes espécies de flebotomíneos que ocorrem no Brasil.

- Identificar molecularmente diferentes espécies de flebotomíneos previamente identificadas morfologicamente que ocorrem no Brasil usando um fragmento do gene mitocondrial *citocromo oxidase c subunidade I* (código de barras de DNA).

- Comparar os dados obtidos com os métodos de identificação morfológica e de identificação molecular.

- Utilizar o gene *period* para identificação de espécies em que os códigos de barra de DNA não foram eficientes para este fim.

### 3. CAPÍTULO 1

#### **Aspectos ecológicos e epidemiológicos da fauna de flebotomíneos do Monumento Natural dos Pontões Capixabas, estado do Espírito Santo, Sudeste do Brasil.**

Nesse estudo foram identificadas, com base em caracteres morfológicos, diferentes espécies de flebotomíneos coletados em uma área geográfica no estado do Espírito Santo. Destacam-se a presença de vetores de *Leishmania* como *Nyssomyia intermedia* e *Lutzomyia longipalpis*. Ainda, o estudo mostra a insuficiência dos caracteres morfológicos para discriminar entre fêmeas de espécies de alguns gêneros como *Brumptomyia*, *Evandromyia*, e *Pressatia*.

#### **Referência bibliográfica:**

Ferreira AL, Falqueto A, Grimaldi Jr G, Peixoto AA, **Pinto IS** (2013) Ecological and Epidemiological Aspects of the Sand Fly (Diptera, Psychodidae) Fauna of the National Monument of Pontões Capixabas, State of Espírito Santo, Southeastern Brazil. *Journal of Medical Entomology* 50(6): 1215-1223.



## Ecological and Epidemiological Aspects of the Sand Fly (Diptera, Psychodidae) Fauna of the National Monument of Pontões Capixabas, State of Espírito Santo, Southeastern Brazil

ADELSON L. FERREIRA,<sup>1</sup> ALOISIO FALQUETO,<sup>1</sup> GABRIEL GRIMALDI, JR.,<sup>2</sup>  
ALEXANDRE A. PEIXOTO,<sup>3,4</sup> AND ISRAEL DE S. PINTO<sup>1,3,5</sup>

J. Med. Entomol. 50(6): 1215–1223 (2013); DOI: <http://dx.doi.org/10.1603/ME13037>

**ABSTRACT** We evaluated the ecological and epidemiological aspects of the sand fly fauna in an area of the Atlantic Forest biome with records of visceral and cutaneous leishmaniasis. Sand fly collections at three different localities at the National Monument of Pontões Capixabas, State of Espírito Santo, Southeastern Brazil, were conducted by using two Centers of Disease Control and Prevention automatic light traps in the peridomestic environment and eight Centers of Disease Control and Prevention automatic light traps in the forested environment. Collections occurred during four consecutive nights within each of the months and locations: São Luiz (December 2009, May 2010, July 2010, and December 2010), Córrego Palmital de Baixo (September 2010 and October 2010), and Córrego São Bento (February 2011 and May 2011). We collected 21,138 sand flies belonging to 31 species and 14 genera. Of this total, 12,412 sand flies were captured in the peridomestic environment and 8,726 in the forested environment. All of the vector species, *Lutzomyia longipalpis* (= *Lutzomyia longipalpis*, sensu; Young and Duncan), *Migonemyia migonei* (= *Lutzomyia migonei*, sensu; Young and Duncan), and *Nyssomyia intermedia* (= *Lutzomyia intermedia*, sensu; Young and Duncan), occurred in significantly higher numbers in the peridomestic environment than compared with the forested environment. Our results highlight the importance of conservation in the forest remains of the National Monument of Pontões Capixabas, because of higher species richness and diversity. Furthermore, they indicate the epidemiological role of *Lu. longipalpis* as the vector of *Leishmania infantum* within the study area, and the no evident role of *Mg. migonei*.

**KEY WORDS** Phlebotominae, Atlantic forest, *Lutzomyia longipalpis*

The Atlantic Forest is a major biodiversity hotspot, and one of the most fragmented and damaged forests in the world. Currently, the Atlantic Forest covers only 7% of its original area. Despite these disturbances, the Atlantic Forest remains extremely rich in biodiversity, sheltered in several conservation units along the Brazilian coast, with high endemism levels of tetrapods, avian species, insects, and other animals (Instituto de Pesquisas da Mata Atlântica [IPEMA] 2005, Mittermeier et al. 1998, Myers et al. 2000). The sympatric occurrence of animals acting as reservoirs and insects acting as vectors is a favorable scenario for the occurrence of vector-borne diseases such as yellow fever, malaria, and leishmaniasis.

Human leishmaniasis is a spectral disease (ranging from self-limiting cutaneous infections to more serious progressive mucocutaneous and visceral forms) caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania* (Ross, 1903). The ecological system in which a *Leishmania* species is maintained in nature is usually composed of a single or a small number of phlebotomine sand flies (which serve as arthropod vectors) and a few vertebrate wild or domestic animals of several different mammalian orders (that serve as reservoir hosts; Peters and Killick-Kendrick 1987). The parasite is transmitted from animals to sand flies, and then from the insects to humans.

Cutaneous leishmaniasis (CL) caused by *Leishmania braziliensis* (Vianna, 1911) occurs throughout the distribution of the species in the Atlantic Forest region of the Espírito Santo state. The parasite is usually transmitted by *Nyssomyia intermedia* (Lutz and Neiva, 1912; = *Lutzomyia intermedia*, sensu; Young and Duncan, 1994), but other sand fly species such as *Nyssomyia neivai* (Pinto 1926; = *Lutzomyia neivai*, sensu; Young and Duncan, 1994), *Nyssomyia whitmani* (Antunes and Coutinho, 1939; = *Lutzomyia whitmani*, sensu; Young and Duncan, 1994), and *Migonemyia*

<sup>1</sup> Departamento de Patologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Ave. Marechal Campos 1468, 29043900 Vitória, Espírito Santo, Brazil.

<sup>2</sup> Laboratório de Patologia e Biointervenção, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Fiocruz, Rua Waldemar Falcão 121, 40296710 Salvador, Bahia, Brazil.

<sup>3</sup> Laboratório de Biologia Molecular de Insetos, Instituto Oswaldo Cruz, Ave. Brasil 4365, 21040360 Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>4</sup> In memoriam.

<sup>5</sup> Corresponding author, e-mail: [pintoisrael@gmail.com](mailto:pintoisrael@gmail.com).

*migonei* (França, 1920; =*Lutzomyia migonei*, sensu; Young and Duncan, 1994) may be involved in some transmission cycles (Azevedo et al. 1990a,b; Ferreira et al. 2001; Lainson and Shaw 1998; Lutz et al. 2000; Rangel and Lainson 2003; Pita-Pereira et al. 2005, 2009). Visceral leishmaniasis (VL) resulting from zoonotic transmission of *Leishmania infantum* (Nicolle, 1908) is also found in some northern areas of the Atlantic Forest biome of the State of Espírito Santo, and it seems to be transmitted by *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva, 1912; =*Lutzomyia longipalpis*, sensu; Young and Duncan, 1994; Pinto et al. 2012a). The habit of keeping dogs and other domestic animals inside the house is thought to promote human infection, because dogs are peridomestic hosts of the parasite and attract phlebotomine sand flies, especially *Lu. longipalpis*. The population density of *Lu. longipalpis* can reach very high levels inside houses and in peridomestic settings (Deane 1956, Deane and Deane 1962, Lainson and Shaw 1998, Rangel and Lainson 2003). Molecular studies focusing on VL have shown that other sand fly species such as *Mg. migonei* (Carvalho et al. 2010) and *Lutzomyia almerioi* (Galati and Nunes, 1999; =*Lutzomyia almerioi*, sensu; Young and Duncan, 1994; Savani et al. 2009) can be naturally infected by the *Leishmania* parasite and can be acting as secondary vectors.

The predominant source of periodic fluctuations in the incidence of leishmaniasis is considered linked to the abundance of sand flies. To enable accurate timing of control measures, further studies on the dynamics of sand fly species vectors are required (World Health Organization [WHO] Expert Committee 2010). In the current study, we therefore evaluated the ecological and epidemiological aspects of the sand fly fauna of the National Monument of Pontões Capixabas (NMPC), State of Espírito Santo, Brazil. Our objectives were: 1) to assess the abundance and diversity of sand flies across the Atlantic Forest biome, 2) to investigate the population dynamics of potential vectors in peridomestic and forested environments within the NMPC, and 3) to identify the putative vectors of leishmaniasis within the study area.

#### Materials and Methods

**Study Area.** In Brazil, the "National Monument" category is applied to conservation units where the human population can live inside the geographical boundaries without expropriation of the land. Currently, ≈400 families live inside the boundaries of the NMPC. The NMPC is situated in the central region of the Atlantic Forest, above the Doce River, and covers an area of ≈174.96 km<sup>2</sup>, including several Atlantic Forest remains and, predominantly, areas of farming and livestock. The NMPC is divided into two distinct areas: one belonging to the municipality of Pancas, and the other to the municipality of Águia Branca. Both of these areas are situated in the northwestern portion of the State of Espírito Santo, southeastern Brazil. The Brazilian name "Pontões" refers to the rocky outcrops that are very common along the NMPC, and are the

main characteristic of the region's landscape. The Köppen-Geiger climate classification defines the NMPC as tropical monsoon (Peel et al. 2007), with low elevations (<500 m [a.s.l.]), low annual rainfall (<1,000 mm; with the wet season from November to April and the dry season from May to October), and no marine influence (Feitoza 1986, Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Recursos Hídricos [SEAMA] 2008).

The portion of the NMPC belonging to the municipality of Pancas is an endemic area of VL and CL. Based on the occurrence of leishmaniasis, we conducted sand fly captures in three selected localities (Fig. 1). The first locality, Córrego São Luiz (19° 10' 25" S; 40° 51' 08" W), has recent records of VL and ancient records of CL. The second locality, Córrego Palmital de Baixo (19° 12' 47" S; 40° 47' 20" W), has records of VL 10 yr ago (2003), but no recent records of VL, and no records of CL. The third locality, Córrego São Bento (19° 13' 44" S; 40° 45' 31" W), has ancient records of CL, but no records of VL.

**Sand Fly Collection Methods.** In each locality, we conducted at least two sand fly captures as follows: São Luiz (December 2009, May 2010, July 2010, and December 2010), Córrego Palmital de Baixo (September 2010 and October 2010), and Córrego São Bento (February 2011 and May 2011). We used two Centers of Disease Control and Prevention automatic light traps in the peridomestic environment and eight Centers of Disease Control and Prevention automatic light traps in the forested environment, during four consecutive nights within each of the months listed earlier. Ten light traps were used for each night. In the peridomestic environment, the traps were placed close to domestic animal shelters. In the forest environment, the traps were placed randomly, at a distance of 30 m from each other and at least 50 m from the forest edge. The traps remained in operation throughout the night (1800–0600 hours). In total, 768 collection hours were amassed in the peridomestic environment, and 3,072 collection hours in the forest environment. A small container (220 ml) with 80% ethanol was connected to the trap to store insects after the capture, instead of the meshed cages provided by the manufacturer. At the end of each night, we removed the containers, filled them with 80% ethanol, and transported them to the Laboratory of Parasitology, Universidade Federal do Espírito Santo. The sand flies were screened and mounted on glass slides, according to the technique proposed by Barreto and Coutinho (1940). We identified sand flies based on morphological characters (Galati 2003a), following the phylogenetic classification of Galati (1995, 2003b) and the generic name abbreviations of Marcondes (2007). Because the phylogenetic classification of Galati (1995, 2003b) still remains controversial outside of Brazil, we used the classification of Young and Duncan (1994) in parentheses after the species' name and author. Sand fly vouchers were deposited in the Phlebotomine Collection of the Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, municipality of Belo Horizonte, State of Minas Gerais.

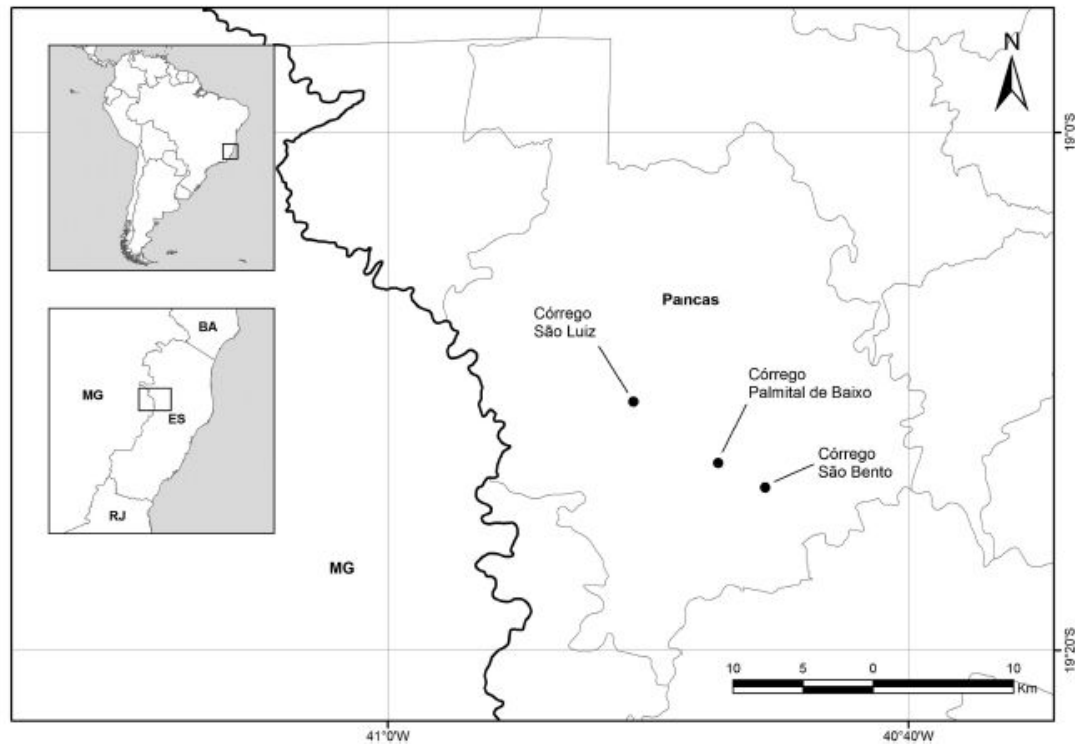


Fig. 1. Map showing collecting localities of sand flies at the National Monument of Pontões Capixabas, municipality of Pancas, State of Espírito Santo, southeastern of Brazil.

**Statistical Analyses.** We used the program PAST (Hammer et al. 2001) to calculate the species richness (S), and the equitability (J) and Shannon diversity (H) indices.

### Results

We collected 21,138 sand flies belonging to 31 species and 14 genera ( $J = 0.54$ ,  $H = 1.86$ ). Of this total, 12,412 sand flies were captured in the peridomiciliary environment ( $S = 19$ ,  $J = 0.48$ ,  $H = 1.42$ ) and 8,726 in the forested environment ( $S = 30$ ,  $J = 0.59$ ,  $H = 2.03$ ). We excluded sand flies belonging to *Brumptomyia* spp. (= *Brumptomyia* spp., *sensu*; Young and Duncan, 1994), *Evandromyia* spp. (= *Lutzomyia* spp., *sensu*; Young and Duncan, 1994), and *Pressatia* spp. (= *Lutzomyia* (*Pressatia*) spp., *sensu*; Young and Duncan, 1994) from our analysis of equitability and diversity. In decreasing order, the three most captured species were *Mg. migonei*, *Pressatia choti* (Floch and Abonnenc, 1941; = *Lutzomyia choti*, *sensu*; Young and Duncan, 1994), and *Lu. longipalpis* in the peridomiciliary environment, and *Pr. choti*, *Micropygomyia ferreirana* (Barretto, Martins and Pellegrino, 1956; = *Lutzomyia ferreirana*, *sensu*; Young and Duncan, 1994), and *Mg. migonei* in the forested environment. We collected no specimens of *Lu. longipalpis* in the locality of Córrego Palmital de Baixo, and only a single specimen in the locality of Córrego São Bento (captured in the for-

ested environment). The species *Mg. migonei* and *Ny. intermedia* were collected in both kinds of environment, and in all three localities. The sand fly species *Evandromyia termitophila* (Martins, Falcão and Silva, 1964; = *Lutzomyia termitophila*, *sensu*; Young and Duncan, 1994) was captured only in the peridomiciliary environment. *Brumptomyia avellari* (Costa Lima, 1942; = *Brumptomyia avellari*, *sensu*; Young and Duncan, 1994), *Brumptomyia figueiredoi* (Mangabeira and Sherlock, 1961; = *Brumptomyia figueiredoi*, *sensu*; Young and Duncan, 1994), *Evandromyia sallesi* (Calvão and Coutinho, 1939; = *Lutzomyia sallesi*, *sensu*; Young and Duncan, 1994), *Evandromyia sericea* (Floch and Abonnenc, 1944; = *Lutzomyia sericea*, *sensu*; Young and Duncan, 1994), *Martinsmyia gasparviannai* (Martins, Godoy and Silva, 1962; = *Lutzomyia gasparviannai*, *sensu*; Young and Duncan, 1994), *Micropygomyia capixaba* (Dias, Falcão, Silva and Martins, 1987; = *Lutzomyia capixaba*, *sensu*; Young and Duncan, 1994), *Pintomyia mamedei* (Oliveira, Afonso, Dias and Brazil, 1994; = *Lutzomyia mamedei*, *sensu*; Young and Duncan, 1994), *Psathyromyia lutziana* (Costa Lima, 1932; = *Lutzomyia lutziana*, *sensu*; Young and Duncan, 1994), *Psathyromyia pascalei* (Coutinho and Barretto, 1940; = *Lutzomyia pascalei*, *sensu*; Young and Duncan, 1994), *Psychodopygus hirsutus* (Mangabeira, 1942; = *Lutzomyia hirsuta*, *sensu*; Young and Duncan, 1994), *Sciopomyia microps* (Mangabeira, 1942; = *Lutzomyia microps*, *sensu*; Young

and Duncan, 1994), and *Trichopygomyia longispina* (Mangabeira, 1942; =*Lutzomyia longispina*, sensu; Young and Duncan, 1994) were captured only in the forested environment. We recorded the presence of *Pi. mamedei* in the State of Espírito Santo for the first time.

Tables 1 and 2 show the numbers of sand fly specimens, according to species and sex, captured during each collection month and in each one of the three localities, from the peridomiciliary environment and the forested environment. The tables also show the sex ratio, species richness, and equitability and Shannon diversity indices for each collection month. The ratio of males to females was at least two times higher in the peridomiciliary environment than in the forested environment. The success rates of capture were 16.16 sand flies per hour per trap from the peridomiciliary environment and 2.84 sand flies per hour per trap from the forested environment.

### Discussion

In the current study, the species richness recorded in the peridomiciliary environment (i.e., the least conserved area) of the NMPC was in accordance with those of previous observations in the peridomiciliary environment of the Atlantic Forest, State of Espírito Santo (Pinto et al. 2010a, 2012a; Virgens et al. 2008). However, when we included in our analyses, specimens captured in the forested environment (i.e., the most conserved area) of the NMPC, the species richness increased significantly. In this regard, our results are in agreement with those of Bock et al. (2007), who demonstrated that correlations between species richness, evenness, and abundance for certain animals and plants supported the validity of species richness as an indicator of overall conservation value of an area (i.e., places with particular conservation value should include those with high species richness, but also those where desirable, e.g., generally rare or threatened, species or groups of species are especially abundant).

The high value of species richness found in the NMPC is also in accordance with those of previous studies that have identified the Central Corridor Region of the Atlantic Forest as a major biodiversity hotspot of the world (Orme et al. 2005). Carnaval et al. (2009) further recognized the Central Corridor Region as a hotspot within the Atlantic Forest hotspot, and a refuge for biodiversity during the climatic extremes of the Late Pleistocene. Based on species richness alone, our data also suggest the Central Corridor Region as a biodiversity hotspot within the Atlantic Forest, because the overall species richness of the NMPC was considerably higher than that of the south region (São Paulo refugium; Galati et al. 2010a,b; Marccondes et al. 2001), and that of the north region (Pernambuco refugium; Andrade et al. 2005; Cortez et al. 2007; Guimarães et al. 2012), of the Atlantic Forest. Considering only the Atlantic Forest within the State of Espírito Santo, the species richness was also the highest recorded (Pinto et al. 2010b, 2012b). It is possible that the high sand fly species richness in the

central region of the Atlantic Forest is associated with the high diversity of vertebrates in the area (Costa et al. 2000, Myers et al. 2000, Pinto et al. 2009, Tonini et al. 2010), because many sand fly species show some species-specific preference for the host that provides them with a bloodmeal (Falqueto 1995).

Many previous studies have used species richness as the sole measure of diversity (Harper and Hawksworth 1994, Ricklefs and Schluter 1993). However, other studies have indicated that diversity can change with ecological processes such as competition, predation, and succession. Each of these processes alters the diversity through changes in evenness, without any change in species richness (Stirling and Wilsey 2001, Wilsey and Potvin 2000). In the current study, we therefore also evaluated the Shannon diversity index, which provides diversity information that unites species richness and relative species abundance. In addition, we calculated the Shannon diversity index for previous studies that had not considered species diversity to conduct the comparisons between different areas. In contrast to species richness, we detected no relationship between a high Shannon diversity and hotspots within the Atlantic Forest biome, because of variations in evenness. Nevertheless, the presence of rare species (e.g., *Ev. sericea*, *Pi. mamedei*, and *Mt. gasparviannai*) highlights the conservation value of the NMPC, because rare species can be used as indicator groups for conservation planning (Lawler et al. 2003). We further revealed that, similar to species richness, sand fly diversity in forested environments is clearly higher than that in peridomiciliary areas, even within the same study area (Galati et al. 2010a,b; Pinto et al. 2012a,b).

Our present data therefore indirectly support the hypothesis that high species richness and diversity of sand flies may be associated with high genetic diversity of *Leishmania* parasites. Souza-Rocha et al. (2010) studied natural infection by *Leishmania* in sand fly species collected in the State of Espírito Santo and observed a relationship between high species richness of sand flies and high genetic diversity of *Leishmania* parasites. In addition, Cupollilo et al. (2003) studied the genetic diversity of *Leishmania braziliensis* from different regions of Brazil and observed that parasites isolated from the State of Espírito Santo belonged to two distinct groups: 1) isolates from urban areas clustered with isolates from the State of Rio de Janeiro (lower genetic diversity), and 2) isolates from rural areas clustered with isolates from the State of Pernambuco (higher genetic diversity). The first group is composed of parasites isolated from the municipality of Viana and neighboring municipalities, and the second group consists of parasites isolated from municipalities bordering the NMPC. Indirectly, our data support this hypothesis because the values of species richness and diversity of sand flies that we recorded from the NMPC (second group) were higher than the values recorded from Viana and neighboring municipalities (first group; Barros et al. 1985, Pinto et al. 2010b).

Table 1. Sand flies species collected in peridomestic (P) and forest (F) environments from the localities of Córrego São Luiz, National Monument of Pontões Capixabas, municipality of Pancas, State of Espírito Santo, southeastern of Brazil

Species	Córrego So Luiz											
	2009			2010			2010			Total		
	Dec.	May	Dec.	July	Dec.	May	July	Dec.	P	F	T	
<i>Brumptomyia figuradoti</i> (= <i>Brumptomyia figuradoti</i> )	1/											3/
<i>Brumptomyia nitidulacut</i> (= <i>Brumptomyia nitidulacut</i> )	14/	1/										18/
<i>Brumptomyia</i> spp. (= <i>Brumptomyia</i> spp.)	1/15	5/										33/
<i>Evandromyia callipyga</i> (= <i>Lutzomyia callipyga</i> )	1/											1/
<i>Evandromyia educarda</i> (= <i>Lutzomyia educarda</i> )	3/											1/
<i>Evandromyia lenti</i> (= <i>Lutzomyia lenti</i> )	1/											1/
<i>Evandromyia</i> spp. (= <i>Lutzomyia</i> spp.)	85/	12/		4/	53/							154/
<i>Evandromyia tropycaenoides</i> (= <i>Lutzomyia tropycaenoides</i> )	9/	2/		3/	12/				1/			26/
<i>Exopallata firmata</i> (= <i>Lutzomyia firmata</i> )		2/			3/							7/
<i>Lutzomyia alencari</i> (= <i>Lutzomyia alencari</i> )	1/				1/				1/			1/
<i>Lutzomyia longipalpis</i> (= <i>Lutzomyia longipalpis</i> )	177/14	1/3		3/3	1/3				1,143/169			2/3
<i>Microgomyia capixaba</i> (= <i>Lutzomyia capixaba</i> )	5/11	3/15							29/45			74
<i>Microgomyia ferrirana</i> (= <i>Lutzomyia ferrirana</i> )	88/84	3/		1/	1/4				2/3			218/226
<i>Microgomyia quinquifer</i> (= <i>Lutzomyia quinquifer</i> )	8/13	1/4							2/			9/17
<i>Microgomyia schreibleri</i> (= <i>Lutzomyia schreibleri</i> )	9/4	30/17		1/1	1/1				2/3			45/35
<i>Migomyia migonei</i> (= <i>Lutzomyia migonei</i> )	190/73	3/8		17/5	1/2				37/18			218/122
<i>Ngomyia intermedia</i> (= <i>Lutzomyia intermedia</i> )	2/1	16/1		38/2	5/5				61/9			1/1
<i>Ritomyia fischeri</i> (= <i>Lutzomyia fischeri</i> )	82/76	9/4		17/3	7/3				26/10			103/115
<i>Ritomyia monticola</i> (= <i>Lutzomyia monticola</i> )	2/8			2/	2/				2/			2/16
<i>Pressatia dooti</i> (= <i>Lutzomyia dooti</i> )	11/	4/			1/				11/			297/
<i>Pressatia equatorialis</i> (= <i>Lutzomyia equatorialis</i> )	1/								1/			11/
<i>Pressatia</i> spp. (= <i>Lutzomyia</i> spp.)	3/								1/			11/
<i>Psathyromyia lutziana</i> (= <i>Lutzomyia lutziana</i> )	2/								7/4			336/
<i>Psathyromyia pascalei</i> (= <i>Lutzomyia pascalei</i> )	2/								1/1			1/1
<i>Psychodopygus hirsutus</i> (= <i>Lutzomyia hirsuta</i> )	2/								8/			20/6
<i>Scopomyia microps</i> (= <i>Lutzomyia microps</i> )	2/								1/			7/1
<i>Scopomyia aff. microps</i> (= <i>Lutzomyia aff. microps</i> )	2/								2/1			6/4
<i>Trichopygomyia longispina</i> (= <i>Lutzomyia longispina</i> )	1/								3/			10/
Total	208	1,094	100	95	22	1,105	707	1,508	2,161	3,669		3,669
Sex ratio male/female	11.23	1.06	2.45	4.58	0.47	5.90	0.79	5.76	0.90	0.90		1.70
Specific richness	4	21	8	9	9	7	19	13	25	25		25
Equitability index	0.22	0.60	0.76	0.38	0.69	0.91	0.72	0.23	0.64	0.64		0.59
Shannon diversity	0.31	1.83	1.60	1.51	2.00	0.11	2.14	0.59	2.07	2.07		1.91

*Brumptomyia* spp., *Evandromyia* spp., and *Pressatia* spp. refer to females that cannot be morphologically separated within their genus. We give the name in parentheses according to Young and Duncan (1994) for each species. T, total.

Table 2. Sand flies species collected in peridomesticity (P) and forest (F) ambients from the localities of Córrego Palmital de Baixo and Córrego São Bento, National Monument of Pontões Capixabas, municipality of Puncas, State of Espírito Santo, southeastern of Brazil

Species	Córrego Palmital de Baixo						Córrego São Bento						
	2010		2011		Total		2011		May		Total		
	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	
<i>Brumptomyia atellari</i> (= <i>Brumptomyia atellari</i> )		1/		2/		3/							
<i>Brumptomyia figurata</i> (= <i>Brumptomyia figurata</i> )		7/				7/						1/	
<i>Brumptomyia nitidulata</i> (= <i>Brumptomyia nitidulata</i> )		52/		4/		56/						21/	
<i>Brumptomyia</i> spp. (= <i>Brumptomyia</i> spp.)	1/	30/	1/	3/	2/	33/	35/	17/	1/	17/	2/	9/	
<i>Evaendromyia callipyga</i> (= <i>Lutzomyia callipyga</i> )		1/		1/		1/							
<i>Evaendromyia eticardi</i> (= <i>Lutzomyia eticardi</i> )		5/		6/		11/						4/12	
<i>Evaendromyia leni</i> (= <i>Lutzomyia leni</i> )		1/				1/						3/3	
<i>Evaendromyia sallesi</i> (= <i>Lutzomyia sallesi</i> )		1/				1/							
<i>Evaendromyia sericea</i> (= <i>Lutzomyia sericea</i> )		1/		25/		26/							
<i>Evaendromyia</i> spp. (= <i>Lutzomyia</i> spp.)		27/		1/		28/						1/11	
<i>Evaendromyia bernisiphila</i> (= <i>Lutzomyia bernisiphila</i> )		13/		1/		14/						2/	
<i>Evaendromyia buynei</i> (= <i>Lutzomyia buynei</i> )		4/12		11/		15/						12/39	
<i>Expallata firmatol</i> (= <i>Lutzomyia firmatol</i> )	1/	2/2		1/		3/						1/1	
<i>Lutzomyia alencari</i> (= <i>Lutzomyia alencari</i> )													
<i>Lutzomyia longipalpis</i> (= <i>Lutzomyia longipalpis</i> )		1/		1/		2/						1/1	
<i>Marthomyia guayanaensis</i> (= <i>Lutzomyia guayanaensis</i> )		1/		2/		3/						1/11	
<i>Microgomyia capitata</i> (= <i>Lutzomyia capitata</i> )		13/		13/17		26/						15/70	
<i>Microgomyia fortitana</i> (= <i>Lutzomyia fortitana</i> )		557/690		1/		558/690						36/88	
<i>Microgomyia quinquefer</i> (= <i>Lutzomyia quinquefer</i> )		3/				3/						6/5	
<i>Microgomyia schreibleri</i> (= <i>Lutzomyia schreibleri</i> )		35/17		2/1		37/						103/65	
<i>Migomyia nigronet</i> (= <i>Lutzomyia nigronet</i> )		32/43		281/139		313/182						248/233	
<i>Nysomyia intermedia</i> (= <i>Lutzomyia intermedia</i> )		5/4		348/205		353/209						358/81	
<i>Nysomyia fischeri</i> (= <i>Lutzomyia fischeri</i> )		21/7		25/9		26/16						224/87	
<i>Phlebotomus nametoi</i> (= <i>Lutzomyia nametoi</i> )		4/1		61/24		65/29						429/180	
<i>Phlebotomus monticola</i> (= <i>Lutzomyia monticola</i> )		1/		1/		2/						1/1	
<i>Pressatia choti</i> (= <i>Lutzomyia choti</i> )		2/		263/		265/						290/	
<i>Pressatia equatorialis</i> (= <i>Lutzomyia equatorialis</i> )		32/		1/14		33/14						118/	
<i>Pressatia</i> spp. (= <i>Lutzomyia</i> spp.)		681/		103/		784/						38/	
<i>Psathyromyia lutziana</i> (= <i>Lutzomyia lutziana</i> )		15/		1/14		16/14						141/	
<i>Psathyromyia pascalei</i> (= <i>Lutzomyia pascalei</i> )		42/14		3/1		45/15						38/	
<i>Psychodopygus hirsutus</i> (= <i>Lutzomyia hirsutus</i> )		6/2				6/2						2/1	
<i>Sciomyia microps</i> (= <i>Lutzomyia microps</i> )		3/7				3/7						1/1	
<i>Sciomyia aff. microps</i> (= <i>Lutzomyia aff. microps</i> )		1/		1/		2/						2/1	
<i>Trichopogonmyia longispina</i> (= <i>Lutzomyia longispina</i> )		1/		1/		2/						1/1	
Total	129	3,790	1,476	328	1,615	4,108	5,723	8,853	2,238	437	218	9,290	2,454
Sex ratio	1.95	1.37	1.83	0.80	1.84	1.31	1.44	2.55	1.33	1.15	0.53	2.44	1.22
Specific richness	9	25	12	14	14	26	28	11	30	6	15	12	19
Equitability index	0.75	0.43	0.51	0.69	0.53	0.44	0.51	0.43	0.65	0.64	0.78	0.42	0.67
Shannon diversity	1.64	1.40	1.27	1.54	1.40	1.45	1.72	1.04	1.94	1.14	2.12	1.05	2.00

*Brumptomyia* spp., *Evaendromyia* spp. and *Pressatia* spp. refer to females that cannot be morphologically separated within their genus. We give the name in parentheses according to Young and Duncan (1994) for each species.

T, total.

In the current study, we also evaluated the vector dynamics of leishmaniasis-endemic areas in the Atlantic Forest, which is relevant to the epidemiology of leishmaniasis. We revealed that the human population in the endemic area of NMPN is exposed to risk of infection by *Leishmania* throughout the year, because *Lu. longipalpis* was always captured in the peridomestic environment. Furthermore, we propose that infection occurs in the peridomestic environment, because sand flies vectors of all species were more abundant in this environment. Pinto et al. (2012a) also demonstrated a high abundance of sand fly vectors in the peridomestic environment of endemic areas of American VL, across the Central Atlantic Forest Biodiversity Corridor. Epidemiological surveys of human and canine visceral infections caused by *L. infantum* in rural areas of the municipality of Pancas have revealed similar findings (Falqueto et al. 2009). These surveys showed no significant differences in *L. infantum* infection rates within the human population according to gender or age, indicating that transmission occurs in the home and in the peridomestic setting. The occurrence of human infections caused by *Leishmania* in the peridomestic environment of the Atlantic Forest (Rangel 1995, Tolezano 1994) contrasts with the Amazon region, where almost all human infections caused by *Leishmania* are associated with wild environments (Guerra et al. 2011, Martins et al. 2004).

Based on the results of our current study, we believe that *Lu. longipalpis* is the main vector of *L. infantum* in the NMPN, and that *Mg. migonei* plays an no evident role. These assertions are supported by the absence of *Lu. longipalpis*, and the presence of *Mg. migonei*, in the peridomestic environments of areas with no recent records of *L. infantum* (Córrego Palmital de Baixo), and in areas where *L. infantum* has never been recorded (Córrego São Bento). By contrast, *Mg. migonei* acts as vector of *L. infantum* in an area of the State of Pernambuco, in the northern portion of the Atlantic Forest (Carvalho et al. 2010), and appears to act as vector in the City of La Banda, Argentina (Salomón et al. 2010).

In conclusion, we have demonstrated that species richness and diversity of sand flies is congruent with biodiversity hotspots of the Atlantic Forest. Furthermore, species richness and diversity of sand flies might be associated to the genetic diversity of the *Leishmania* parasite. Epidemiologically, we have reinforced the relationship between peridomestic and domestic environments, and the transmission pattern of *Leishmania* parasites in the Atlantic Forest. Finally, our data indicate *Lu. longipalpis* as the vector of *L. infantum* within our study area.

#### Acknowledgments

We thank Antonio Teva, Daniel Kiefer, Felipe Vigoder, and Luiz G. S. R. Bauzer for the help in the fieldwork. We also thank Gustavo R. Leite for the preparation of the map. This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) and FIOCRUZ.

#### References Cited

- Andrade, M. S., H. F. Valença, A. L. Silva, F. A. Almeida, E. L. Almeida, M.E.F. Brito, and S. P. Brandão-Filho. 2005. Sand fly fauna in a military training area endemic for American tegumentary leishmaniasis in the Atlantic Rain Forest region of Pernambuco, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública* 21: 1761–1767.
- Azevedo, A.C.R., E. F. Rangel, E. M. Costa, J. David, A. W. Vasconcelos, and U. G. Lopes. 1990a. Natural infection of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) by *Leishmania* of the *braziliensis* complex in Baturité, Ceará state, northeast Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 85: 251.
- Azevedo, A.C.R., E. F. Rangel, and R. G. Queiroz. 1990b. *Lutzomyia migonei* (França, 1920) naturally infected with peripylarian flagellates in Baturité, a focus of cutaneous leishmaniasis in Ceará state, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 85: 479.
- Barreto, M. P., and J. O. Coutinho. 1940. Processos de captura, dissecação e montagem de flebotomos. *Anais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo* 16: 173–187.
- Barros, G. C., P. A. Sessa, E. A. Mattos, V.R.D. Carias, W. Mayrink, J.T.A. Alencar, A. Falqueto, and A. C. Jesus. 1985. Foco de leishmaniose tegumentar nos municípios de Viana e Cariacica, estado do Espírito Santo, Brasil. *Revista de Saúde Pública* 19: 146–153.
- Bock, C. E., Z. F. Jones, and J. H. Bock. 2007. Relationships between species richness, evenness, and abundance in a south-western savanna. *Ecology* 88: 1322–1327.
- Carnaval, A. C., M. J. Hickerson, C.F.B. Haddad, M. T. Rodrigues, and C. Moritz. 2009. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest Hotspot. *Science* 323: 785–789.
- Carvalho, M. R., H. F. Valença, F. J. Silva, D. Pita-Pereira, T. A. Pereira, C. Brito, R. P. Brazil, and S. P. Brandão-Filho. 2010. Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemys migonei* (França, 1920) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. *Acta Trop.* 116: 108–110.
- Cortez, A. M., V.P.M. Silva, P.V.S. Queiroz, H.T.A. Andrade, M.I.B. Loiola, and M.F.F.M. Ximenes. 2007. Vertical stratification and development aspects of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in an area of Atlantic Forest tree species in a metropolitan region in northeastern Brazil. *J. Vector Ecol.* 32: 336–341.
- Costa, L. P., Y.L.R. Leite, G.A.B. Fonseca, and M. T. Fonseca. 2000. Biogeography of South American forest mammals: endemism and diversity in the Atlantic Forest. *Biotropica* 32: 872–881.
- Cupollilo, E., L. R. Brahim, C. B. Toaldo, M. P. Oliveira-Neto, M.E.F. Brito, A. Falqueto, M. F. Naiff, and G. Grimaldi, Jr. 2003. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 41: 3126–3132.
- Deane, L. M. 1956. Leishmaniose visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores no estado do Ceará. Serviço Nacional de Educação Sanitária, Rio de Janeiro, Brazil.
- Deane, L. M., and M. P. Deane. 1962. Visceral leishmaniasis in Brazil: Geographical distribution and transmission. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 4: 198–212.
- Falqueto, A. 1995. Especificidade alimentar de flebotomíneos em duas áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar no

- Estado do Espírito Santo. Doctoral thesis, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil.
- Falqueto, A., A. L. Ferreira, C. B. Santos, R. Porrozi, M. V. Costa, A. Teva, E. Cupolillo, A. Campos-Neto, and G. Grimaldi, Jr. 2009. Cross-sectional and longitudinal epidemiologic surveys of human and canine *Leishmania infantum* visceral infections in an endemic rural area of southeast Brazil (Pancas, Espírito Santo). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 80: 559–565.
- Feitoza, L. R. 1986. Carta agroclimática do Espírito Santo. Governo do estado do Espírito Santo, Secretaria de Estado da Agricultura and Empresa Capixaba de Pesquisa Agropecuária EMCAPA Vitória, ES, Brazil.
- Ferreira, A. L., P. A. Sessa, J.B.M. Varejão, and A. Falqueto. 2001. Distribution of sand flies (Diptera: Psychodidae) at different altitudes in an endemic region of American cutaneous leishmaniasis in the state of Espírito Santo, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96: 1061–1067.
- Galati, E.A.B. 1995. Phylogenetic systematics of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) with emphasis on American groups. *Boletín de la Dirección de Malariología Y Saneamiento Ambiental* 35: 1331–42.
- Galati, E.A.B. 2003a. Morfologia e Taxonomia. 2.1: classificação de Phlebotominae, pp. 23–51. In E. F. Rangel and R. Lainson (eds.), *Flebotomíneos do Brasil*. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil.
- Galati, E.A.B. 2003b. Morfologia e Taxonomia. 2.2: morfologia, terminologia de adultos e identificação dos táxons da América, pp. 53–175. In E. F. Rangel and R. Lainson (eds.), *Flebotomíneos do Brasil*. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil.
- Galati, E.A.B., A. M. Marassá, R. M. Gonçalves-Andrade, C. A. Consales, and E.M.F. Bueno. 2010a. Phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in the Ribeira Valley Speleological Province 1. Parque Estadual Intervales, state of São Paulo, Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia* 54: 311–321.
- Galati, E.A.B., A. M. Marassá, R. M. Gonçalves-Andrade, C. A. Consales, and E.M.F. Bueno. 2010b. Phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in the Speleological Province of the Ribeira Valley: 2. Parque Estadual do Alto Ribeira (PETAR), São Paulo State, Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia* 54: 477–487.
- Guerra, J.A.O., M.G.V. Barbosa, M. G. Paes, R. T. Sousa, P. G. Silva, M. J. Silva, A. R. Maciã, R. S. Carvalho, L.L.A.R.C. Coelho, and L.C.L. Ferreira. 2011. Mucosal leishmaniasis—clinical and epidemiological aspects of 234 cases treated in a tertiary reference center in the Brazilian Amazon. *J. Community Med. Health Edu.* 1: 1–4.
- Guimarães, V.C.F.V., P. L. Costa, F. J. Silva, K. T. Silva, K. G. Silva, A.L.F. Araújo, E.H.G. Rodrigues, and S. P. Brandão-Filho. 2012. Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in São Vicente Férrer, a sympatric area to cutaneous and visceral leishmaniasis in the state of Pernambuco, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 45: 66–70.
- Harper, J. L., and D. L. Hawksworth. 1994. Biodiversity: measurement and estimation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 345: 5–12.
- Hammer, Ø., D.A.T. Harper, and P. D. Ryan. 2001. PAST: palaeontological Statistics software package for education and data analysis. *Palaent. Electron* 4: 1–9.
- (IPEMA) Instituto de Pesquisas da Mata Atlântica. 2005. Conservação da Mata Atlântica no estado do Espírito Santo: cobertura florestal, unidades de conservação e fauna ameaçada. Programa Centros para a Conservação da Biodiversidade/ Conservação Internacional do Brasil/ Instituto de Pesquisas da Mata Atlântica, Vitória, Espírito Santo, Brazil.
- Lainson, R., and J. J. Shaw. 1998. New World leishmaniasis the neotropical leishmania species, pp. 241–266. In L. Collier, A. Baeows, and M. Sussman (eds.), *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Parasitology*. Arnold, London, United Kingdom.
- Lawler, J. J., D. White, J. C. Sifneos, and L. L. Master. 2003. Rare species and the use of indicator groups for conservation planning. *Conserv. Biol.* 17: 875–882.
- Luz, E., N. Membrive, E. A. Castro, J. Dereure, J. Pralong, A. Dedet, A. Pandey, and V. Thomaz-Socol. 2000. *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as vector of *Leishmania (V.) braziliensis* in Paraná State, southern Brazil. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 94: 623–631.
- Marcondes, C. B. 2007. A proposal of generic and subgeneric abbreviations for Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the world. *Entomol. News* 118: 351–356.
- Marcondes, C. B., L. G. Santos-Neto, and A. L. Lozovei. 2001. Ecology of Phlebotomine sandflies (Diptera, Psychodidae) in Brazilian Atlantic Forest. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 34: 255–260.
- Martins, L. M., J.M.M. Rebêlo, M.C.F.V. Santos, J.M.L. Costa, A. R. Silva, and L. A. Ferreira. 2004. Ecoepidemiologia da leishmaniose tegumentar no Município de Buriticupu, Amazônia do Maranhão, Brasil, 1996 a 1998. *Cadernos de Saúde Pública* 20: 735–743.
- Mittermeier, R. A., N. Myers, J. B. Thomsen, G. A. B. da Fonseca, and S. Olivieri. 1998. Biodiversity hotspots and major tropical wilderness areas: approaches to setting conservation priorities. *Conserv. Biol.* 12: 516–520.
- Myers, N., R. A. Mittermeier, C. G. Mittermeier, G.A.B. Fonseca, and J. Kent. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853–858.
- Orme, C.D.L., R. G. Davies, M. Burgess, F. Eigenbrod, N. Pickup, V. A. Olson, A. J. Webster, T. S. Ding, P. C. Rasmussen, R. S. Ridgely, A. J. Stattersfield, P. M. Bennett, T. M. Blackburn, K. J. Gaston, and I.P.F. Owens. 2005. Global hotspots of species richness are not congruent with endemism or threat. *Nature* 436: 1016–1019.
- Peel, M. C., B. L. Finlayson, and T. A. McMahon. 2007. Updated world map of the Köppen–Geiger climate classification. *Hydrol. Earth Syst. Sci.* 11: 1633–1644.
- Peters, W., and R. Killick-Kendrick. 1987. The leishmaniasis in biology and medicine: biology and epidemiology, vol. 1. Academic, Oxford, United Kingdom.
- Pinto, I. S., A.C.C. Loss, A. Falqueto, and Y.L.R. Leite. 2009. Pequenos mamíferos não voadores em fragmentos de Mata Atlântica e áreas agrícolas em Viana, Espírito Santo, Brasil. *Biota Neotropica* 9: 355–360.
- Pinto, I. S., C. B. Santos, A. L. Ferreira, and A. Falqueto. 2010a. American visceral leishmaniasis dissociated from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae) in the state of Espírito Santo, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública* 26: 365–372.
- Pinto, I. S., C. B. Santos, A. L. Ferreira, and A. Falqueto. 2010b. Richness and diversity of sand flies (Diptera, Psychodidae) in an Atlantic rainforest reserve in southeastern Brazil. *J. Vector Ecol.* 35: 325–332.
- Pinto, I. S., A. L. Ferreira, V. Valim, F. S. Carvalho, G. M. Silva, A. L. Falcão, R. Dietze, and A. Falqueto. 2012a. Sand fly vectors (Diptera, Psychodidae) of American visceral leishmaniasis areas in the Atlantic Forest, State of Espírito Santo, Brazil. *J. Vector Ecol.* 37: 90–96.
- Pinto, I. S., J.F.R. Tonini, A. L. Ferreira, and A. Falqueto. 2012b. A brief inventory of sand flies (Diptera, Psychodidae) from the National Forest of the Rio Preto, state of



- the Espírito Santo, southeastern Brazil. *Biota Neotropica* 12: 323–326.
- Pita-Pereira, D., C. R. Alves, M. B. Souza, R. P. Brazil, A. L. Bertho, A. Figueiredo-Barbosa, and C. Britto. 2005. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridization assay. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 99: 905–913.
- Pita-Pereira, D., G. D. Souza, A. Zwetsch, C. R. Alves, C. Britto, and E. F. Rangel. 2009. First report of *Lutzomyia (Nyssomyia) neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) naturally infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a periurban area of south Brazil using a multiplex polymerase chain reaction assay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 80: 593–595.
- Rangel, E. F. 1995. Transmission of American cutaneous leishmaniasis in peridomestic foci in Rio de Janeiro State and other similar situations compared to the classical epidemiology in Amazon region, vol. 2, pp. 103–110. In *Proceedings from a Research Seminar on Tropical Diseases, Society and the Environment. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases/SAREC*, Geneva, Switzerland.
- Rangel, E. F., and R. Lainson. 2003. *Flebotomíneos do Brasil*. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil.
- Ricklefs, R. E., and D. Schluter. 1993. *Species diversity in ecological communities: historical and geographical perspectives*. University of Chicago Press, Chicago, IL.
- Salomón, O. D., M. G. Quintana, G. Bezzi, M. L. Morán, E. Betbeder, and D. V. Valdéz. 2010. *Lutzomyia migonei* as putative vector of visceral leishmaniasis in La Banda, Argentina. *Acta Trop.* 113: 84–87.
- Savani, E.S.M.M., V.L.B. Nunes, E.A.B. Galati, T. M. Castilho, R. A. Zampieri, and L. M. Floter-Winter. 2009. The finding of *Lutzomyia almerioi* and *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania* spp. in a cutaneous and canine visceral leishmaniasis focus in Serra da Bodoquena, Brazil. *Vet. Parasitol.* 160: 18–24.
- (SEAMA) Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Recursos Hídricos. 2008. *Atlas de Ecossistemas do Estado do Espírito Santo*. UFV, Vitória, Espírito Santo, Brazil.
- Souza-Rocha, L., A. Falqueto, C. B. Santos, A. L. Ferreira, G. C. Graça, G. Grimaldi, Jr., and E. Cupolillo. 2010. Survey of natural infection by *Leishmania* in sand fly species collected in southeastern Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 104: 461–466.
- Stirling, G., and B. Wilsey. 2001. Empirical relationships between species richness, evenness, and proportional diversity. *Am. Nat.* 158: 286–299.
- Tolezano, J. E. 1994. Ecoepidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis in the State of São Paulo, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 89: 427–434.
- Tonini, J.F.R., L. M. Carão, I. S. Pinto, J.L.R. Gasparini, Y.L.R. Leite, and L. P. Costa. 2010. Non-volant tetrapods from Duas Bocas Biological Reserve, state of Espírito Santo, southeastern Brazil. *Biota Neotrop.* 10: 339–351.
- Virgens, T. M., C. B. Santos, I. S. Pinto, K. S. Silva, F. C. Leal, and A. Falqueto. 2008. Phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae) in an Amazonian leishmaniasis transmission area in northern Espírito Santo state, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública* 24: 2969–2978.
- Wilsey, B. J., and C. Potvin. 2000. Biodiversity and ecosystem functioning: the importance of species evenness and identity in a Quebec old field. *Ecology* 81: 887–893.
- (WHO) World Health Organization Expert Committee. 2010. *Control of the leishmaniasis*. Technical Report Series 949. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Young, D. G., and M. A. Duncan. 1994. *Guide to the identification and geographic distribution of Lutzomyia sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae)*. Memoirs of the American Entomological Institute, Associated Publishers-American Entomological Institute, Gainesville, FL.

Received 22 February 2013; accepted 23 August 2013.

## 4. CAPÍTULO 2

### **Primeiro registro de *Brumptomyia ortizi* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) no estado do Rio de Janeiro, Sudeste do Brasil.**

*Brumptomyia ortizi*, uma espécie de flebotomíneo de ocorrência rara, foi registrada pela primeira vez no estado do Rio de Janeiro e um breve levantamento de espécies flebotomíneas foi efetuado na localidade de Bom Jesus de Itabapoana. O estudo mostra a insuficiência dos caracteres morfológicos em discriminar entre diferentes fêmeas de espécies de flebotomíneos do gênero *Brumptomyia*. O mesmo ocorreu para fêmeas de algumas espécies do gênero *Evandromyia*. Os resultados indicam claramente a necessidade de utilizarmos marcadores moleculares para identificação de espécies de flebotomíneos classificados nos gêneros *Brumptomyia* e *Evandromyia*.

#### **Referência bibliográfica:**

**Pinto IS**, Rodrigues AAF, Chagas BD, Andrade-Filho JD, Brazil RP First record of *Brumptomyia ortizi* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) for the state of Rio de Janeiro, southeastern Brazil. *submetido*

## TITLE PAGE

### Short Communication

#### Title

First record of *Brumptomyia ortizi* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) for the state of Rio de Janeiro, southeastern Brazil

#### Authors

Israel de Souza Pinto<sup>1\*</sup>, Andressa Alencastre Fuzari Rodrigues<sup>2</sup>, Bruna Dias das Chagas<sup>1</sup>, José Dilermando Andrade Filho<sup>3</sup>, Alexandre Afranio Peixoto<sup>1†</sup>, Reginaldo Peçanha Brazil<sup>2</sup>

#### Affiliations

1 Laboratório de Biologia Molecular de Insetos, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

2 Laboratório de Doenças Parasitárias, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

3 Grupo de Estudos em Leishmanioses, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, MG, Brazil.

\* Corresponding author: email: [pintoisrael@gmail.com](mailto:pintoisrael@gmail.com)

† In memoriam

## Introduction

The phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae) are insects of great importance to public health acting as the main vectors of *Leishmania* parasites to humans and other animals. The knowledge about sand fly geographic distribution is the basis of studies on the eco-epidemiology of leishmaniasis as well as the start point to build strategies of control and combat against these vectors (Rangel and Lainson, 2003).

The state of Rio de Janeiro, situated within the Atlantic Forest biome, has reported several cases of human leishmaniasis in the last years and, so far, have been reported along its territory 50 sand fly species belong to the following genera: *Bichromomyia* Artemiev (1 sp.); *Brumptomyia* França and Parrot (6 spp.); *Evandromyia* Mangabeira (8 spp.); *Expapillata* Galati (1 sp.); *Lutzomyia* França (3 spp.); *Martinsmyia* Galati (1 sp.); *Micropygomyia* Barreto (4 spp.); *Migonemyia* Galati (1 sp.); *Nyssomyia* Barreto (2 spp.); *Pintomyia* Costa Lima (6 spp.); *Psathyromyia* Barreto (8 spp.); *Psychodopygus* Mangabeira (6 spp.) and *Sciopemyia* Barreto (2 spp.) (Souza *et al.*, 2001; Galati 2003a). This number of sand fly species is lower than the number recorded in other states as Espírito Santo (also situated within the Atlantic Forest biome and with similar territorial extension) (Pinto *et al.*, 2012a), Minas Gerais (Andrade and Dantas-Torres, 2010) and São Paulo (Shimabukuro and Galati, 2011). Possibly, this fact can be an outcome of the absence of sand fly survey mainly in forest environments in areas without or with low number of leishmaniasis records. Furthermore, there are few published data on sand fly records for the municipalities of the northern portion of the state of Rio de Janeiro, despite of the report of human cutaneous leishmaniasis cases in the region (Oliveira and Paula, 2011).

So far, the only sand fly species reported for several municipalities of the northwestern of state of Rio de Janeiro was *Nyssomyia intermedia* (Lutz and Neiva). Marcondes *et al.* (1998) reported its occurrence for five northwestern municipalities as follows: Cardoso Moreira, Itaperuna, Porciúncula, Santo Antonio de Pádua and São Fidélis. There is evidence that *Ny. intermedia* is the vector of *Leishmania braziliensis* Vianna in the region (Rezende *et al.* 2009). We even performed a sand fly capture inside a house in the locality of Valão do Cágado, municipality of Itaperuna, where two people acquired leishmaniasis (Oliveira and Paula, 2011) and we also only recorded specimens of *Ny. intermedia*.

Rezende *et al.* (2009) performed collections of sand flies in an area upon the influence of the Rosal hydroelectric power station, situated at the Itabapoana River in the States of Espírito Santo and Rio de Janeiro. They performed sand fly collections from two

municipalities belonging to the state of Espírito Santo and from the municipality of Bom Jesus do Itabapoana in the state of Rio de Janeiro and recorded the presence of eight sand fly species. Theirs collections were restricted to the peridomiciliary ambient. So, the sand fly fauna in forest environment in the northwestern portion of state of Rio de Janeiro still remains unknown.

We report here for the first time 1) a brief inventory of sand fly from a forested ambient in the municipality of Bom Jesus do Itabapoana, northwestern of state of Rio de Janeiro 2) and the occurrence of *Brumptomyia ortizi* Martins *et al.* for the state of Rio de Janeiro.

### **Material and Methods**

The collections were conducted at the locality of Pedra Branca (21° 03' 25" S; 41° 47' 31" W), district of Pirapetinga, municipality of Bom Jesus do Itabapoana, state of Rio de Janeiro, southeastern of Brazil (Figure 4.1). The climate of the Pirapetinga is tropical humid. The elevation of the locality of Pedra Branca ranges between 500 m. a.s.l to 1100 m. a.s.l. The region still contains some Atlantic Forest remnants where were performed the sand fly collections. These remnants are situated at the top of the mountains and were conserved along the years possibly due to the difficulty to explore the area for coffee plantation or cattle rearing. The district of Pirapetinga is neighboring of the district of Valão do Cágado, municipality of Itaperuna where leishmaniasis cases has been reported. Oliveira and Paula (2011) even mentioned the occurrence of one leishmaniasis human case in a district near to Valão do Cágado, but belong to the Bom Jesus do Itabapoana. They probably refer to the district of Pirapetinga.

The sand flies were captured during three consecutive nights between 23 and 25 of January 2014 using four HP light traps in the forest environment during all night long (18:00 to 06:00). The traps were tied to trees branches and suspended to one meter above the ground level. We used a small container (220mL) with 80% ethanol connected to the trap as was used by Pinto *et al.* (2012a). The containers were conducted to the Laboratory of Insect Molecular Biology, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. The screened sand fly were mounted on glass slides by the technique proposed by Barretto and Coutinho (1940), identified according to Galati (1995, 2003b) and used the abbreviation of generic names as proposed by Marcondes (2007). Sand fly vouchers were deposited in the Phlebotomine Collection of the Instituto de Pesquisas René Rachou – Fundação Oswaldo Cruz, municipality of Belo Horizonte, state of Minas Gerais. We used the software PAST (Hammer *et al.*, 2001) to calculate Shannon's diversity index (H), equitability (J), and species richness (S).

## Results

A total of 115 specimens ( $S = 10$ ;  $H = 1.43$ ;  $J = 0.46$ ) were captured belonging to ten species as follow: *Brumptomyia cardosoi* (Barreto and Coutinho) (2♂), *Brumptomyia nitzulescui* (Costa Lima) (2♂), *Brumptomyia ortizi* Martins *et al.* (40♂), *Brumptomyia* spp. (50♀), *Evandromyia edwardsi* (Mangabeira) (1♂/2♀), *Evandromyia* sp. (1♀), *Evandromyia termitophila* (Martins *et al.*) (1♀), *Evandromyia tupynambai* (Mangabeira) (5♀), *Micropygomyia ferreirana* (Barretto *et al.*) (2♀), *Migonemyia migonei* (França) (1♂), *Pintomyia fischeri* (Pinto) (2♂/3♀) and *Psathyromyia pascalei* (Coutinho and Barreto) (3♂). This is the first recorded of *Br. ortizi* for the state of Rio de Janeiro. The capture success was 0.8 sand flies per hour per trap. We didn't find any specimens of *Ny. intermedia* in this study.

## Discussion

The brief inventories of sand fly species as point out by Pinto *et al.* (2012a) can be useful to fauna survey in leishmaniasis non-endemic areas. Regarding to diversity and species richness, our results corroborated this idea. The species richness was similar to some studies in the state of Rio de Janeiro that spent much more time in sand fly collection (Souza *et al.*, 2001; Rezende *et al.*, 2009; Brazil *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.*, 2013). Brazil *et al.* (2011) reported nine species in a study from the municipality of Saquarema. Souza *et al.* (2001) reported eight species for the Poço das Antas Biological Reserve, municipality of Silva Jardim and ten species for the Fazenda Bom Retiro Natural Heritage Reserve, municipality of Casemiro de Abreu. Rezende *et al.* (2009) reported eight species for the municipality of Bom Jesus do Itabapoana. In this aspect, is reliable the use of brief inventories to screening areas for sand fly survey. Rodrigues *et al.* (2013) reported twelve species State Park of Serra da Tiririca, municipalities of Niterói and Maricá.

Due to the scarcity of sand fly records data for the northwestern portion of state of Rio de Janeiro, the species captured in Pirapetinga district, except by *Mg. migonei* and *Pi. fischeri*, represent the first record for the municipality of Bom Jesus do Itabapoana as well as for the northwestern portion of the state of Rio de Janeiro. Rezende *et al.* (2009) conducted several collections campaigns for the municipality of Bom Jesus do Itabapoana and recorded eight species. We recorded ten species during only three days. This difference in species richness is probably due to absence of collections in the forest ambient by Rezende *et al.* (2009). This fact also reinforces the utility of brief inventories of sand fly in forest extents to increase the knowledge of sand fly biodiversity in areas without or with few samples.

We recorded *Br. ortizi* for the first time from the state of Rio de Janeiro. *Br. ortizi* has the gonocoxite with stout and sclerotized setae in the apical region and a setae tuft arranged in a longitudinal disposition in the basal region. These characters are more similar to *Brumptomyia angelae* Galati *et al.*, *Brumptomyia nitzulescui* (Costa Lima) and *Brumptomyia troglodytes* (Lutz). *Brumptomyia ortizi* can be distinguished from both *Br. angelae* and *B. nitzulescui* because its gonostyle has the internal spine implanted at the same level of the tubercle where the two external spines are implanted. *Br. ortizi* can be distinguished from both *Br. troglodytes* because the paramere of *Br. troglodytes* is abruptly narrow in the pre-apical region at the expense of the ventral margin forming an apical process that seems a fingertip. The females of *Brumptomyia* genus were not identified at the species level because are very similar, and the female of *Br. ortizi* was not formally describe so far.

Currently, *Brumptomyia* genus comprise 26 formally described species, sixteen of them for the Atlantic Forest and eight of them for the state of Rio de Janeiro as follows: *Brumptomyia avellari* (Costa Lima), *Brumptomyia brumpti* (Larrousse), *Brumptomyia cardosoi* (Barretto and Coutinho), *Brumptomyia cunhai* (Mangabeira), *Brumptomyia guimaraesi* (Coutinho and Barretto), *Br. nitzulescui*, *Brumptomyia pintoii* (Costa Lima), and *Br. troglodytes* (Galati, 2003; Galati *et al.*, 2007; Shimabukuro *et al.*, 2007). *Br. ortizi*, so far, has been reported only for the states of Minas Gerais, Paraná and São Paulo (Galati, 2003a; Saraiva *et al.*, 2006). *Br. ortizi* seems be reported only from regions with elevation above of the 500 m at sea level as follows: Canyon Quatelá, municipality of Tibagi, state of Paraná (Galati *et al.*, 2007); Colônia Coreana, municipality of Ponta Grossa, state of Paraná (Martins *et al.*, 1971); municipality of Cássia dos Coqueiros, state of São Paulo (Shimabukuro and Galati, 2011) and Taquaruna, municipality of Caparaó, state of Minas Gerais (Saraiva *et al.*, 2006) and now for the locality of Pedra Branca, municipality of Rio de Janeiro. The influence of elevation in both distribution and occurrence of sand fly has been stated for several authors around the world (Ferreira *et al.*, 2001; Guernaoui *et al.*, 2006; Belen and Alten, 2011). So, the elevation above 500 m a.s.l. may be a factor that confers suitable conditions for the *Br. ortizi* occurrence as low temperatures in relation to lowlands.

We stated for the first time the occurrence of *Mi. ferreirana* for the state of Rio de Janeiro, but this is not the first record for the state. The record of *Mi. ferreirana* for the state was mistakenly made as *Micropygomyia borgmeieri* (Martins *et al.*). Currently, there are strong evidences that *Mi. borgmeieri* is a junior synonymous of *Mi. ferreirana*. There is high morphometric similarity between *Mi. ferreirana* and *Mi. borgmeieri* (Galati *et al.*, 2002). Also, according to Galati *et al.* (2002), the setae on the gonocoxite used to distinguish the two species (Young and Duncan, 1994) are semifoliaceous in both species. In this sense, we are

considering these two species as synonymous and only the presence of *Mi. ferreirana* for the state of Rio de Janeiro.

We couldn't find any specimens of *Ny. intermedia* in the worked area. Although the forest ambient can harbor more species than peridomiciliary ambient, species as *Ny. intermedia* are poorly collected or are absent in the former one (Pinto *et al.*, 2010; Pinto *et al.*, 2012a; Ferreira *et al.*, 2013). In other side, in the peridomiciliary environment, *Ny. intermedia* is commonly the most abundant species (Rezende *et al.*, 2009; Brazil *et al.*, 2011; Pinto *et al.*, 2012b). The absence of this vector in the forest ambient raises the hypothesis that transmission of *L. braziliensis* in the region occurs in the peridomiciliary environment.

In conclusion, we showed that quick sand fly inventories can be useful for biodiversity knowledge of new areas within the Atlantic Forest and could increase the number of sand fly species recorded for the state of Rio de Janeiro.

### **Acknowledgements**

We thank to Matheus Borges and Gabriela Thomazin for help in the field work. Fellowship support was provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) to Israel S. Pinto. The specimens were collected under permit number 5102-1 from Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA).

### **Literature Cited**

- Andrade, A. J., F. Dantas-Torres. 2010. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) of the state of Minas Gerais, Brazil. *Neotropical Entomology* 39: 115-123.
- Barretto, M. P., and J. O. Coutinho. 1940. Processos de captura, dissecação e montagem de flebótomos. *Anais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo* 16: 173-187.
- Belen, A., and B. Alten. 2011. Seasonal dynamics and altitudinal distributions of sand fly (Diptera: Psychodidae) populations in a cutaneous leishmaniasis endemic area of the Cukurova region of Turkey. *Journal of Vector Ecology* 36 (Supplement 1): 87-94.
- Brazil, R. P., M. C. Pontes, W. L. Passos, A. A. Rodrigues, and B. G. Brazil. 2011. The sand fly fauna (Psychodidae: Phlebotominae) in the region of Saquarema, state of Rio de Janeiro, Brazil, an endemic area of cutaneous leishmaniasis transmission. *Journal of Vector Ecology* 36 (Supplement 1): 95-98.
- Ferreira, A. L., P. A. Sessa, J.B.M. Varejão, and A. Falqueto. 2001. Distribution of sand flies (Diptera: Psychodidae) at different altitudes in an endemic region of American



cutaneous leishmaniasis in the state of Espírito Santo, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96: 1061-1067.

Ferreira, A. L., A. Falqueto, G. Grimaldi, Jr., A. A. Peixoto, and I. S. Pinto. 2013. Ecological and Epidemiological Aspects of the Sand Fly (Diptera, Psychodidae) Fauna of the National Monument of Pontões Capixabas, State of Espírito Santo, Southeastern Brazil. *Journal of Medical Entomology* 50(6): 1215-1223.

Galati, E.A.B. 1995. Phylogenetic systematics of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) with emphasis on American groups. *Boletín de la Dirección de Malariología Y Saneamiento Ambiental* 35: 133-142.

Galati, E.A.B., J. D. Andrade-Filho, and A. L. Falcão. 2002. *Micropygomyia ferreirana* (Barretto, Martins & Pellegrino) as senior synonym of *Micropygomyia borgmeieri* (Martins, Falcão & Silva) and denunciation of a error of identification related to this taxon. *Entomología y Vectores* 9 (Supplement 1): 156-157. [Abstract]

Galati, E.A.B. 2003a. Morfologia e taxonomia. 2.1: classificação de Phlebotominae, pp. 23-51. In E. F. Rangel and R. Lainson [eds.], *Flebotomíneos do Brasil*. Editora Fiocruz; Rio de Janeiro, RJ; 368 pp.

Galati, E.A.B. 2003b. Morfologia e Taxonomia. 2.2: morfologia, terminologia de adultos e identificação dos táxons da América, pp. 53-175. In E. F. Rangel and R. Lainson [eds.], *Flebotomíneos do Brasil*. Editora Fiocruz; Rio de Janeiro, RJ; 368 pp.

Galati, E.A.B., D. R. Santos, and A. M. Silva. 2007. *Brumptomyia angelae*, a new species of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) of the Atlantic forest of the state of Paraná, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102(6): 701-705.

Guernaoui, S., A. Boumezzough, and A. Laamrani. 2006. Altitudinal structuring of sand flies (Diptera: Psychodidae) in the High-Atlas mountains (Morocco) and its relation to the risk of leishmaniasis transmission. *Acta Tropica* 97: 246-351.

Hammer, Ø., D.A.T. Harper, and P. D. Ryan. 2001. PAST: Palaeontological Statistics software package for education and data analysis. *Palaentological Electronica* 4: 1-9.

Marcondes, C. B., A. L. Lozovei, J. H. Vilela. 1998. Distribuição geográfica de flebotomíneos do complexo *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera, Psychodidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 31: 51-58.

Marcondes, C. B. 2007. A proposal of generic and subgeneric abbreviations for Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the world. *Entomological News* 118: 351-356.

Martins, A. V., J. E. Silva, and A. L. Falcão. 1971. Nova espécie de flebotomo do Estado do Paraná, Brasil. *Brumptomyia ortizi* sp. n. (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Boletim do Museu de História Natural da Universidade Federal de Minas Gerais 9: 71-77.

Oliveira, A. I., and P. H. Paula. 2011. Perfil Epidemiológico dos Casos de Leishmaniose no Município de Itaperuna – RJ: De Janeiro de 2006 a Outubro de 2009. *Acta Biomedica Brasiliensia* 2(1): 1-11.

Pinto, I. S., C. B. Santos, A. L. Ferreira, and A. Falqueto. 2010. Richness and diversity of sand flies (Diptera, Psychodidae) in an Atlantic rainforest reserve in southeastern Brazil. *Journal of Vector Ecology* 35: 325-332.

Pinto, I. S., J.F.R. Tonini, A. L. Ferreira, and A. Falqueto. 2012a. A brief inventory of sand flies (Diptera, Psychodidae) from the National Forest of the Rio Preto, state of the Espírito Santo, southeastern Brazil. *Biota Neotropica* 12: 323-326.

Pinto, I. S., A. L. Ferreira, V. Valim, F. S. Carvalho, G. M. Silva, A. L. Falcão, R. Dietze, and A. Falqueto. 2012b. Sand fly vectors (Diptera, Psychodidae) of American visceral leishmaniasis areas in the Atlantic Forest, State of Espírito Santo, Brazil. *Journal of Vector Ecology* 37: 90-96.

Rangel, E. F. and R. Lainson. 2003. *Flebotomíneos do Brasil*. Editora Fiocruz; Rio de Janeiro, RJ; 368 pp.

Rezende, G. R., P. A. Sessa, A. L. Ferreira, C. B. Santos, G. R. Leite, and A. Falqueto. 2009. Efeitos da implantação da Usina Hidrelétrica de Rosal, Rio Itabapoana, Estados do Espírito Santo e Rio de Janeiro, sobre anofelinos, planorbídeos e flebotomíneos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 42: 160-164.

Rodrigues, A.A.F., V. A. Barbosa, J. D. Andrade-Filho, and R. P. Brazil. 2013. The sandfly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the Parque Estadual da Serra da Tiririca, Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 108(7): 943-946.

Saraiva, L., J. S. Lopes, G.B.M. Oliveira, F. A. Batista, A. L. Falcão, and J. D. Andrade-Filho. 2006. Estudo dos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área de leishmaniose tegumentar americana nos municípios de Alto Caparaó e Caparaó, Estado de Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39: 56-63.

Shimabukuro, P.H.F., A. M. Marassá, and E.A.B. Galati. 2007. *Brumptomyia carvalhoi* sp. nov. (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from Atlantic forest domain, São Paulo State, Brazil. *Zootaxa* 1637: 47-54.

Shimabukuro, P.H.F., and E.A.B. Galati. 2011. Checklist dos Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do Estado de São Paulo, Brasil, com comentários sobre sua distribuição

geográfica. *Biota Neotropica* 11(1a): [online) URL:  
<http://www.biotaneotropica.org.br/v11n1a/pt/abstract?inventory+bn0361101a2011>.

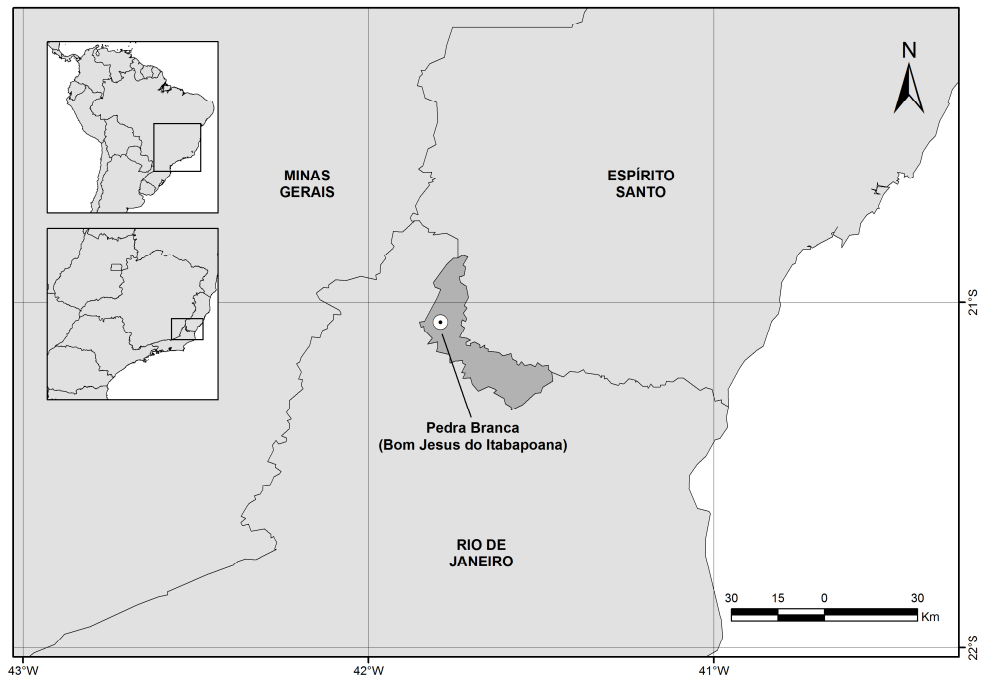
Souza, N. A., C. A. Andrade-Coêlho, M. L. Vilela, and E. F. Rangel. 2001. The Phlebotominae sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna of two Atlantic Rain Forest reserves in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 9: 319-324.

Young, D. G., and M. A. Duncan. 1994. *Guide to the Identification and Geographic Distribution of Lutzomyia Sand Flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae)*. Memoirs of the American Entomological Institute, Associated Publishers-American Entomological Institute; Gainesville, FL; 881 pp.

### Figure legend

**Figure 4.1.** Map showing the locality of Pedra Branca, district of Pirapetinga, municipality of Bom Jesus do Itabapoana, northwestern of the state of Rio de Janeiro, southeastern of Brazil.

**Figure 4.1**



## **5. CAPÍTULO 3**

### **Código de barras de DNA de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) neotropicais: identificação e descoberta de espécies para o Brasil**

Nesse estudo, um fragmento do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I (COI) foi seqüenciado para espécimes coletadas em diferentes localidades do Brasil e pertencentes a 47 espécies de flebotomíneos, distintas morfológicamente. O objetivo foi testar a eficiência dessa ferramenta em discriminar entre espécies diferentes de flebotomíneos e associar corretamente machos e fêmeas para gêneros cujas fêmeas são muito similares entre as espécies. Diversos exemplares coletados nos trabalhos dos capítulos 1 e 2 foram analisados.

#### **Referência bibliográfica:**

Pinto IS, Chagas BD, Rodrigues AAF, Ferreira AL, Rezende HR, Bruno RV, Falqueto A, Andrade-Filho JD, Galati EAB, Shimabukuro PHF, Brazil RP, Peixoto AA. DNA barcoding of Neotropical sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): species identification and discovery within Brazil. Submetido para publicação

## **TITLE**

DNA barcoding of Neotropical sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): Species identification and discovery within Brazil.

## **AUTHORS**

ISRAEL DE S. PINTO<sup>1,2,\*</sup> BRUNA D. DAS CHAGAS<sup>1</sup>, ANDRESSA A.F. RODRIGUES<sup>3</sup>, ADELSON L. FERREIRA<sup>2</sup>, HELDER R. REZENDE<sup>2</sup>, RAFAELA V. BRUNO<sup>1,4</sup>, ALOISIO FALQUETO<sup>2</sup>, JOSÉ D. ANDRADE-FILHO<sup>5</sup>, EUNICE A.B. GALATI<sup>6</sup>, PALOMA H.F. SHIMABUKURO<sup>5</sup>, REGINALDO P. BRAZIL<sup>3</sup>, AND ALEXANDRE A. PEIXOTO<sup>1,†</sup>.

## **ADDRESSES**

<sup>1</sup> Laboratório de Biologia Molecular de Insetos, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Brasil Ave. 4365, 21040360, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

<sup>2</sup> Unidade de Medicina Tropical, UFES, Marechal Campos Ave. 1468, 29043900, Vitória, Espírito Santo, Brazil.

<sup>3</sup> Laboratório de Doenças Parasitárias, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Brasil Ave. 4365, 21040-360, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

<sup>4</sup> Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular – INCT-EM/CNPq, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>5</sup> Grupo de Estudos em Leishmanioses, Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Augusto de Lima Ave. 1715, 30190002, Belo Horizonte, MG, Brazil.

<sup>6</sup> Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública, USP, Dr. Arnaldo Cerqueira Cesar Ave. 715, 01246904, São Paulo, SP, Brazil.

† In memoriam

\* Corresponding author: Israel de Souza Pinto, Laboratório de Biologia Molecular de Insetos, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Brasil Ave. 4365, 21040360, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, fax number +552138658231, pintoisrael@gmail.com

## **KEYWORDS**

*Cytochrome c oxidase subunit I*, Phlebotominae, cryptic species, molecular systematics.

## **RUNNING TITLE**

**ABSTRACT**

DNA barcoding has been an effective tool for species identification in several animal groups. Here, we used DNA barcoding to discriminate between 47 morphologically distinct species of Brazilian sand flies. DNA barcodes correctly identified approximately 90% of the sampled taxa (42 morphologically distinct species), of which four species showed comparatively higher maximum values of divergence (range 4.23–19.04%), indicating cryptic diversity. The DNA barcodes also corroborated the resurrection of two species within the shannoni complex and provided an efficient tool to differentiate between morphologically indistinguishable females of closely related species. Taken together, our results validate the effectiveness of DNA barcoding for species identification and the discovery of cryptic diversity in sand flies from Brazil.

## INTRODUCTION

Sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) are small insects that are considered the main vectors of *Leishmania* Ross parasites, the etiologic agents of the leishmaniasis. These insects are also vectors of other pathogens, including *Bartonella* Strong *et al.* and Phleboviruses (Ready 2013). Currently, there are over 520 species of sand flies recorded for the Neotropical region, with higher species richness in Brazil (Galati 2003a, 2014). This high species richness is an effect of differences among Brazilian biomes, which range from rainforests such as the Amazon and the Atlantic forests, to dry areas of *cerrado* and *caatinga*. Each biome has a different biogeographic history, created by events that shaped the landscape and molded the geographical distribution of animals, including sand flies and their amphibian, reptilian, avian, and mammalian hosts (Costa *et al.* 2000; Costa 2003; Watts *et al.* 2005; Santos *et al.* 2007; Carnaval & Moritz 2008). Vicariance, a historical event characterized by the geographical separation and isolation of a subpopulation, for example, can lead to speciation due reduced gene flow between subpopulations of the same species (Avice 2000; Ridley 2004). As a result of these geographical barriers, subpopulations begin to evolve independently and to accumulate genetic differences that can lead to speciation. In the event of speciation, a subpopulation loses the ability to mate successfully with other subpopulations, even if the geographical barrier is later removed. Over time, distinct morphological characters can also evolve; however, morphological differentiation tends to take longer because changes in morphological traits require changes in multiple genes (Coyne & Orr 2004; Ridley 2004). Morphological differences among species have been the basis of taxonomy and classification for several groups of animals, including phlebotomine sand flies (Lewis 1971, Young & Duncan 1994; Galati 2003a, b; Sinclair *et al.* 2007).

Currently, there are two classification systems for American sand flies. The first classification divided the New World sand fly species into three genera: *Warileya* Hertig, *Brumptomyia* França & Parrot, and *Lutzomyia* França. *Lutzomyia* was subdivided further into several subgenera and species groups (Lewis 1977; Young & Duncan 1994). The second classification also recognized the genera *Warileya*, *Brumptomyia* and *Lutzomyia*, but elevated several subgenera and species groups within the *Lutzomyia* genus (*sensu* Lewis 1977; Young & Duncan 1994) to the generic rank (Galati 1995, 2003a). This latter classification is preferred among Brazilian taxonomists because it provides a well-supported hypothesis about the evolutionary relationships among the species and genera within Phlebotominae (Beati *et al.* 2004; Andrade-Filho *et al.* 2009; Pinto *et al.* 2010a; Rodrigues *et al.* 2013). Despite the additional generic ranking for some species, both sand fly classifications are based only on morphological characters. This method of morphology-based identification is limited by the

inability to recognize different species that may be components of a cryptic species complex, that is, subpopulations in the early stages of speciation that have not yet evolved morphological differences. For example, the morphology of females from closely related species of sand flies belonging to *Brumptomyia*, *Evandromyia* Mangabeira, *Pressatia* Mangabeira, and *Trichophoromyia* Barretto are too similar to allow species discrimination (Virgens *et al.* 2008; Oliveira *et al.* 2012; Ferreira *et al.* 2013; Figueira *et al.* 2013, Ladeia-Andrade *et al.* 2014). Additionally, morphology-based identifications may lead to the inappropriate grouping of subpopulations into different species because of phenotypic plasticity. There are several examples of phenotypic plasticity among sand flies (Andrade-Filho *et al.* 2004; Galati *et al.* 2010; Pinto *et al.* 2010b; Sanguinette *et al.* 2013) as well as misidentification due to it (Shannon & Del Ponte 1927; Coutinho & Barretto 1940). Nevertheless, correct species identification is critical, particularly for species of epidemiological importance (Rivera & Currie 2009; Gutierrez *et al.* 2014). Therefore, the use of reliable tools for species identification to support morphology-based identification systems must be encouraged. One promising approach to the diagnosis of biological diversity is DNA barcoding, a microgenomic identification system that allows species identification through the analysis of a small segment of the genome (Hebert *et al.* 2003a, b). By using a 658 bp fragment from the mitochondrial gene, *cytochrome c oxidase subunit I (COI)*, this method has facilitated the identification and discovery of new species among many taxa of insects, including butterflies, black flies and mosquitoes (Hebert *et al.* 2004; Rivera & Currie 2009; Ruiz-Lopez *et al.* 2012). Previous studies have successfully utilized DNA barcoding to identify cryptic species of sand flies (Kumar *et al.* 2012) and to validate species that were previously identified based on morphology (Azpurua *et al.* 2010; Gutierrez *et al.* 2014); however, DNA barcoding has never been applied to the identification of Brazilian sand flies. Because of high sand fly species richness in the Neotropical region, and lack of distinguishing morphological characters among females of some closely related species, we sought to test the utility of the DNA barcode approach in species identification of phlebotomine sand flies in Brazil.



## **MATERIALS AND METHODS**

### **Sand fly Collection and Morphological Identification**

Sand flies were collected between 2011 and 2013 from 19 municipalities distributed across five Brazilian states: State of Mato Grosso: 1) Cáceres (16°24'08" S; 57°29'55" W; 286 meters at the sea level – a.s.l.); State of Minas Gerais: 2) Lagoa Santa (10°45'48" S; 48°06'32" W; 740 m a.s.l.); State of Bahia: 3) Wenceslau Guimarães (13°35'04" S; 39°42'32" W; 455 m a.s.l.); State of Rio de Janeiro: 4) Bom Jesus do Itabapoana (21°03'25" S; 41°47'31" W; 500 m a.s.l.); State of Espírito Santo: 5) Afonso Cláudio (20°12'53" S; 41°02'31" W; 1030 m a.s.l.), 6) Alfredo Chaves (20°29'25" S; 40°57'28" W; 1069 m a.s.l.), 7) Alto Rio Novo (18°58'35" S; 41°00'43" W; 762 m a.s.l.), 8) Baixo Guandu (19°21'04" S; 40°49'48" W; 719 m a.s.l.), 9) Domingos Martins (20°24'01" S; 40°45'11" W; 673 m a.s.l.), 10) Ibitirama (20°28'41" S; 40°42'19" W; 842 m a.s.l.), 11) Itaguaçu (19°44'13" S; 40°58'09" W; 871 m a.s.l.), 12) Iúna (20°21'02" S; 41°43'27" W; 851 m a.s.l.), 13) João Neiva (19°48'07" S; 40°30'23" W; 632 m a.s.l.), 14) Mantenópolis (18°51'09" S; 41°03'59" W; 661 m a.s.l.), 15) Marilândia (19°19'04" S; 40°31'01" W; 581 m a.s.l.), 16) Pancas (19°13'44" S; 40°45'31" W; 133 m a.s.l.), 17) Santa Leopoldina (20°08'16" S; 40°30'57" W; 51 m a.s.l.), 18) Santa Maria de Jetibá (19°58'54" S; 40°48'46" W; 844 m a.s.l.), 19) Santa Teresa (19°54'30" S; 40°39'25" W; 754 m a.s.l.). A map with these localities is shown in Figure 5.1.

The sand flies were captured using light traps (HP model) (Pugedo *et al.* 2005) placed within the peridomiciliary environment and/or forest environment from 18:00 to 06:00. The insects were stored in 80% ethanol and transported to the laboratory where they were screened and separated. Sand fly legs were separated for subsequent DNA extraction, and the sand fly body was mounted on glass slides as reported by Barretto and Coutinho (1940) for identification of the species based on morphological characters (Galati 2003a, Sábio *et al.* 2014), using the classification of Galati (1995, 2003b). The generic names abbreviations followed Marcondes (2007). Sand fly vouchers were deposited in the Coleção de Flebotomíneos (COLFLEB) of the Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Belo Horizonte, state of Minas Gerais.

### **Genomic DNA Extraction and Analysis**

Genomic DNA extraction was performed using legs of the sand fly specimen. Genomic DNA extraction was performed as reported by Jowett (1998), except for the total volume of extraction buffer which was 20 µL, samples were incubated overnight at 37 °C. Polymerase chain reaction (PCR) was performed to amplify a 658 bp fragment of the *COI*

gene, to a final volume of 50  $\mu$ L reaction mixture containing 2  $\mu$ L of genomic DNA template, 25  $\mu$ L 2X Promega Go *Taq* Green™ Master Mix (Promega, Madison, WI, USA), and the primers LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') and HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') to a final concentration of 1.0  $\mu$ M (Folmer *et al.* 1994). The reaction cycle consisted of an initial denaturation step of 95 °C for 3 min, followed by 37 cycles of 95 °C for 1 min, 50 °C for 1 min, 72 °C for 1.5 min, and a final extension cycle 72 °C for 7 min. The amplified fragments were separated by agarose (2%) gel electrophoresis and purified using Illustra GFX PCR DNA™ and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA). The purified fragments subsequently were sequenced bidirectionally at Fundação Oswaldo Cruz (PDTIS/FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil with an ABI 3730 sequencer, using the same primers that were used in PCR.

### Sequence Analysis

The forward and reverse sequences for each specimen were aligned using Clustal W (Thompson *et al.* 1994) and edited to generate a consensus sequence using BioEdit 7.0 (Hall 1999). The “Sequence Composition” tool in BOLD (Barcode of Life Database—[www.boldsystems.org](http://www.boldsystems.org)) was used to evaluate nucleotide content of the sequences.

Pairwise nucleotide sequence divergence was estimated between all sequences using the Kimura 2-parameter (K2P) model (Kimura 1980) implemented in MEGA 6.0 (Tamura *et al.* 2013). We used the K2P model for two reasons: (1) it makes fewer assumptions about the nature of sequence changes than more heavily parameterized models (Hebert *et al.* 2003a; Barrett & Hebert 2005) and (2) it provides a more conservative estimate of long branches than more complex models, by underestimating the number of multiple hits (Nei & Kumar 2000). Levels of genetic divergence within genera and species were calculated in BOLD using the “Distance Summary” tool. Calculations of intraspecific divergence were limited to those species that were represented by at least three specimens and whose DNA sequences showed nucleotide substitutions. Female specimens that were identified only at genus level due to morphological similarities among congeners were not used in the analyses at the species level.

The K2P distances were used in MEGA 6.0 to conduct a neighbor-joining (NJ) analysis and to build a dendrogram showing the similarity among taxa, including bootstrap analysis (1000 replications). One black fly species (Diptera, Simuliidae), *Simulium metallicum s. l.* (GenBank number: KC015102.1), and two mosquitoes species (Diptera, Culicidae), *Ochlerotatus canadensis* (GenBank number: JX259544.1) and *Culex pipiens pallens* (GenBank number: JQ350727.1), were used as outgroups. MEGA 6.0 was also used to inspect the parsimony informative sites among closest species with little to no

morphological differentiation and to highlight the fixed differences (defined as sites at which all of the sequences in one sample are different from all of the sequences in a second sample) among its sequences.

### **Molecular Identification of Species**

The ABGD software (Automatic Barcode Gap Discovery) (Puillandre *et al.* 2012) was used to find potential barcode gaps and for primary species delimitation. ABGD sorts sequences into hypothetical species based on the barcode gap, which can be observed whenever the intraspecific divergence is smaller than the interspecific divergence. ABGD uses a range of prior intraspecific divergences to infer a confidence limit for intraspecific divergence from within the data and then identifies and uses the barcode gap to partition the data. The inferred confidence limit and barcode gap are then recursively applied until the data is maximally partitioned. We limited the default range of intraspecific divergence between 0.001 and 0.1. Species were assigned the status of provisional species, indicated by the addition of the suffix PS to the species name, if they split into two or more distinct groups with sequence divergences between them that greater than value of the barcode gap found by ABGD. We used high bootstrap support values ( $\geq 80\%$ ) for the groups to corroborate the data and morphological identification to solve problems regarding species groups with low congener divergence.

### **Statistical Analysis**

Regression analysis was performed using STATISTICA (StatSoft 2011), to test (1) the relationships between sample size and intraspecific sequence divergence (mean and maximum) and (2) the relationships between sequence divergence and geographical distance within each species. The geographical distances between the collections sites were estimated using the Geographic Distance Matrix Generator version 1.2.3 (Ersts 2014).

## RESULTS

A total of 576 specimens of Brazilian sand flies, belonging to 47 morphologically classified species and 14 genera, were collected and subjected to barcode analysis (Table 5.1 - Supporting Information S1). A number of species was selected based on their epidemiological importance, including *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) and *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira) vectors of *Leishmania infantum* Nicolle, *Bichromomyia flaviscutellata* (Mangabeira) vector of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Lainson & Shaw and *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho) and *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva) vectors of *Leishmania (Viannia) braziliensis* Vianna. Other species, including *Migonemyia migonei* (França), *Pintomyia fischeri* (Pinto), *Psychodopygus ayrozai* (Barretto & Coutinho), *Psychodopygus davisii* (Root) and *Psychodopygus hirsutus* (Mangabeira), were selected because they were previously found to be infected by *Leishmania* parasites in some regions of Brazil (Lainson *et al.* 1973; Rangel *et al.* 1984; Arias *et al.* 1985; Gil *et al.* 2003; Rangel & Lainson 2003; Pita-Pereira *et al.* 2005, 2008; Carvalho *et al.* 2010, Rocha *et al.* 2010; Missawa *et al.* 2011; Falqueto & Ferreira 2013).

A 658 bp length *COI* amplicon was recovered from all 576 specimens. Sequences and original trace files are available in the “AFBR-DNA barcoding for identification of sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) from Brazil” project in BOLD and in GenBank (accessions numbers: KP112487 - KP113062) (Table 5.2 - Supporting information S2). The *COI* sequences from the sampled species showed an A + T bias (mean = 0.671) relative to the C + G content (mean = 0.329), as has been found previously for arthropods (Crease 1999; Rivera & Currie 2009). Individual mean nucleotide content was as follows: A = 0.290, G = 0.159, C = 0.170 and T = 0.381. The mean K2P sequence distance within nominal species was 1.41%, while the mean divergence between congeners was approximately 10-fold higher (13.34%). Frequency histograms of mean *COI* sequence divergences (K2P) at both the species and genus levels of the taxonomic hierarchy are shown in Figure 5.2. The NJ tree, built using the K2P distances between the specimens, is shown in Figure 5.3 and Figure 5.4 - Supporting Information S3.

Using ABGD, we identified nine values for potential barcode gaps (Figure 5.5 - Supporting Information S4). We only considered barcode gaps with values of prior intraspecific divergence between 1% and 2.5% because values below 1% or above 2.5% can overestimate or underestimate, respectively, the number of species. We found two values for barcode gaps within this range: 1.29% and 2.15%. Using the value of 2.15%, the species were partitioned into 48 groups, as indicated by one black dash (Figure 5.3). Using the value of 1.29%, the species were partitioned into 49 groups because one of the original 48 groups

[*Psychodopygus matosi* (Barretto & Zago)] was split in two groups, as indicated using one white dash (Figure 5.3). Seven species were not recognized by the ABGD partitioning: *Nyssomyia intermedia* was grouped with *Ny. whitmani*; *Ev. carmelinoi* (Ryan *et al.*) was grouped with *Evandromyia lenti* (Mangabeira) as indicated with two thin black dashes in the NJ tree (Figure 5.3); and *Lu. longipalpis*, which if analyzed separately, showed deep intraspecific variation that suggested it should form two groups. One of the two groups, comprising *Lu. longipalpis* specimens from the central-western region of Brazil, clustered with *Lu. cruzi* specimens, while the other group, comprising *Lu. longipalpis* from southeastern of Brazil, clustered with *Lutzomyia alencari* Martins, Souza & Falcão (Figure 5.3). Four nominal species, *Psathyromyia bigeniculata* (Floch & Abonnenc), *Evandromyia edwardsi* (Mangabeira), *Pintomyia monticola* (Costa Lima), and *Sciopemyia microps* (Mangabeira), showed deep intraspecific variation, forming two or more intraspecific barcode groups with mean divergence greater than 2.15% (Figure 5.3). *Psychodopygus matosi* showed moderate intraspecific variation and only formed two intraspecific barcode groups with mean divergence greater than 1.29% (Figure 5.3).

We found fixed differences within *Pa. bigeniculata*, *Ev. edwardsi*, *Pi. monticola*, and *Brumptomyia* genus and between *Evandromyia tupynambai* (Mangabeira) and *Evandromyia* spp. (Figure 5.6-5.10 - Supporting Information S5A-E). Because of the morphological similarities between the species, we also compared *Pa. bigeniculata* (PS1 and PS2) sequences to the sequences from *Pa. limai* (Fonseca). *Pa. limai* showed 41 fixed differences in relation to both provisional species of *Pa. bigeniculata* (PS1 and PS2), while *Pa. bigeniculata* PS1 showed nine fixed differences in relation to both *Pa. bigeniculata* PS2 and *Pa. limai*. Likewise, *Pa. bigeniculata* PS2 showed 13 fixed differences in relation to both *Pa. bigeniculata* PS1 and *Pa. limai*. These three species still showed one fixed difference among each other that can be used as diagnostic site (421<sup>st</sup> position of the *COI* sequence) (Figure 5.6 - Supporting Information S5.A). The three species within the *Ev. edwardsi* nominal species lacked a diagnostic site among them. However, *Ev. edwardsi* PS1 showed eight fixed differences in relation to *Ev. edwardsi* PS2 and PS3, while *Ev. edwardsi* PS2 showed ten fixed differences in relation to *Ev. edwardsi* PS1 and PS3, and *Ev. edwardsi* PS3 showed 16 fixed differences in relation to *Ev. edwardsi* PS1 and PS2 (Figure 5.7 - Supporting Information S5.B). The two species of *Pi. monticola* (PS1 and PS2) showed 36 fixed (Supporting Information Figure 5.8 - S5.C). The three species of the *Brumptomyia* genus showed seven fixed differences that can be used as diagnostic sites (Figure 5.9 - Supporting Information S5.D). *Evandromyia tupynambai* showed 27 fixed differences in relation to *Evandromyia* spp. (Figure 5.10 - Supporting Information S5.E).

According to regression analysis the mean intraspecific sequence divergence values (adjusted  $R^2 = -0.0265$ ,  $p = 0.587$ ) (Figure 5.11 - Supporting Information S6.A) and maximum intraspecific sequence divergence values (adjusted  $R^2 = -0.0372$ ,  $p = 0.861$ ) (Figure 5.12 - Supporting Information S6.B) were not significantly correlated to sample size. The sequences divergences were correlated to geographical distance (Supporting Information S7) within the species that follows: *Lutzomyia longipalpis* (adjusted  $R^2 = 0.4532$ ,  $p < 0.001$ ) (Figure 5.13 - Supporting Information S6.C), *Micropygomyia ferreirana* (Barretto, Martins & Pellegrino) (adjusted  $R^2 = 0.1950$ ,  $p < 0.001$ ) (Figure 5.14 - Supporting Information S6.D), *Micropygomyia schreiberi* (Martins, Falcão & Silva) ( $R^2 = 0.0677$ ,  $p < 0.001$ ) (Figure 5.15 - Supporting Information S6.E), *Mg. migonei* (adjusted  $R^2 = 0.0575$ ,  $p < 0.001$ ) (Figure 5.16 - Supporting Information S6.F), *Ny. intermedia* (adjusted  $R^2 = 0.0236$ ,  $p < 0.001$ ) (Figure 5.17 - Supporting Information S6.G), *Pintomyia bianchigalatae* (Andrade-Filho *et al.*) (adjusted  $R^2 = 0.8672$ ,  $p = 0.004$ ) (Figure 5.18 - Supporting Information S6.H), *Pi. fischeri* (adjusted  $R^2 = 0.0367$ ,  $p < 0.001$ ) (Figure 5.19 - Supporting Information S6.I), *Pintomyia misionensis* (Castro) (adjusted  $R^2 = 0.3576$ ,  $p < 0.001$ ) (Figure 5.20 - Supporting Information S6.J), *Pi. monticola* (adjusted  $R^2 = 0.3000$ ,  $p < 0.001$ ) (Figure 5.21 - Supporting Information S6.L), *Pa. bigeniculata* (adjusted  $R^2 = 0.9885$ ,  $p < 0.001$ ) (Figure 5.22 - Supporting Information S6.M), *Pa. limai* (adjusted  $R^2 = 0.0430$ ,  $p = 0.001$ ) (Figure 5.23 - Supporting Information S6.N), *Ps. matosi* (adjusted  $R^2 = 0.0145$ ,  $p < 0.001$ ) (Figure 5.24 - Supporting Information S6.O), and *Sc. microps* (adjusted  $R^2 = 0.9996$ ,  $p = 0.008$ ) (Figure 5.25 - Supporting Information S6.P).

## DISCUSSION

The molecular identification of species based on mitochondrial sequences of the *COI* gene, known as DNA barcoding, has been useful for species recognition and the discovery of different taxa of insect vectors of parasites (Rivera & Currie 2009; Kumar *et al.* 2012; Gutierrez *et al.* 2014). Here, we show that this is an effective tool for the discovery and the recognition of sand fly species from Brazil.

First, there was a possibility that we would not accurately detect amplification of the *COI* gene when using the sand fly genomic DNA. This concern was based on the amplification of *COI* nuclear pseudogenes of mitochondrial origin (NUMTs) in a small number of previous DNA barcode studies using animal DNAs (Bensasson *et al.* 2001; Kerr *et al.* 2007). The presence of NUMT contamination is often indicated by the presence of PCR ghost bands, extra bands in restriction profiles, sequence ambiguities in polymorphic sites, or when both template strands are sequenced, by the presence of frameshift mutations, stop codons, and unexpected phylogenetic placements (Bensasson *et al.* 2001). Additionally, in the DNA barcode studies, the amplicons generated from NUMT sequences often were shorter than the full-length barcode sequences of *COI* (Kerr *et al.* 2007). As shown above, all of the sequence reads from this study recovered full-length barcodes sequence, with no evidence of insertions, deletions, or stop codons, indicating the absence of NUMTs in the sequences analyzed. This finding is similar to a previous barcoding study that did not find NUMTs in Colombian sand fly species (Gutierrez *et al.* 2014). From our results, we concluded that *COI* sequences could reliably be used for barcode analysis in the Brazilian sand flies.

The DNA barcode analyses using the automatic partitioning performed by ABGD allowed us to correctly discriminate approximately 85% (40 species) of all previously morphologically identified species (Figure 5.3). This percentage becomes closer to 90% when we consider that the *COI* gene can be used to discriminate between *Ny. intermedia* and *Ny. whitmani*. Although the genetic divergence between these species was too low to allow partitioning by ABGD, *Ny. intermedia* and *Ny. whitmani* both are composed of monophyletic groups with high bootstrap support values (Figure 5.3). Even at 90%, this identification percentage was somewhat lower than the percentages found in DNA barcode studies of other sand fly fauna. The identification percentages from studies using Colombian and Indian sand flies, for example, were close to 100% (Kumar *et al.* 2012, Gutierrez *et al.* 2014). Nevertheless, a number of DNA barcode studies in which specimen for each species were collected from several localities showed discrimination percentages similar to those reported here (Clare *et al.* 2007, Rivera & Currie 2009). Differences between the species discrimination percentages of sand flies from Brazil and others regions may be related to

sampling effects. In the study of the Colombian sand flies, 36 species were collected from different geographic localities and analyzed, 31 of which included the analysis of more than one specimen; however, only ten of these 31 species were sampled from more than one locality. Two of these ten species, *Lutzomyia gomezi* (Nitzulescu) and *Psychodopygus panamensis* Shannon, showed the maximum intraspecific *COI* sequence divergence within one species (Gutierrez *et al.* 2014). This result suggests that the increase in sampling localities for each species could influence their discrimination percentages. Our data supports this possibility, since ABGD accurately delimited between species collected from the same locality. In the study of Indian sand flies, although the species were all collected from multiple localities, the high percentage of discrimination between the species may be explained by the small number of species analyzed (Kumar *et al.* 2012). The genetic distances between species also can be larger if some species are missing from the assemblage and, consequently, the delimitation becomes easier (Bergsten *et al.* 2012). This raised concerns regarding the effect of sample size and geographical scale of sampling in the *COI* sequence divergence (intraspecific genetic variation and interspecific genetic divergence to congeners) for sand flies from Brazil.

A global study using diving beetles showed that both intraspecific genetic variation and interspecific genetic divergence to congeners are correlated to the geographical scale of sampling (Bergsten *et al.* 2012). This correlation is supported by a number of theories and concepts, including those of isolation by distance and distance decay (Wright 1943; Nekola & White 1999). Therefore, it is expected that a species sampled from a wide geographical coverage will show greater genetic variation than if the variation was estimated in a species sampled from a single smaller region (Bergsten *et al.* 2012). As predicted, we found that intraspecific sequence divergence (K2P) in *COI* was significantly correlated to geographical distance (Figure 5.11-5.25 - Supporting Information S6.A-P) within several, but not all, of the species analyzed. Only *Pa. bigeniculata* (PS1 from Santa Leopoldina, state of Espírito Santo; and PS2 from Cáceres, state of Mato Grosso) and *Sc. microps* (PS1 from Iúna, state of Espírito Santo; and PS2 from Pancas, state of Espírito Santo) were clustered according to geographical distance. From these samples, we were able to infer that the barcoding gene reliably discriminates between the nominal species, even with correlation between the intraspecific sequence divergence (K2P) at *COI* and the geographical distance within some species.

The effects of geographical scale on sampling in the *COI* sequence divergence has been proposed to occur because the distance of one species to the closest heterospecific significantly decreases with increasing geographical scale of sampling (Bergsten *et al.* 2012);



however, our data did not corroborate this hypothesis. Though *Lu. longipalpis*, *Lu. cruzi* and *Lu. alencari* are closely related species (Galati 2003a; Pinto et al. 2010a; Vigoder et al. 2010), for example, specimens from these three species of the same geographical region showed less sequence divergence than the closest heterospecifics from others regions (Figure 5.3). *Lutzomyia longipalpis* specimens from Pancas, state of Espírito Santo, were closely related to *Lu. alencari* specimens from the same region, and *Lu. longipalpis* specimens from Cáceres, state of Mato Grosso clustered with *Lu. cruzi* specimens from the same region (Figure 5.3). Despite the morphological differences between these species, this low level of sequence divergence, suggests that *Lu. alencari* also belongs to the *Lu. longipalpis* complex. This possibility is further supported by the presence of a spot in the abdominal tergite of both species, which appears to be a synapomorphy of the *Lu. longipalpis* complex (Pinto et al. 2010a). The low sequence divergence found between these sympatric species can be the result of introgression (Lins et al. 2012; Araki & Ferreira et al. 2013), a common phenomenon among closely species that tends to occur much more readily in the mitochondrial DNA than in the nuclear DNA (Powell 1983; Bachtrog et al. 2006).

Introgression can also explain the low divergence found among *Ny. intermedia* and *Ny. whitmani* (Figure 5.3). The evidence of introgression among these species is corroborated by studies using mitochondrial DNA (mtDNA) and using nuclear DNA (Marcondes et al. 1997; Mazzoni et al. 2006, 2008). Introgression of mtDNA was detected in studies analyzing *cytochrome b* gene from females that morphologically were identified as *Ny. intermedia* specimens from Viana, state of Espírito Santo, but showed mtDNA haplotypes from *Ny. whitmani* (Marcondes et al. 1997). Likewise, introgression of nuclear DNA was detected by studies analyzing the *period* gene in order to differentiate species of the *Ny. intermedia* complex. This latter analysis indicated a low level of divergence, high similarities among sympatric sequences, and the presence of shared haplotypes between *Nyssomyia* species specimens from the locality of Posse, state of the Rio de Janeiro (Mazzoni et al. 2006, 2008). It is hard to distinguish introgression from the persistence of ancestral polymorphisms, but the introgression hypothesis has been the preferred model based on data analysis which suggested that *Ny. intermedia* and *Ny. whitmani* might be exchanging alleles (Mazzoni et al. 2006, 2008).

Unlike the results for *Ny. intermedia* and *Ny. whitmani*, the bootstrap values did not support the clades of *Ev. carmelinoi* and *Ev. lenti*, and ABGD was not able to discriminate between them (Figure 5.3), indicating very low sequence divergence between these species. These two species are very similar morphologically, but can be differentiated by the male genital filamental tips (genital filament tips arrow-like and elongate 1/8<sup>th</sup> the length of the

genital filaments for *Ev. lenti*; and genital filaments scrolled less than 1/20<sup>th</sup> the length of genital filaments for *Ev. carmelinoi*) and differences in the spermathecae of females (ratio of the widths of common/individual ducts is 1.5-fold higher in *Ev. lenti* than in *Ev. carmelinoi*) (See figures 4 (1-2) and 5 (1-2) from Ryan *et al.* 1986). Unfortunately, we were only able to evaluate a small number of specimens from these two species, and the sequence divergence among them (0.1% approximately) was lower than the mean of intraspecific *COI* sequence divergence within almost of all the species (Supporting Information S1). Nonetheless, we expected that collecting the species from well separated sites (*Ev. carmelinoi* from Cáceres, state of Mato Grosso and *Ev. lenti* from Pancas, state of Espírito Santo), would favor reduction of the gene flow, thereby increasing sequence divergence. Furthermore, this similarity of sequences cannot be explained by the phenomenon of decreasing interspecific divergence with increasing geographical scale of sampling, because the geographical distance among the areas (Supporting Information S7) is not enough to achieve such similarity (See Fig. 4 from Bergsten *et al.* 2012). If these two nominal species really represent two different taxa, the only likely explanation is that strong introgressive hybridization occurs between *Ev. carmelinoi* and *Ev. lenti* in Cáceres, where these two species are sympatric (Alves *et al.* 2012). It should be noted, however, that only *Ev. lenti* has been reported in Pancas. Molecular and morphological revision of the species group using a larger number of specimens from several localities throughout its distribution range is required to resolve this discrepancy.

While our study was in progress, the shannoni group of the genus *Psathyromyia* was revised (Sábio *et al.* 2014), including species previously reported for the state of Espírito Santo as *Psathyromyia shannoni* (Dyar) and *Psathyromyia pestanai* (Barretto & Coutinho) (Pinto *et al.* 2010c,d, 2012). From the revision, two species of the shannoni complex, *Pa. bigeniculata* and *Pa. limai*, were resurrected from the synonymy of *Pa. shannoni*, while a third species, *Pa. pestanai*, was proposed to be a junior synonym of *Pa. limai* on the basis of morphological characters. Therefore, we reexamined all slides of the specimens morphologically identified as *Pa. shannoni* from states of Espírito Santo state and Mato Grosso and found them to be *Pa. bigeniculata* from Cáceres, Mato Grosso and from Santa Leopoldina, state of Espírito Santo. We also found *Pa. limai* from the remaining areas of the state of Espírito Santo. Corroborating the results of the morphological revision, the DNA barcode discriminated between *Pa. limai* and *Pa. bigeniculata*, showing a high mean sequence divergence (10%) between them (Figure 3). It is noteworthy that the DNA barcode analysis from our study split the specimens of *Pa. bigeniculata* into two groups (PS1 from state of Espírito Santo and PS2 from Cáceres from state of Mato Grosso) that represent putative species within the *Pa. bigeniculata* complex (Figure 5.3). These groups had a high

number of fixed differences among them, including a diagnostic site (421<sup>st</sup> position of the 658 bp fragment of *COI* gene) that enabled identification of *Pa. bigeniculata* (PS1 and PS2) and *Pa. limai* (Supporting information S5.A). Based on the distribution of the analyzed specimens, *Pa. bigeniculata* PS1 represented a coastal species (Atlantic Forest) and *Pa. bigeniculata* PS2 represented an interior species (*cerrado*). Besides supporting the resurrection of two species within the shannoni group that are morphologically similar, the DNA barcode also provided a reliable method to discriminate among them, corroborating the utility of the DNA barcode for sand fly identification.

Our analyses also suggested that three other nominal species belongs to cryptic species complex: *Ev. edwardsi*, *Pi. monticola*, and *Sc. microps*. *Evandromyia edwardsi* was split into three species (PS1, PS2, and PS3) (Figure 3), each with fixed differences in relation to the other species (Supporting information S5.B), but without a diagnostic site. The fixed differences set can be used to differentiate between these three species within the *Ev. edwardsi* complex. *Evandromyia edwardsi* does not morphologically resemble other sand fly species, and therefore, can be easily identified based on the male paramere and shape of the spermathecae of the female. This morphological distinction and the low number of specimens collected throughout the distribution range of *Ev. edwardsi* might have contributed to the failure to recognize slight morphological differences among them. We also failed to find morphological differences within the *Pi. monticola* complex; however, fixed differences in the *COI* sequences resulted in diagnostic sites useful for distinguishing the two species (PS1 and PS2), which were split with substantial mean sequence divergence among them (8.1%) (Figure 3, Supporting Information S5.C). We found slight morphological differences between the females of the two species (PS1 and PS2) within *Sc. microps*, which also showed high mean sequence divergence among them (11.9%). *Sciopemyia microps* PS1 was composed of one female specimen, while *Sc. microps* PS2 was composed of two male and two female specimens, identified as *Sciopemyia* sp. The females grouped as *Sc. microps* PS2 were morphologically identified as *Sciopemyia* sp. because, due to slide preparation, it was not possible to exam the spermathecae, and because the cibarium (horizontal teeth less-development) was very different from the morphological description of the females of *Sc. microps* (horizontal teeth well-developed). Unlike the *Sc. microps* PS2 females, the female of *Sc. microps* PS1 was morphologically similar to the description of *Sc. microps* (Martins *et al.* 1975), with well-developed horizontal teeth in the cibarium. Two other female specimens (Sc\_sp255f and Sc\_sp299f, Supporting Information S3) were also identified as *Sciopemyia* sp. and were partitioned into a third species based on our DNA barcode analyses (Figure 5.3). This result supports a previous sand fly survey of the area, which identified these specimens

as belonging to *Sc. aff. microps* rather than *Sc. microps* (Ferreira *et al.* 2013) because of differences in the diameter of the female spermathecae ducts (AL Ferreira, *personal communication*). These slight morphological differences are difficult to detect and require considerable technical skills. Therefore, DNA barcode analysis is a useful alternative for discriminating among specimens with small morphological differences.

Finally, the DNA barcode analysis was able to associate morphologically indistinguishable females with males of the genera *Brumptomyia*, *Evandromyia*, and *Pressatia*. Based on the male morphology, three species of *Brumptomyia* [*Brumptomyia cunhai* Mangabeira, *Brumptomyia ortizi* Martins, Silva & Falcão, and *Brumptomyia nitzulescui* (Costa Lima)] were identified and all the females were identified as *Brumptomyia* sp. The specimens of *Br. cunhai* were collected from a sand fly survey from Pancas, Espírito Santo and females from this locality were not analyzed. Unfortunately, this species was not included in the sand fly survey from that area because, at that time, *Br. cunhai* specimens were misidentified as *Br. nitzulescui* (Ferreira *et al.* 2013). Since the initial survey, we performed a morphological revision of the specimens based on a preliminary barcode analyses which indicated two groups of *Br. nitzulescui* (one from Pancas and others from others areas). Indeed, we find that the group from Pancas was composed of specimens of *Br. cunhai*. This result highlights the importance of integrative approaches based on morphology and molecular biology to reach accurate results with sand fly identification. In our study, *Br. cunhai* showed 46 fixed differences in relation to *Br. ortizi* and *Br. nitzulescui*, including seven fixed differences that can be used as diagnostic sites among these three species. Besides the seven diagnostic sites, *Br. ortizi* showed 26 fixed differences in relation to *Br. cunhai* and *Br. nitzulescui* (Supporting Information S5). Five of the ten females identified as *Brumptomyia* sp. were grouped with the *Br. ortizi* males, sharing its fixed differences in relation to others *Brumptomyia* species. The automatic partitioning by ABGD also indicated that these females belong to *Br. ortizi* taxon. In addition to the similarities between the *COI* gene sequences, the specimens were collected at the same locality, which further supports that they belong to the same taxon. This finding is very interesting and underscores the suitability of DNA barcoding for describing *Br. ortizi* females, since females of *Br. ortizi* have not been previously described (Galati 2003a) because it is morphologically similar to other females of the *Brumptomyia* genus. Females of *Br. nitzulescui* can be morphologically differentiated from five others *Brumptomyia* species, but when sympatric with others species (Shimabukuro *et al.* 2011), the differentiation is difficult to achieve. Our DNA barcode analysis clustered five *Brumptomyia* females specimens within the *Br. nitzulescui* clade, which showed a high number of fixed differences and, consequently, high sequence divergence in relation to others

*Brumptomyia* species. As noted for *Br. ortizi*, this result highlights the utility of the DNA barcode tool for sand fly species identification and its potential for female and male species association, even for species without formal morphological description of both sexes. Our DNA barcode analysis also indicated an association between the males and the females of the *Evandromyia* genus. *Evandromyia tupynambai* was described for both sexes, but when found to be sympatric with *Evandromyia callipyga* (Martins & Silva) or *Evandromyia costalimai* (Mangabeira) the females of these three species cannot be distinguished. We did not analyze the males of *Ev. callipyga* or *Ev. costalimai*; however our data suggest that the barcode gene can discriminate among these species since the females identified as *Evandromyia* sp. were clustered in two different groups with high sequence divergence and fixed differences among them (Figure 5.3). The first group belonged to *Ev. tupynambai* and was composed of females. The second group of three females belonged to either to *Ev. callipyga* or *Ev. costalimai*, but could not be distinguished further because of morphological similarities with the females of *Ev. tupynambai* of the first group and because we did not analyze DNA barcode from their males. The high genetic difference among the females further underscores the usefulness of the DNA barcode method for associating males with females of a species. Finally, we provided a DNA barcode profile for the females of the *Pressatia* genus, which indicated that these females belong to *Pressatia choti* (Floch & Abonnenc) (Figure 5.3). This result is supported by the absence of other *Pressatia* species in the region where our specimens were collected (Ferreira *et al.* 2013).

In conclusion, except in cases of species that have undergone introgressive hybridization, DNA barcoding allowed discrimination of sand fly species from Brazil and the discovery of species within putative sand fly species complex. This method also reliably detected sand fly species misidentification and allowed the association between males and females among species that are morphologically similar. Finally, this study highlights the importance of utilizing integrative approaches for sand fly species identification in order to achieve accurate and reliable results.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank Agenor Barbosa, Antonio Teva, Daniel Kiefer, Felipe Vigoder, Gabriela Thomazim, João F. R. Tonini, Luiz G. S. R. Bauzer and Mateus Borges for the help in the fieldwork. We also thank Gustavo R. Leite for the preparation of the map, Elisa Cupolillo for comments on an earlier version of the manuscript, and Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) for provide the collecting permissions. This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) and FIOCRUZ. We are grateful to the Plataforma Genomica-Sequenciamento de DNA- RPT01A- PDTIS/FIOCRUZ.

## REFERENCES

- Alves GB, Oshiro ET, Leite MC, Melão AV, Ribeiro LM, Mateus NLF, Brazil RP, Andrade-Filho JD, Oliveira AG (2012) Phlebotomine sandflies fauna (Diptera: Brazil) (Diptera: Psychodidae) at rural settlements in the municipality of Cáceres, State of Mato Grosso, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **45**, 437-443.
- Andrade-Filho JD, Carvalho GML, Saraiva L, Falcão AL (2004) Bilateral anomaly in the style of *Micropygomyia schreiberi* (Martins, Falcão & Silva) (Diptera, Psychodidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, **48**, 583-585.
- Andrade-Filho JD, Galati EAB, Brazil RP (2009) Review of American fossil Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) with a description of two new species. *Journal of Medical Entomology*, **46**, 969-979.
- Araki AS, Ferreira GEM, Mazzoni CJ, Souza NA, Machado RC, Bruno RV, Peixoto AA (2013) Multilocus analysis of divergence and introgression in sympatric and allopatric sibling species of the *Lutzomyia longipalpis* complex in Brazil. *PLoS Neglected Tropical Disease*, **7**, e2495.
- Arias JR, Miles MA, Naiff RD, Povoá MM, Freitas RA, Biancardi CB, Castellón EG (1985) Flagellate infections of Brazilian sand flies (Diptera: Psychodidae): isolation in vitro and biochemical identification of *Endotrypanum* and *Leishmania*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **34**, 1098-1108.
- Avice JC (2000) Phylogeography: the history and formation of species. In: *Harvard University Press Cambridge, MA: Harvard University Press*.
- Azpurua J, De La Cruz D, Valderama A, Windsor D (2010) *Lutzomyia* sand fly diversity and rates of infection by *Wolbachia* and an exotic *Leishmania* species on Barro Colorado Island, Panama. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, **4**, e627.
- Bachtrog D, Thornton K, Clark A, Andolfatto P (2006) Extensive introgression of mitochondrial DNA relative to nuclear genes in the *Drosophila yakuba* species group. *Evolution*, **60**, 292–302.
- Barrett RDH, Hebert PDN (2005) Identifying spiders through DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology*, **83**, 481–491.
- Barretto MP, Coutinho JO (1940) Contribuição ao conhecimento dos *Flebotomus* de São Paulo. II – Descrição do macho de *Phlebotomus limai* Fonseca, 1935 e de duas novas espécies: *Phlebotomus ayrozai* e *P. amarali* (Diptera, Psychodidae). *Arquivos da Faculdade de Higiene e Saúde Pública*, **6**, 34-35.
- Beati L, Cáceres AG, Lee JA, Munstermann LE (2004) Systematic relationships among *Lutzomyia* sand flies (Diptera: Psychodidae) of Peru and Colombia based on the

analysis of 12S and 28S ribosomal DNA sequences. *International Journal of Parasitology*, **34**, 225-234.

Bensasson D, Zhang D, Hartl DL, Hewitt GM (2001) Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. *Trends in Ecology & Evolution*, **16**, 314-321.

Bergsten J, Bilton DT, Fujisawa T, Elliott M, Monaghan M, Balke M, Hendrich L, Geijer J, Herrmann J, Foster GN, Ribera I, Nilsson AN, Barraclough TG, Vogler AP (2012) The effect of geographical scale of sampling on DNA barcoding. *Systematic Biology*, **61**, 851-869.

Carnaval AC, Moritz C (2008) Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic Forest. *Journal of Biogeography*, **35**, 1187-1201.

Carvalho MR, Valença HF, Silva FJ, Pita-Pereira D, Pereira TA, Britto C, Brazil RP, Brandão-Filho SP (2010) Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (França, 1920) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. *Acta Tropica*, **116**, 108-110.

Clare EL, Lim BK, Engstrom MD, Eger JL, Hebert PDN (2007) DNA barcoding of Neotropical bats: species identification and discovery within Guyana. *Molecular Ecology Notes*, **7**, 184-190

Coutinho JO, Barretto MP (1940) Contribuição para o conhecimento dos flebotomos do estado de São Paulo. III. Descrição do macho de *Phlebotomus alphabeticus* Fonseca, 1936 e de *Phlebotomus pascalei* n. sp. (Diptera: Psychodidae). *Anais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo*, **16**, 193-206.

Costa LP (2003) The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. *Journal of Biogeography*, **30**, 71-86.

Costa LP, Leite YLR, Fonseca GAB, Fonseca MT (2000) Biogeography of South American forest mammals: endemism and diversity in the Atlantic Forest. *Biotropica*, **32**, 872-881.

Coyne JA, Orr HA (2004) Speciation. In: *Sinauer Associates, Inc* Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc.

Crease TJ (1999) The complete sequence for the mitochondrial genome of *Daphnia pulex* (Cladocera: Crustacea). *Gene*, **233**, 89-99.

Ersts PJ (2014) Geographic Distance Matrix Generator (version 1.2.3). American Museum of Natural History, Center for Biodiversity and Conservation. Available from [http://biodiversityinformatics.amnh.org/open\\_source/gdmg](http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/gdmg). Accessed on 22 august 2014.



Falqueto A, Ferreira AL (2013) Reservatórios extra-humanos do complexo Leishmânia e dinâmica de transmissão da infecção ao homem. In: Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. 2ed (J.R. Coura, ed.). Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 786-797.

Ferreira AL, Falqueto A, Grimaldi G, Peixoto AA, Pinto IS (2013) Ecological and Epidemiological Aspects of the Sand Fly (Diptera, Psychodidae) Fauna of the National Monument of Pontões Capixabas, State of Espírito Santo, Southeastern Brazil. *Journal of Medical Entomology*, **50**, 1215-1223.

Figueira EAG, Silva G, Chagas ECS, Shimabukuro PHF (2013) Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) from Lábrea, state of Amazonas, Brazil, with a description of *Evandromyia (Aldamyia) apurinan* Shimabukuro, Figueira & Silva, *sp. nov.* *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **108**, 280-287.

Floch H, Abonnenc E (1941) Phlébotomes de La Guyane Française (II). *Institut Pasteur de la Guyane et du territoire de l'Inini*, **28**, 1-16.

Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R., Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **3**, 294–299.

Galati EAB (1995) Phylogenetic systematics of the Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) with emphasis on American groups. *Boletín de La Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental*, **35**: 133-142.

Galati EAB (2003a) Morfologia, terminologia de adultos e identificação dos táxons da América. In *Flebotomíneos do Brasil* (E.F. Rangel & R. Lainson, org.). Fiocruz, Rio de Janeiro, p.53-175.

Galati EAB (2003b) Classificação de Phlebotominae. In *Flebotomíneos do Brasil* (E.F. Rangel & R. Lainson, org.). Fiocruz, Rio de Janeiro, p.23-51.

Galati EAB (2014) Phlebotominae (Diptera, Psychodidae). Classificação, morfologia, terminologia e identificação de Adultos. Apostila da Disciplina HEP 5752 - Bioecologia e Identificação de Phlebotominae 2014, Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo. <[www.fsp.usp.br/~egalati](http://www.fsp.usp.br/~egalati)>. Accessed on 22 august 2014.

Galati EAB, Marassá AM, Fonseca MB, Gonçalves-Andrade RM, Consales CA, Bueno EFM (2010) Phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in the Speleological Province of the Ribeira Valley: 3. Serra district - area of hostels for tourists who visit the Parque Estadual do Alto Ribeira (PETAR), state of São Paulo, Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*, **54**, 665–676.

Gil LHS, Basano SA, Souza AA, Silva MGS, Barata I, Ishikawa EA, Camargo LMA, Shaw JJ (2003) Recent observations on the sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna of the State of Rondônia, Western Amazônia, Brazil: the importance of *Psychodopygus davisii* as a vector of zoonotic cutaneous leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **98**, 751-755.

Gutiérrez MAC, Vivero RJ, Vélez ID, Porter CH, Uribe S (2014) DNA Barcoding for the identification of sand fly species (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in Colombia. *Plos One*, **9**, e85496.

Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**, 95-98.

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR (2003a) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **270**, 313–321.

Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W (2004) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the Neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* , **101**, 14812–14817.

Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR (2003b) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **270**, S96–S99.

Jowett T (1998) Preparation of nucleic acids. In: Roberts DB, ed. *Drosophila: A practical approach*. Oxford: IRL Press. 347–371.

Kerr KCR, Stoeckle MY, Dove CJ, Weigt LA, Francis CM, Hebert PDN (2007) Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. *Molecular Ecology Notes*, **7**, 535-543.

Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, **16**, 111–120.

Kumar NP, R. Srinivasan R, Jambulingam P (2012) DNA barcoding for identification of sand flies (Diptera: Psychodidae) in India. *Molecular Ecology Resources*, **12**, 414–420.

Ladeia-Andrade S, Fé NF, Sanguinette CC, Andrade-Filho JD (2014) Description of *Trichophoromyia uniniensis*, a new phlebotomine species (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of Amazonas State, Brazil. *Parasites & Vectors* , **7**, 400.

Lainson R, Shaw JJ, Ward RD, Fraiha H (1973). Leishmaniasis in Brazil, IX. Considerations on the *Leishmania braziliensis* complex, importance of sandflies of the genus *Psychodopygus* (Mangabeira) in the transmission of *L. braziliensis braziliensis* in north Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **67**, 184–196.

Lins RMMA, Souza NA, Brazil RP, Maingon RDC, Peixoto AA (2012) Fixed differences in the *paralytic* gene define two lineages within the *Lutzomyia longipalpis* complex producing different types of courtship songs. *PLoS ONE*, **7**, e44323

Marcondes CB (2007) A proposal of generic and subgeneric abbreviations for Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the world. *Entomological News*, **118**, 351-356.

Marcondes CB, Day JC, Ready PD (1997) Introgression between *Lutzomyia intermedia* and both *Lu. neivai* and *Lu. whitmani*, and their roles as vectors of *Leishmania braziliensis*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene*, **91**, 725-726.

Martins AV, Falcão AL, Silva JE (1975) Estudos sobre os flebótomos do estado de Minas Gerais - X - Descrição das fêmeas de *Lutzomyia microps* (Mangabeira, 1942) e *Lutzomyia firmatoi* (Barretto, Martins & Pellegrino, 1956) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Revista Brasileira de Biologia*, **35**, 259-263.

Mazzoni CJ, Souza NA, Andrade-Coelho C, Kyriacou CP, Peixoto AA (2006) Molecular polymorphism, differentiation and introgression in the *period* gene between *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia whitmani*. *BMC Evolutionary Biology*, **6**, 85.

Mazzoni CJ, Araki AS, Ferreira GEM, Azevedo RVDM, Barbujani G, Peixoto AA (2008) Multilocus analysis of introgression between two sand fly vectors of leishmaniasis. *BMC Evolutionary Biology* 2008, **8**, 141

Missawa NA, Veloso MA, Maciel GB, Michalsky EM, Dias ES (2011) Evidence of transmission of visceral leishmaniasis by *Lutzomyia cruzi* in the municipality of Jaciara, State of Mato Grosso, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **44**, 76-78.

Nekola JC, White PS (1999) The distance decay of similarity in biogeography and ecology. *Journal of Biogeography*, **26**, 867-878.

Nei M, Kumar S (2000) *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.

Oliveira AG, Galati EAB, Fernandes CE, Dorval MEC, Brazil RP (2012) Ecological aspects of phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in endemic area of Visceral leishmaniasis, Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Journal of Medical Entomology*, **49**, 43-50.

Pinto IS, Filho JD, Santos CB, Falqueto A, Leite YL (2010a) Phylogenetic relationships among species of *Lutzomyia*, subgenus *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*, **47**, 16–21.

Pinto IS, Santos CB, Ferreira AL, Falqueto A (2010b) Variations in the gonostyle of *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae). *Neotropical Entomology*, **39**, 732-735.

Pinto IS, Santos CB, Ferreira AL, Falqueto A (2010c) American visceral leishmaniasis dissociated from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae) in the State of Espírito Santo, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, **26**, 365-372.

Pinto IS, Santos CB, Ferreira AL, Falqueto A (2010d) Richness and diversity of sand flies (Diptera, Psychodidae) in an Atlantic rainforest reserve in southeastern Brazil. *Journal of Vector Ecology*, **35**, 325-332.

Pinto IS, Tonini JFR, Ferreira AL, Falqueto A (2012) A brief inventory of sand flies (Diptera, Psychodidae) from the National Forest of the Rio Preto, state of the Espírito Santo, southeastern Brazil. *Biota Neotropica*, **12**, 323-326.

Pita-Pereira D, Alves CR, Souza MB, Brazil RP, Bertho AL, Barbosa AF, Britto C (2005) Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridization assay. *Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene*, **99**, 905–913.

Pita-Pereira D, Cardoso MAB, Alves CR, Brazil RP, Britto C (2008) Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using PCR multiplex assay. *Acta Tropica*, **107**, 66–69.

Powell, J. 1983. Interspecific cytoplasmic gene flow in the absence of nuclear gene flow: evidence from *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **80**, 492–495.

Pugedo H, Barata RA, França-Silva JC, Silva JC, Dias ES (2005) HP: um modelo aprimorado de armadilha luminosa de sucção para a captura de pequenos insetos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **38**, 70-72.

Puillandre N, Lambert A, Brouillet S, Achaz G (2012) ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*, **21**, 1864-1877.

Rangel EF, Lainson R (2003) Flebotomíneos do Brasil. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, 368p.

Rangel EF, Ryan L, Lainson R, Shaw JJ (1985) Observations on the sandfly (Diptera: Psychodidae) fauna of Além Paraíba, state of Minas Gerais, Brazil, and the isolation of a parasite of the *Leishmania braziliensis* complex from *Psychodopygus hirsuta hirsuta*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **80**, 373-374.

- Ready P (2013) Biology of Phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annual Review Entomology*, **58**, 227-250.
- Ridley M (2004) Evolution. 3rd edition. Malden: Blackwell Publishing.
- Rivera J, Currie DC (2009) Identification of Nearctic black flies using DNA barcodes (Diptera: Simuliidae). *Molecular Ecology Resources*, **9**, 224–236.
- Rocha LS, Falqueto A, Santos CB, Ferreira AL, Graça GC, Grimaldi Jr G, Cupolillo E (2010) Survey of natural infection by *Leishmania* in sand fly species collected in southeastern Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **104**, 461-466.
- Rodrigues AAF, Barbosa VA, Andrade-Filho JD, Brazil RP (2013) The sandfly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the Parque Estadual da Serra da Tiririca, Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **108**, 943-946.
- Ruiz-Lopez F, Wilkerson RC, Conn JE, McKeon SN, Levin DM, Quiñones ML, Pova MM, Linton YM (2012) DNA barcoding reveals both known and novel taxa in the *Albitarsis* Group (*Anopheles: Nyssorhynchus*) of Neotropical malaria vectors *Parasites & Vectors*, **5**, 44.
- Sábio PB, Andrade AJ, Galati EAB (2014) Assessment of the taxonomic status of some species included in the Shannoni complex, with the description of a new Species of *Psathyromyia* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Journal of Medical Entomology*, **51**, 331-341.
- Sanguinette CC, Faustino JX, Meira PCS, Botelho HA, Carvalho GM, Gontijo CM, Andrade-Filho (2013) Anomalies in the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in Brazil. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **29**, 54-58.
- Santos AMM, Cavalcanti DR, Silva JMC, Tabarelli M (2007) Biogeographical relationships among tropical forests in north-eastern Brazil. *Journal of Biogeography*, **34**, 437–446.
- Shannon RC, Del Ponte E (1927) Cuatro notas sobre especies nuevas de dipteros nematóceros, hematófagos o no, de la República Argentina. *Revista del Instituto de Bacteriología Departamento Nacional de Higiene*, **4**, 724-736.
- Shimabukuro PHF, Tolezano JE, Galati EAB (2011) Chave de identificação ilustrada dos Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do estado de São Paulo, Brasil. *Papéis Avulsos de Zoologia (São Paulo)*, **51**, 399-441.
- StatSoft, Inc. (2011). STATISTICA (data analysis software system), version 10. www.statsoft.com.

Sinclair BJ, Borkent A, Wood DM (2007) The male genital tract and aedeagal components of the Diptera with a discussion of their phylogenetic significance. *Zoological Journal of the Linnean Society*, **150**, 711–742.

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

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, **22**, 4673-4680.

Vigoder FM, Araki AS, Bauzer LG, Souza NA, Brazil RP, Peixoto AA (2010) Lovesongs and period gene polymorphisms indicate *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) as a sibling species of the *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva, 1912) complex. *Infection, Genetics and Evolution*, **10**, 734-739.

Virgens TM, Santos CB, Pinto IS, Silva KS, Leal FC, Falqueto A (2008) Phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae) in an American tegumentary leishmaniasis transmission area in northern Espírito Santo state, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, **24**, 2969-2978.

Watts PC, Hamilton JG, Ward RD, Noyes HA, Souza NA, Kemp SJ, Feliciangeli MD, Brazil R, Maingon RD (2005) Male sex pheromones and the phylogeographic structure of the *Lutzomyia longipalpis* species complex (Diptera: Psychodidae) from Brazil and Venezuela. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **73**, 734–743.

Wright S (1943) Isolation by distance. *Genetics*, **31**, 114-138.

Young DG, Duncan MA (1994) Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Gainesville, FL: Associated Publishers. 881 p.

**Data Accessibility**

DNA sequences: Genbank accessions KP112487 - KP113062 Supporting Information S2

Final DNA sequence assembly: online Supporting Information

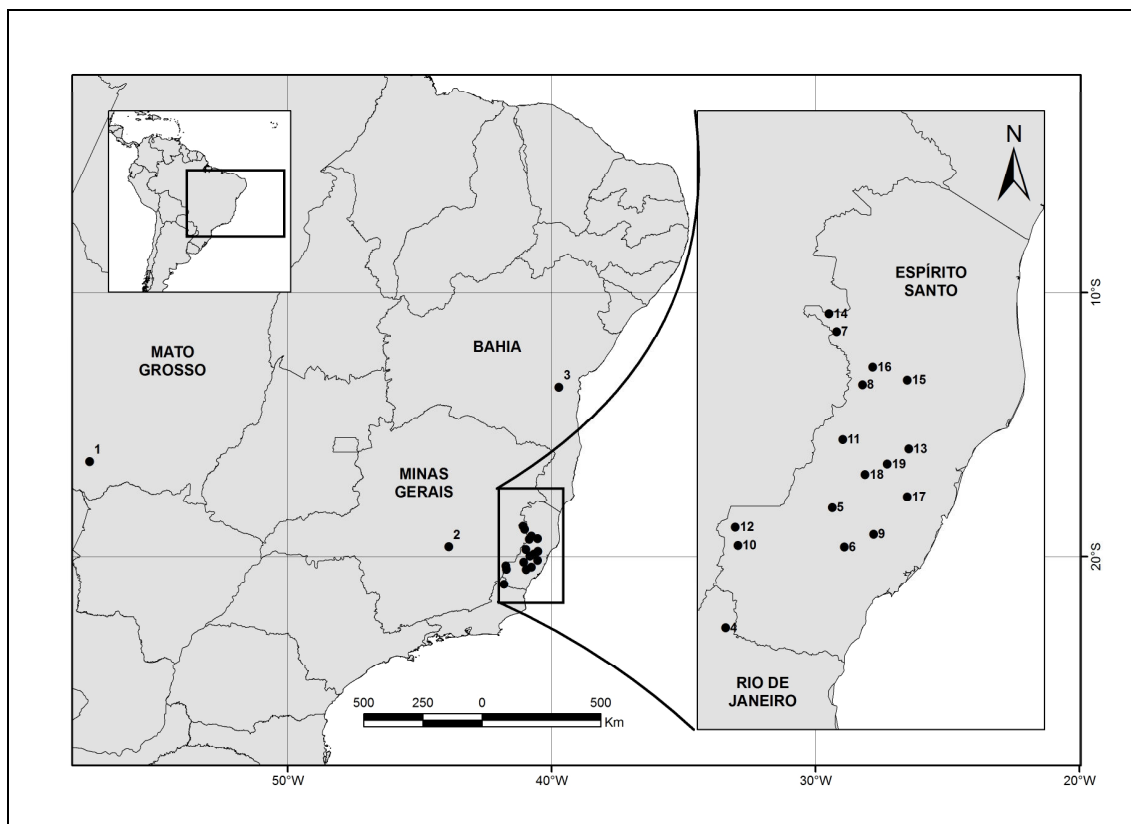
Phylogenetic data: Supporting Information S3

BOLD project AFBR, Supporting Information S2

**Author Contributions**

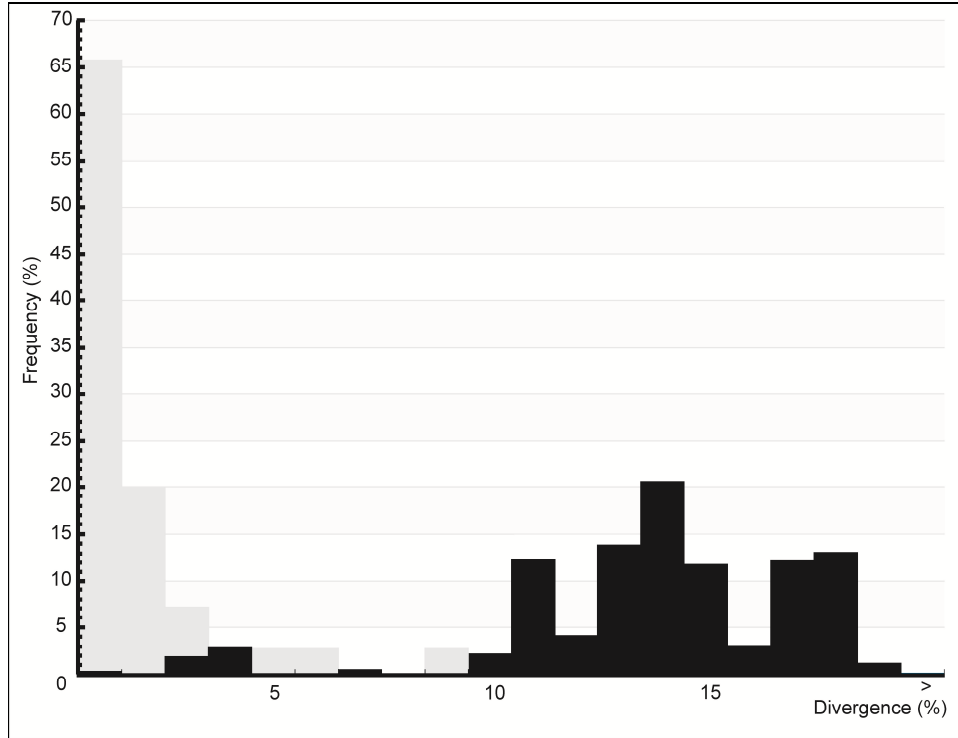
ISP wrote the manuscript. ISP and AAP conceived and designed the study. ISP, AAFR, ALF, HRR, AF, JDAF, EABG, PHFS, and RPB carried out the fieldwork and performed the morphological identification of the specimens. ISP and BDC performed the bench work. ISP, RVB, RPB, PHFS, RPB and AAP analyzed and interpreted the data and critically revised it for intellectual content. All authors read and approved the final manuscript.

## Figures and Tables



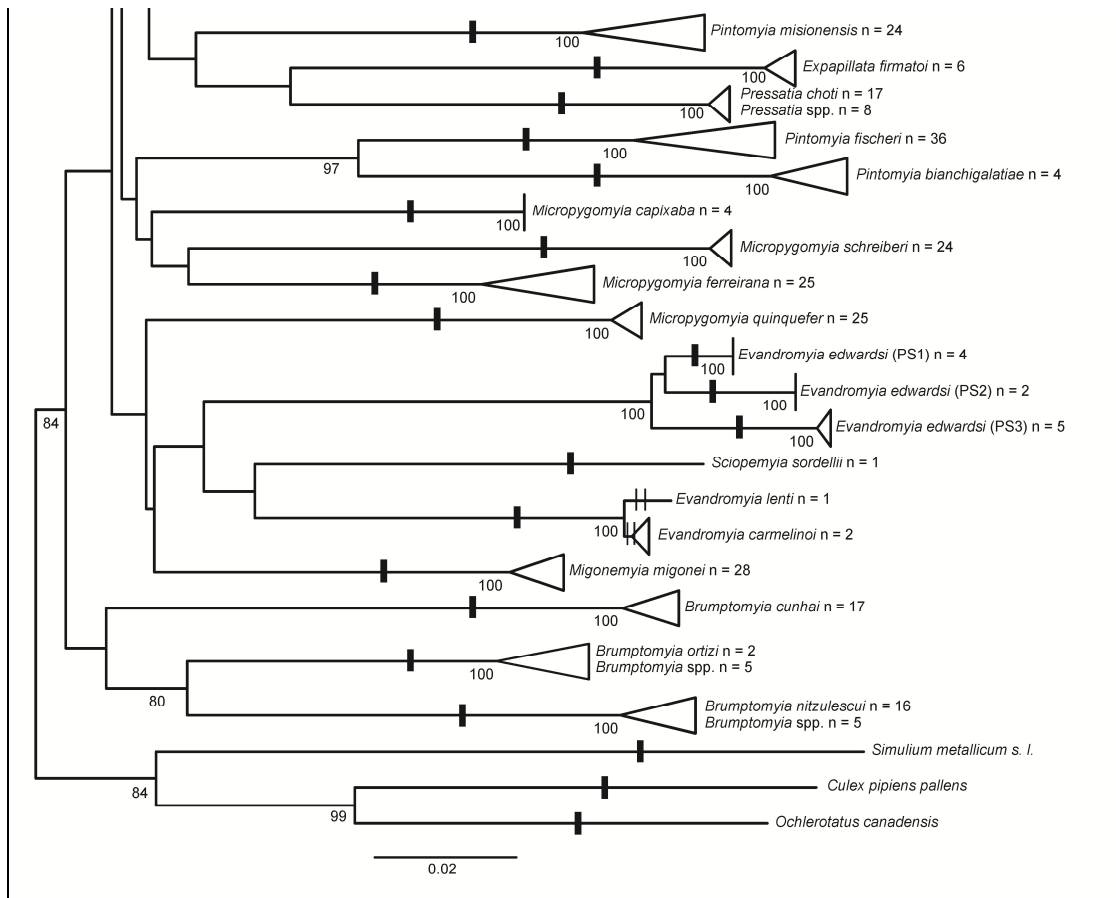
**Figure 5.1.** Map showing the sampling sites across the Brazilian territory. (1 = Cáceres; 2 = Lagoa Santa; 3 = Wenceslau Guimarães; 4 = Bom Jesus do Itabapoana; 5 = Afonso Cláudio; 6 = Alfredo Chaves; 7 = Alto Rio Novo; 8 = Baixo Guandu; 9 = Domingos Martins; 10 = Ibitirama; 11 = Itaguaçu; 12 = Iúna; 13 = João Neiva; 14 = Manenópolis; 15 = Marilândia; 16 = Pancas; 17 = Santa Leopoldina; 18 = Santa Maria de Jetibá; 19 = Santa Teresa).



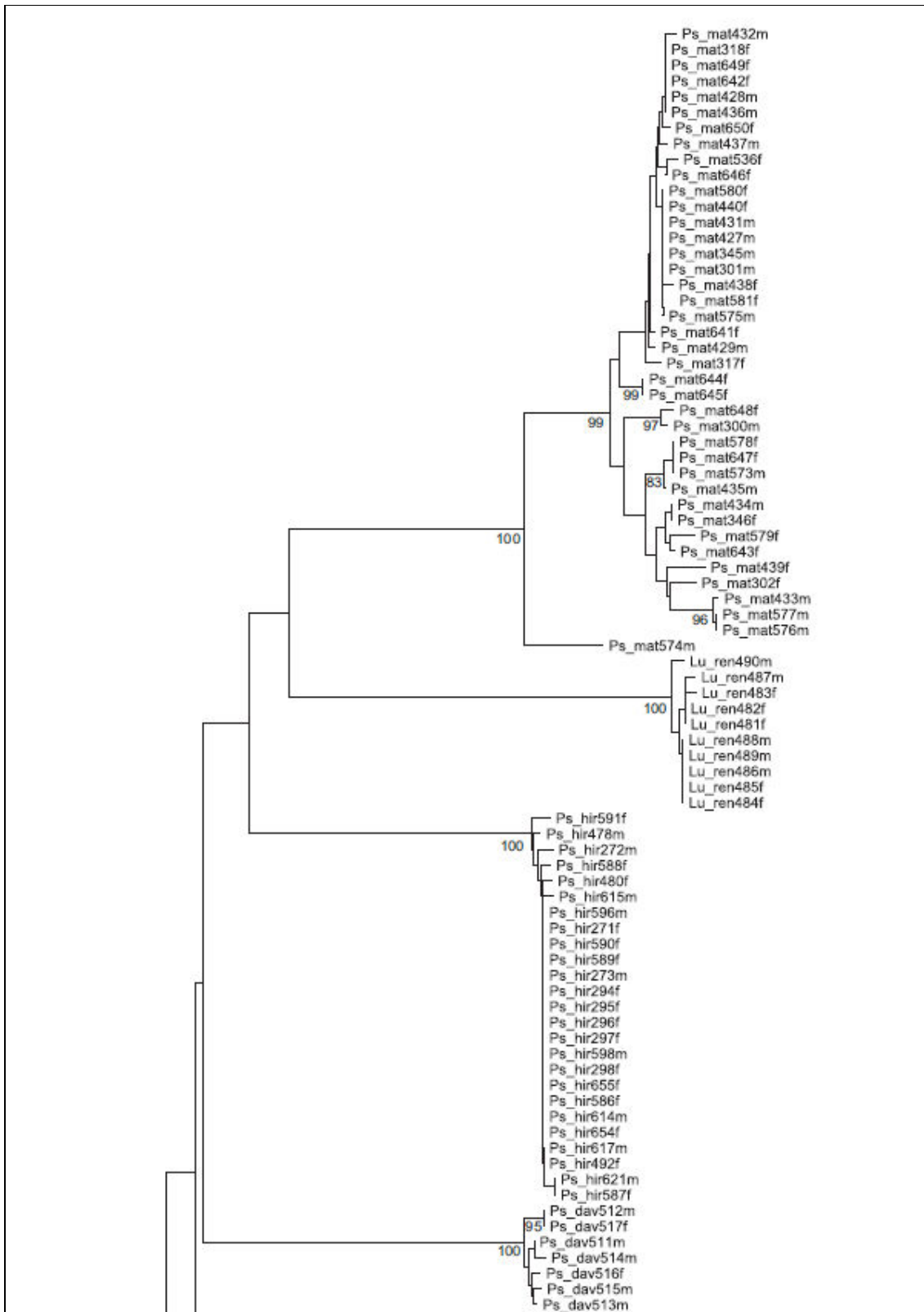


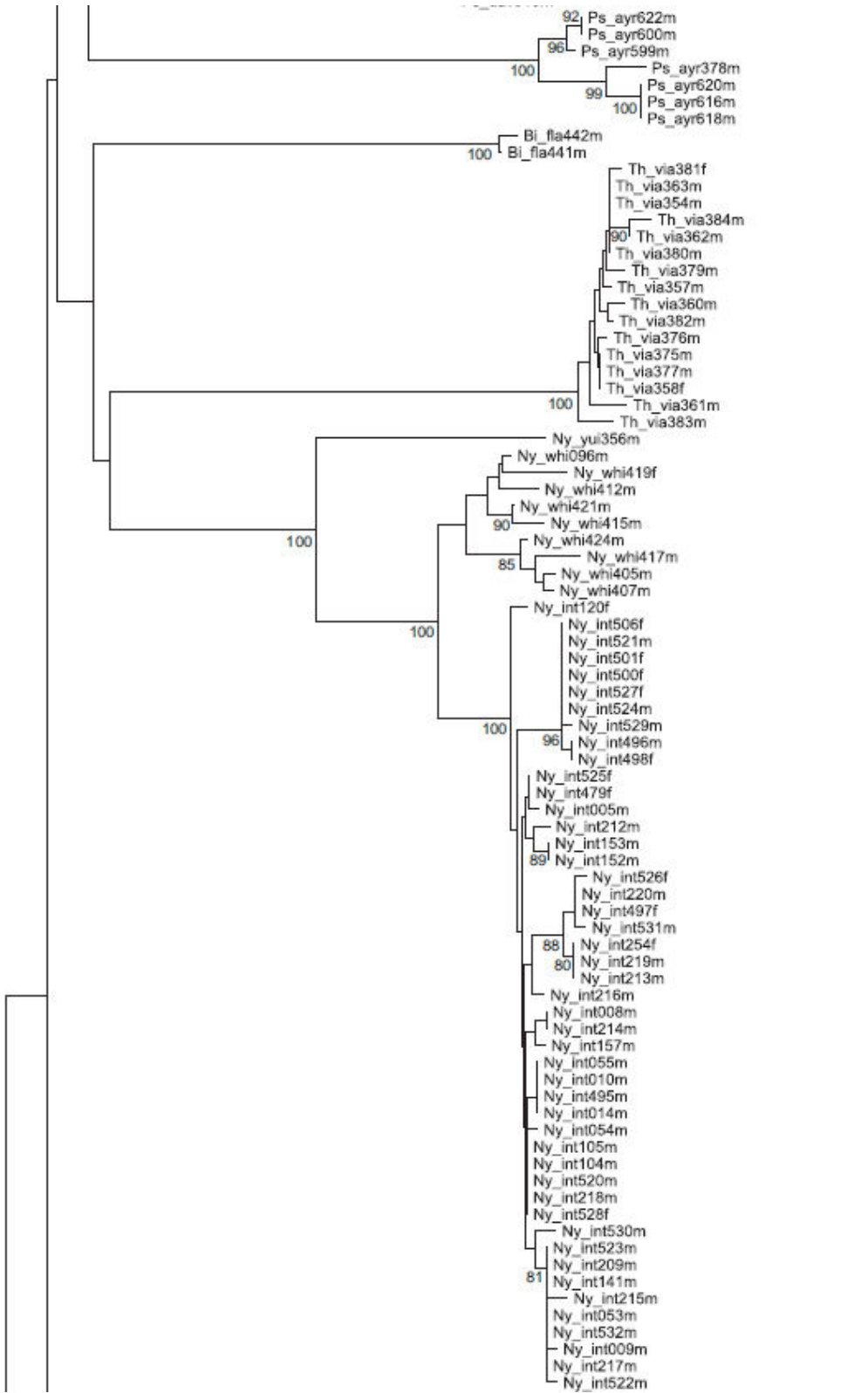
**Figure 5.2.** Frequency histograms of mean *COI* sequence divergences (K2P) among sand flies from Brazil at both species (gray bars) and genus levels (black bars) of the taxonomic hierarchy.

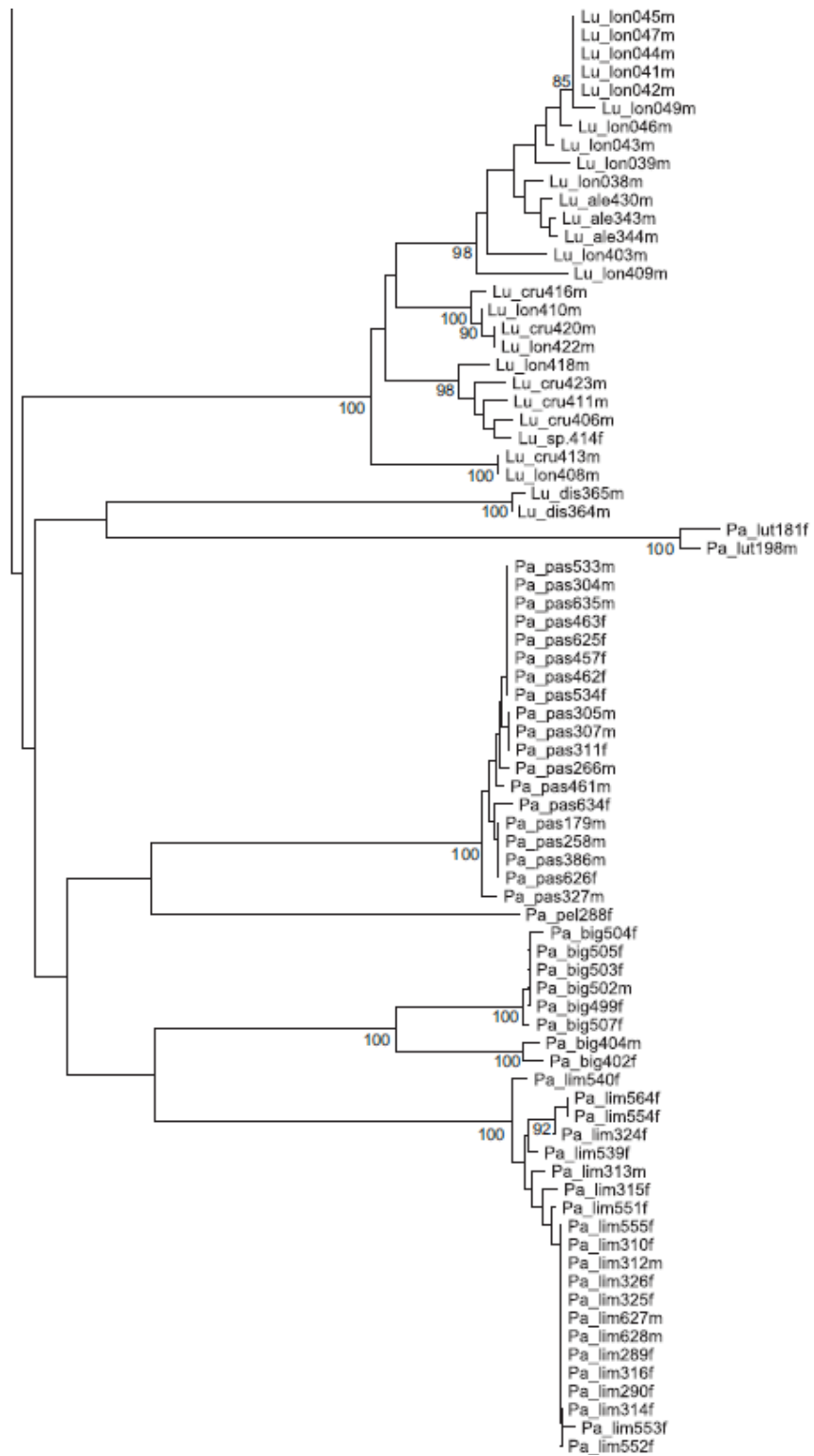


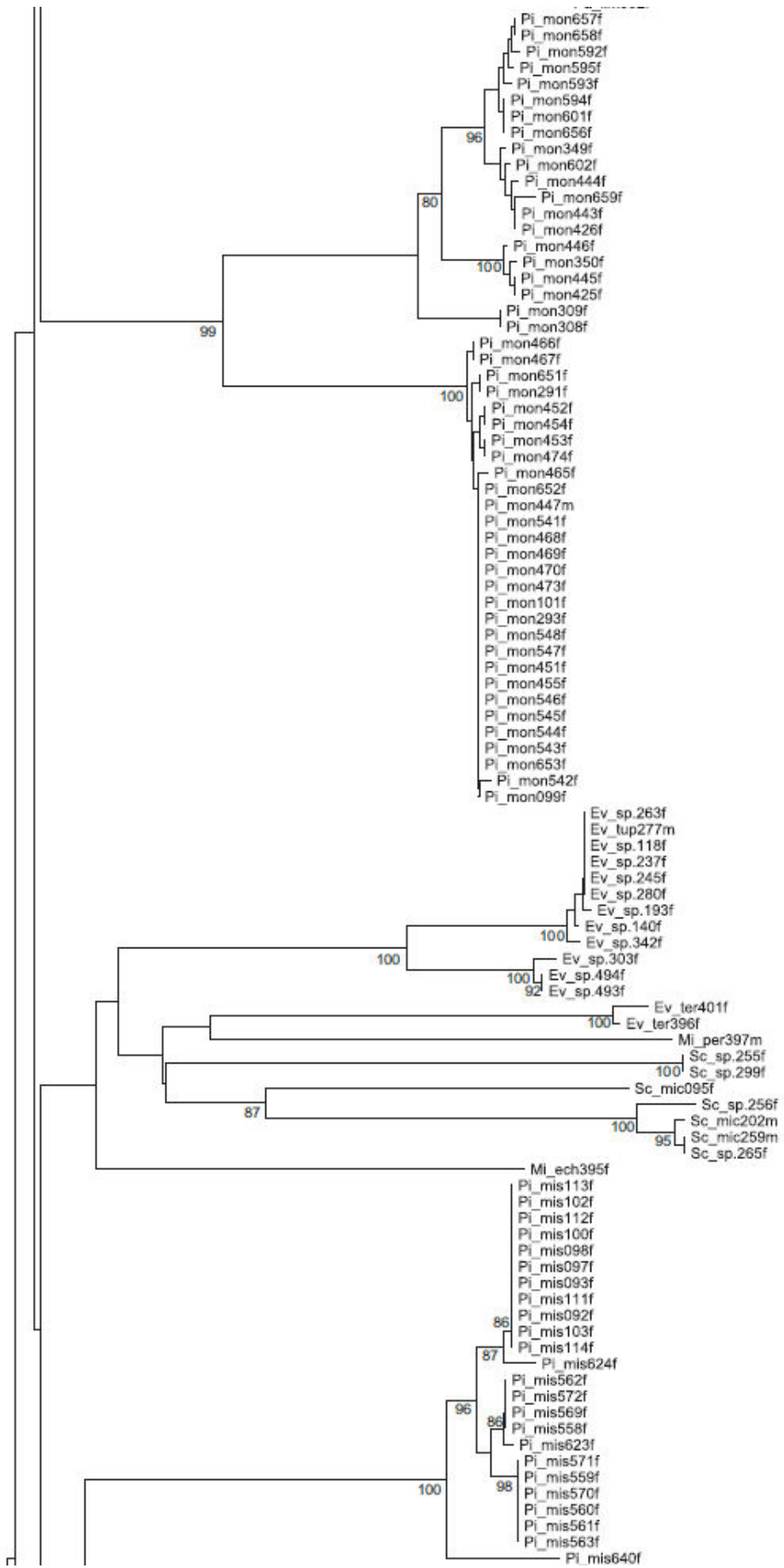


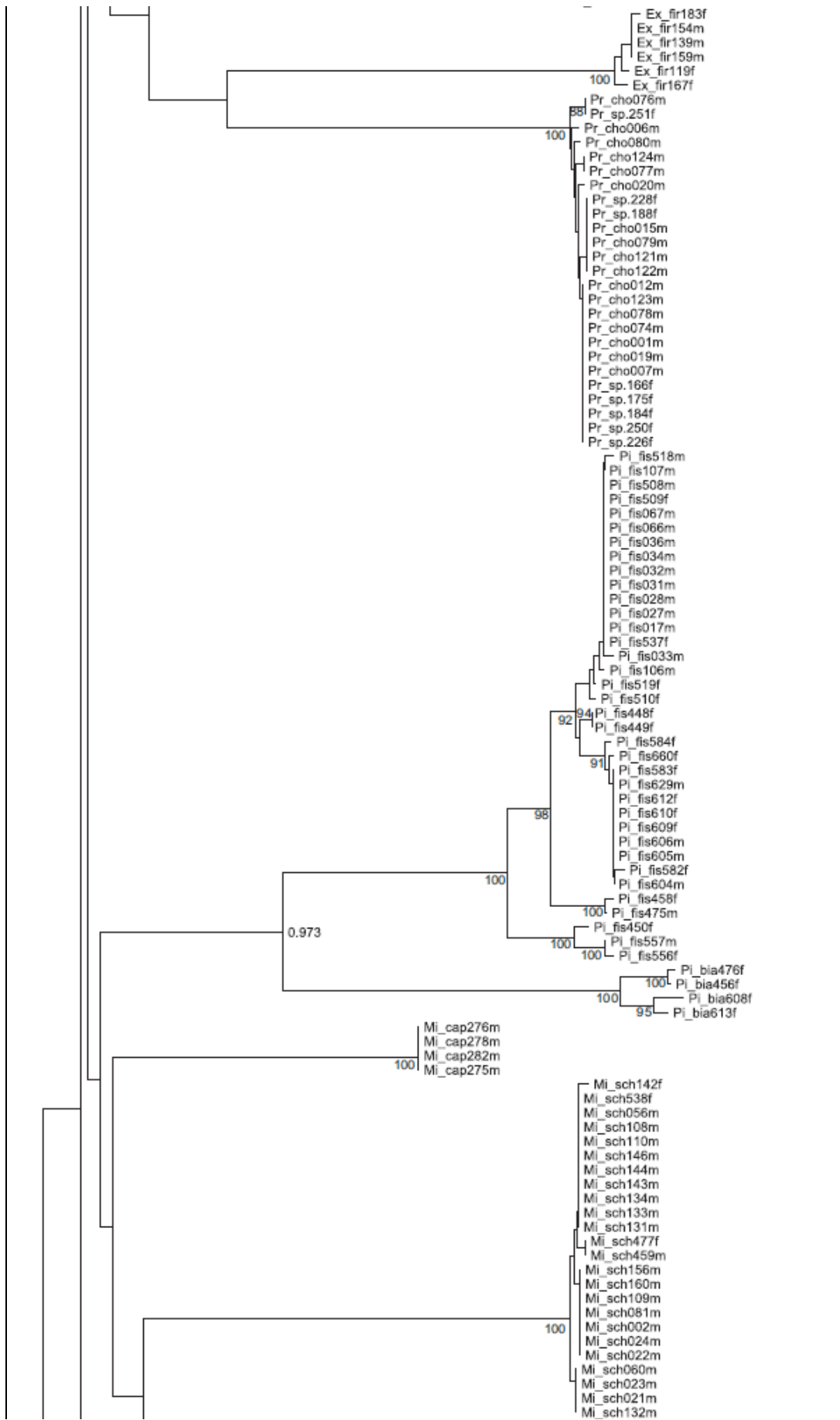
**Figure 5.3.** Neighbor-joining tree resulting from a matrix of COI sequence divergences (K2P) obtained from 567 specimens of sand flies belongs to 47 morphological distinct species from Brazil. Numbers next to the branches indicate Bootstrap percentages  $\geq 80\%$ . One black dash indicates groups partitioned by ABGD using the value of 2.15%. One white dash indicates the groups partitioned by ABGD using the cut-off of 1.29%. Two thin black dashes indicated groups that were not recognized by the ABGD partitions. The number of specimens is indicated behind each species name. PS1, PS2, and PS3 represent distinct groups that are hypothesized to represent provisional species.









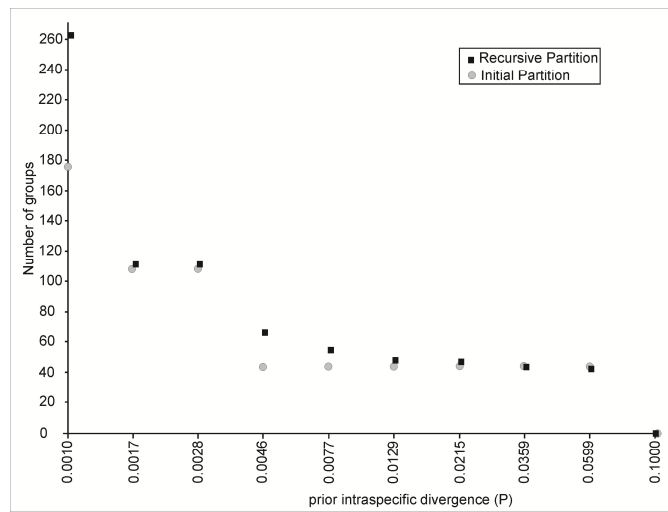






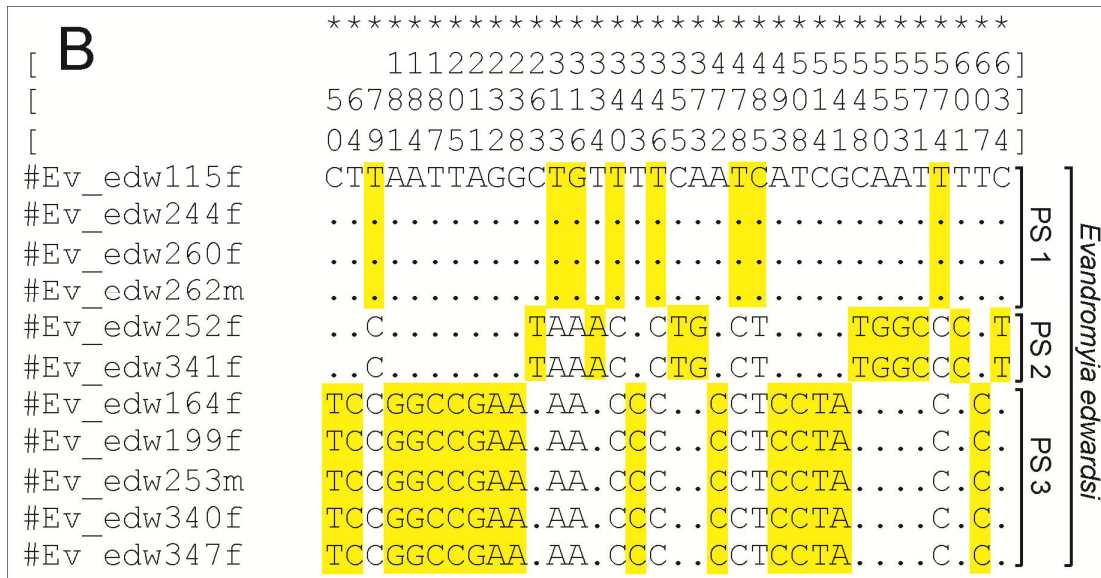
84





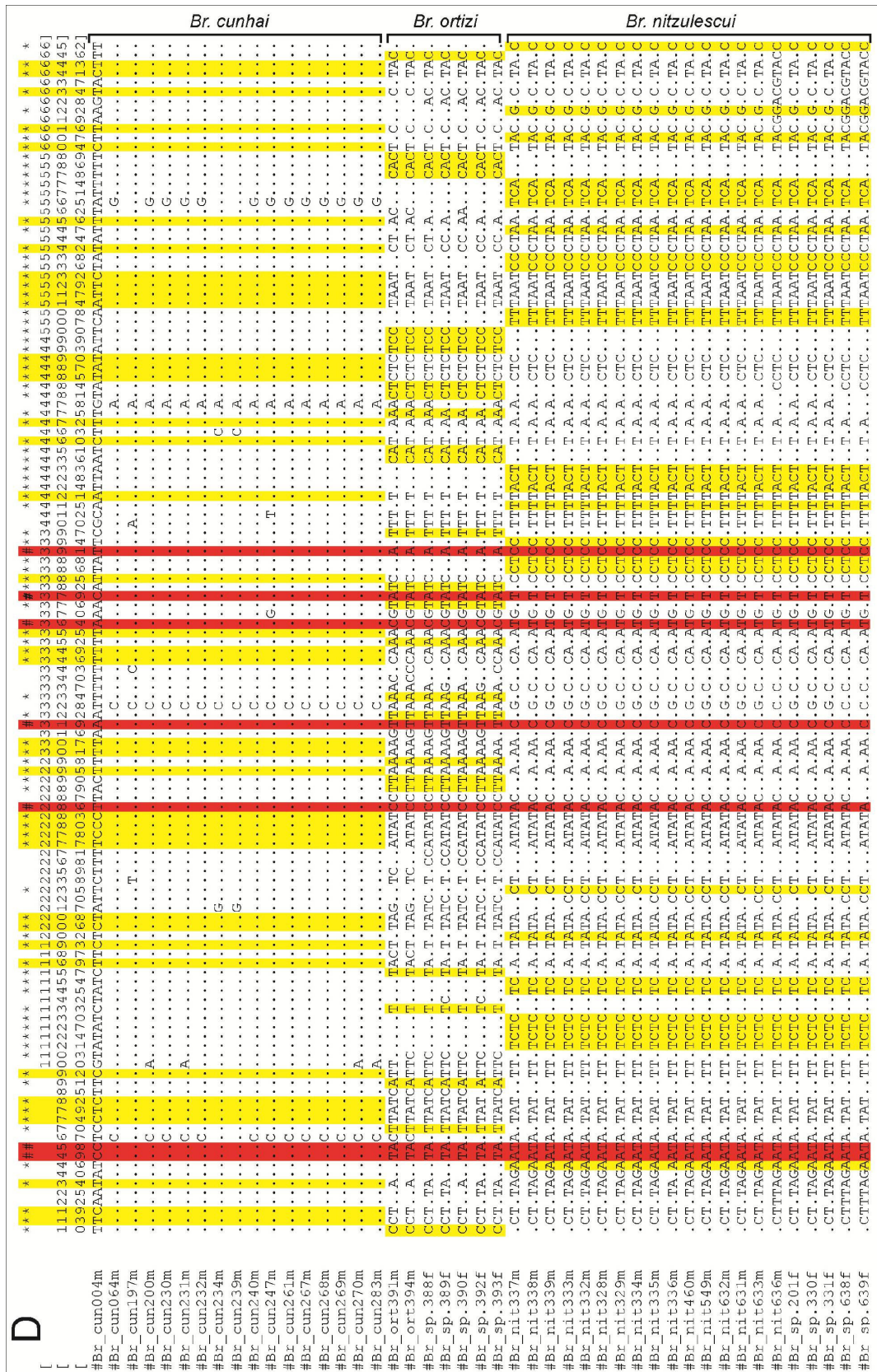
**Figure 5.5 - Supporting Information S4.** Number of groups among the 576 specimens of sand flies from Brazil based on the values of prior intraspecific divergence found by the Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) software as potential barcode gaps using a range of 0.001 to 0.1 for prior intraspecific divergence.



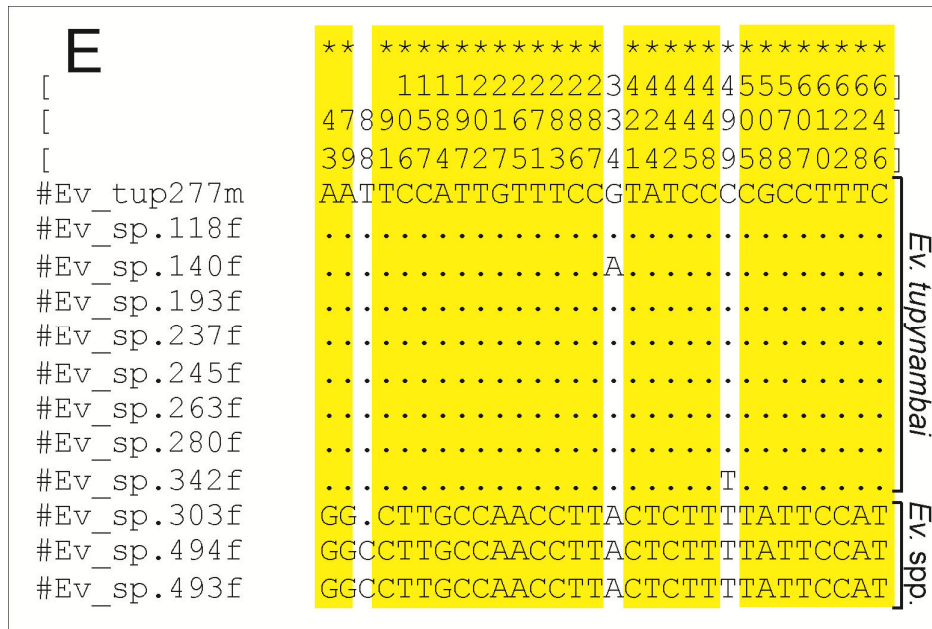


**Figure 5.7 - Supporting Information S5.B.** Parsimony informative sites from a fragment of the 658 bp of the *cytochrome c oxidase subunit I (COI)* gene among closest related species of sand flies from Brazil. B) *Evandromyia edwardsi* (PS1, PS2, and PS3); (yellow = fixed differences; red = diagnostic sites).



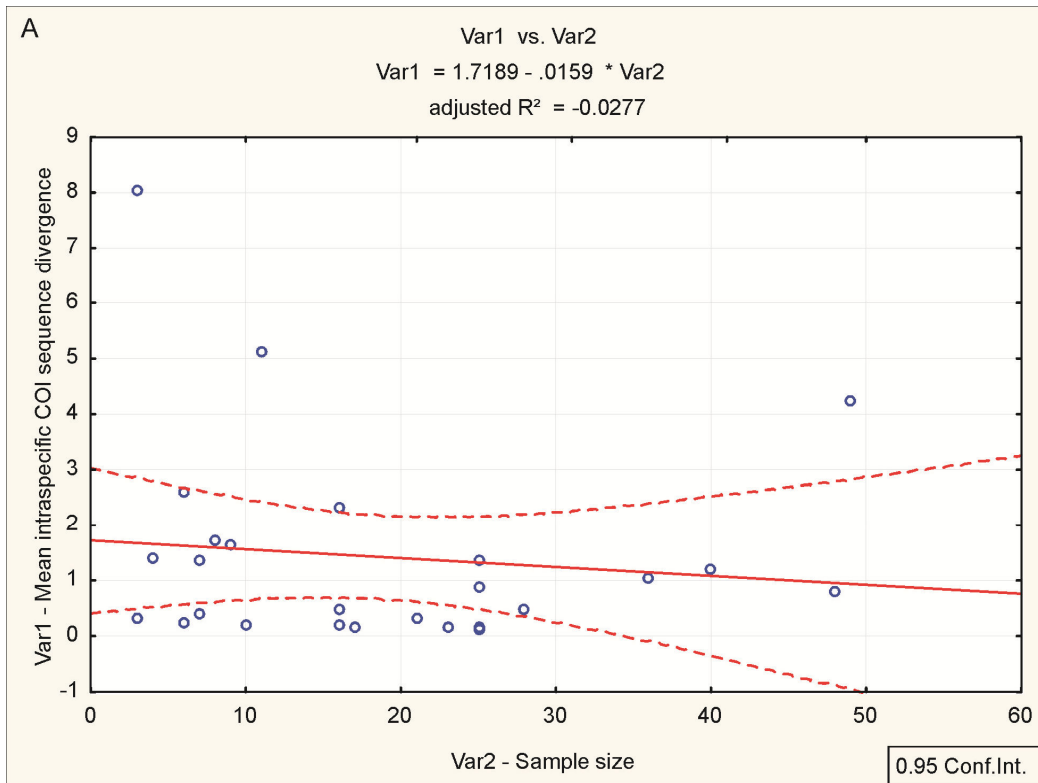


**Figure 5.9 - Supporting Information S5.D.** Parsimony informative sites from a fragment of the 658 bp of the *cytochrome c oxidase subunit I (COI)* gene among closest related species of sand flies from Brazil. D) *Brumtomyia* genus (*Brumtomyia cunhai*, *Brumtomyia ortizi*, and *Brumtomyia nitzulescui*); (yellow = fixed differences; red = diagnostic sites).

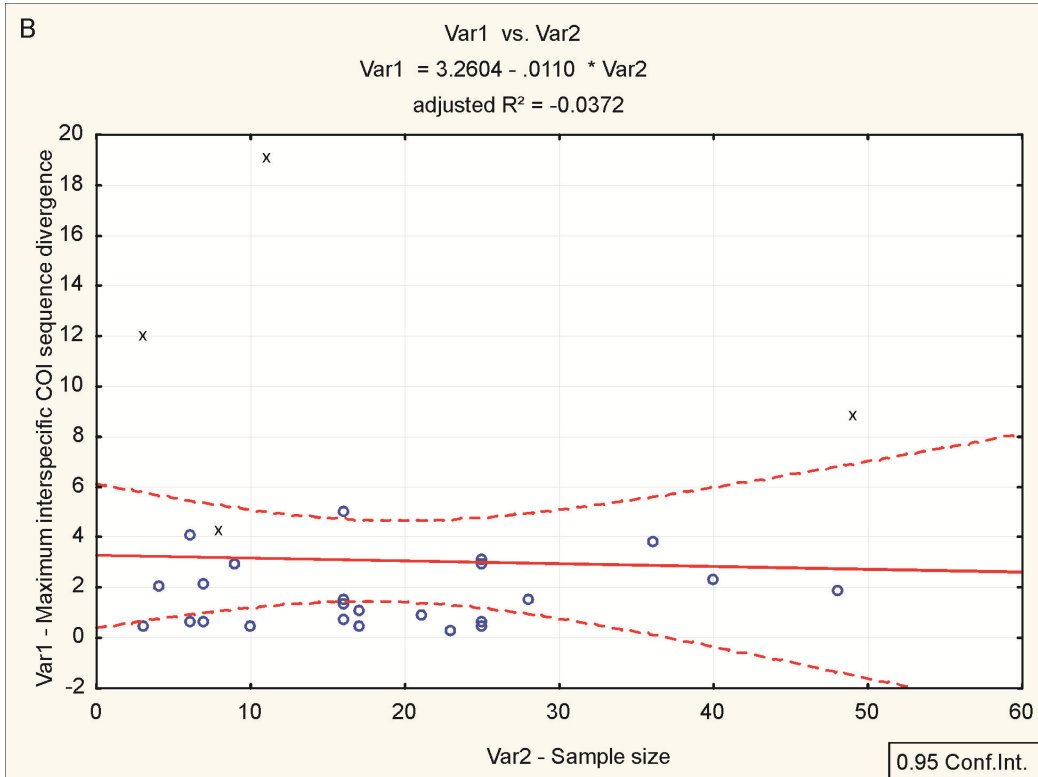


**Figure 5.10 - Supporting Information S5.E.** Parsimony informative sites from a fragment of the 658 bp of the *cytochrome c oxidase subunit I (COI)* gene among closest related species of sand flies from Brazil. E) *Evandromyia tupynambai* and *Evandromyia* spp. (yellow = fixed differences; red = diagnostic sites).

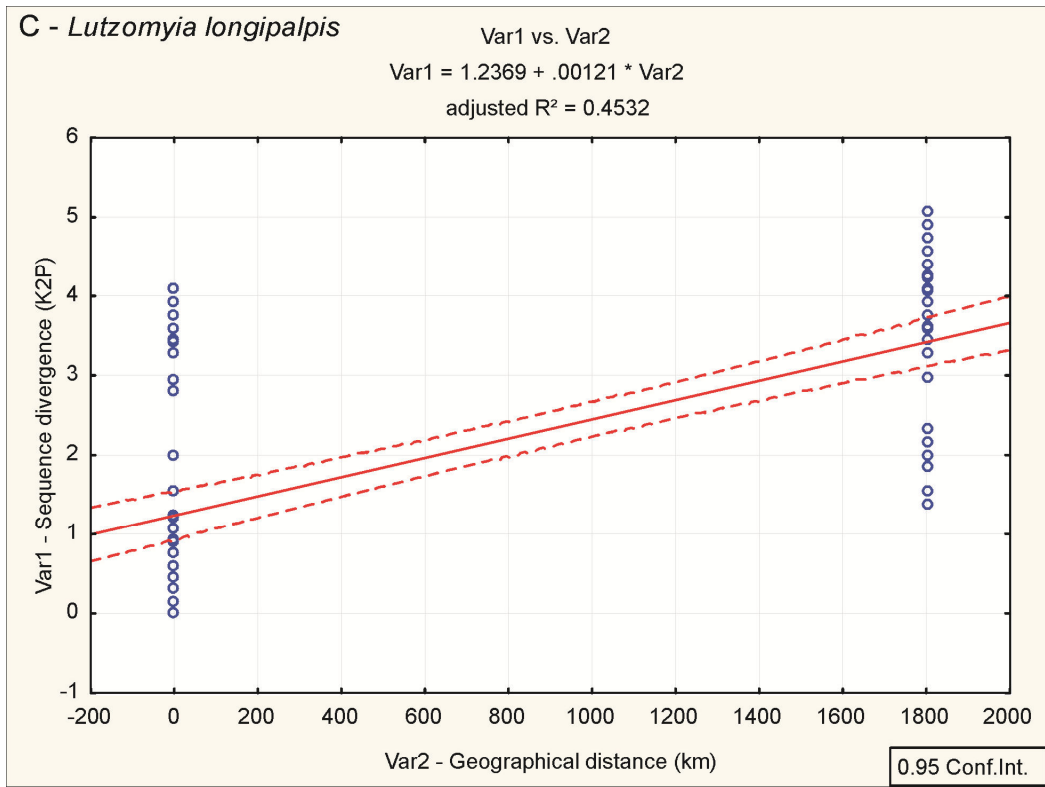




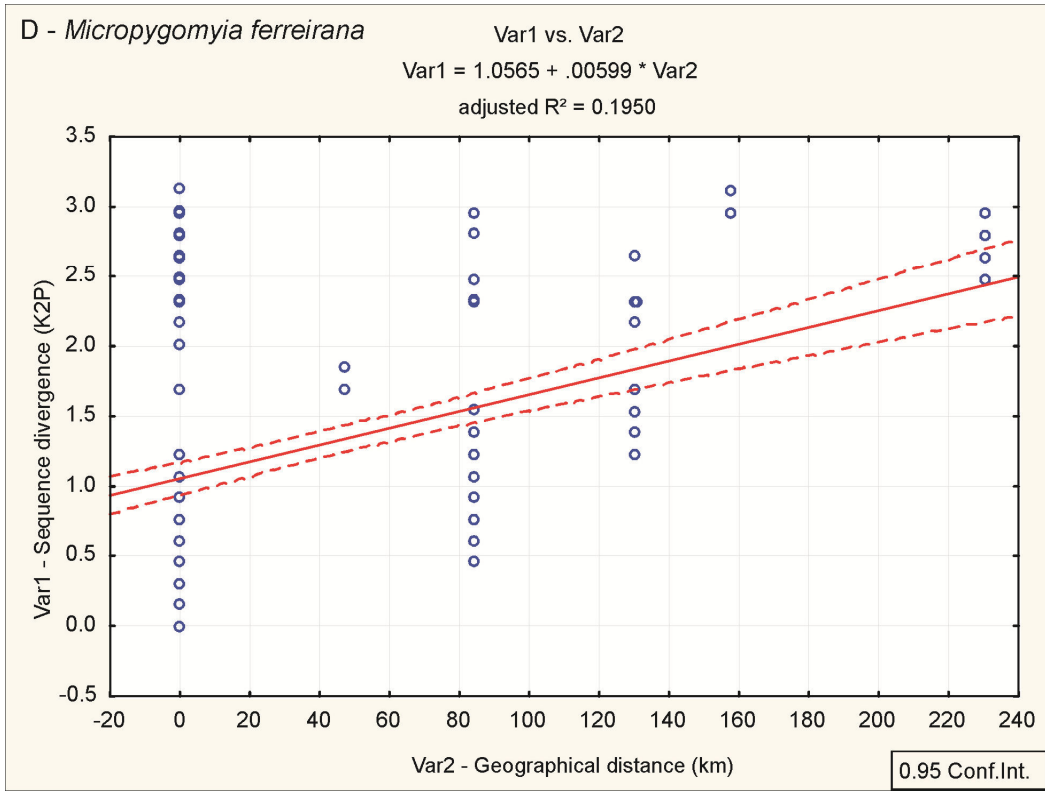
**Figure 5.11- Supporting Information S6.A.** Correlation analyses showing the relationship between mean intraspecific sequence divergence (K2P) at *COI* and sample size (A).



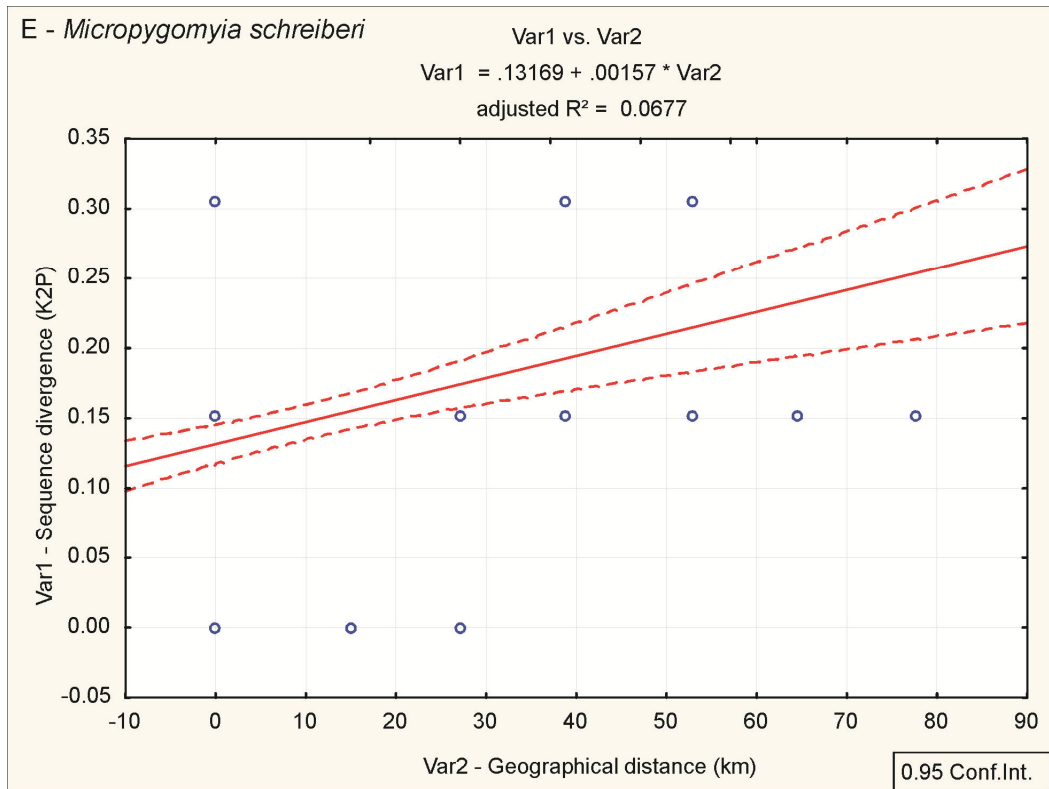
**Figure 5.12 - Supporting Information S6.B.** Correlation analyses showing the relationship between maximum interspecific sequence divergence and sample size (B).



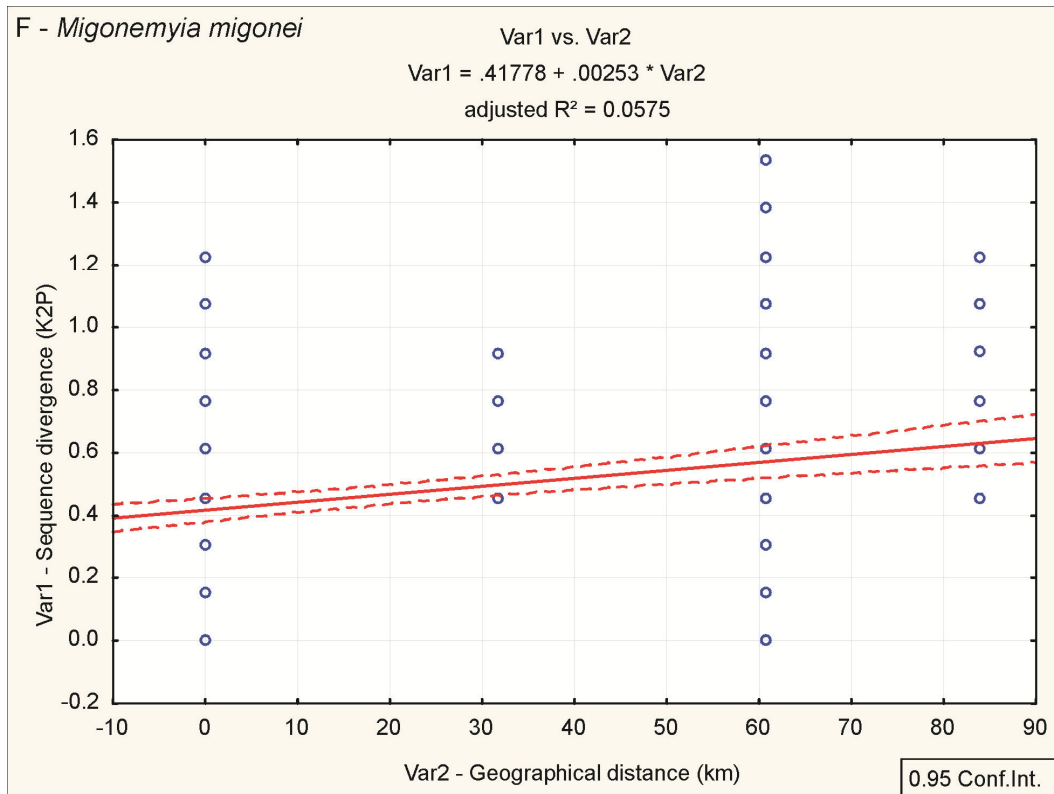
**Figure 5.13 - Supporting Information S6.C.** Correlation analyses showing the relationship between sequence divergence and geographical distance among *Lutzomyia longipalpis* specimens.



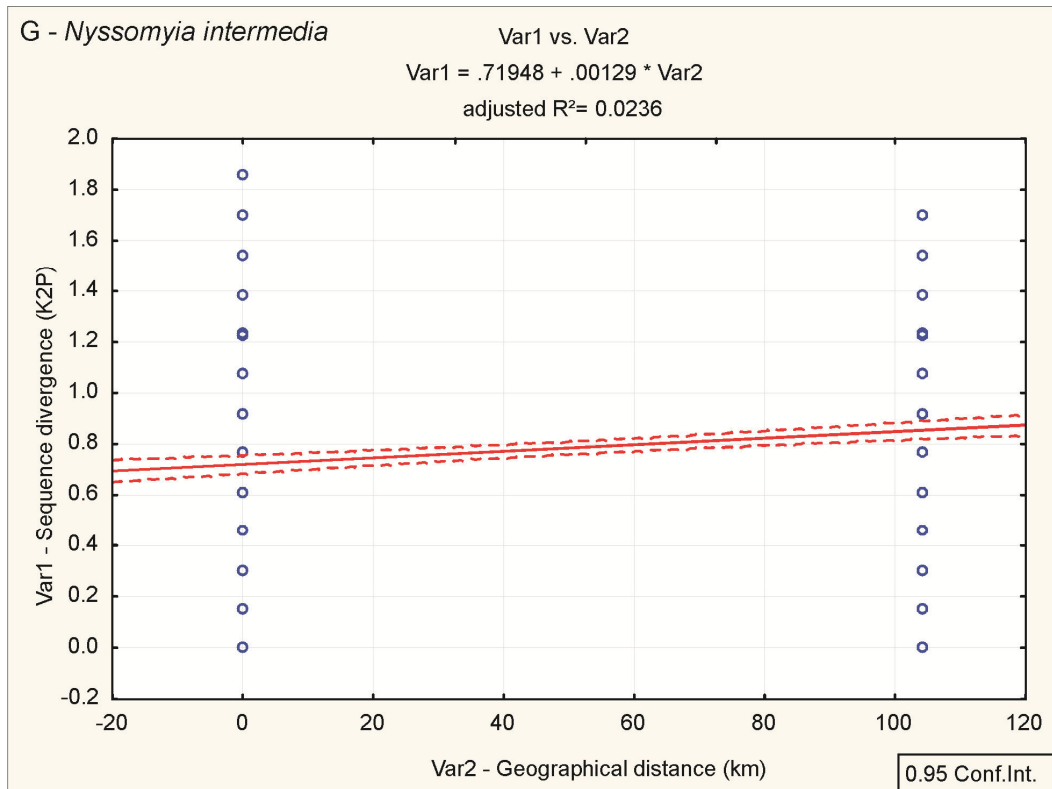
**Figure 5.14 - Supporting Information S6.D.** Correlation analyses showing the relationship between sequence divergence and geographical distance among *Micropygomyia ferreirana* specimens.



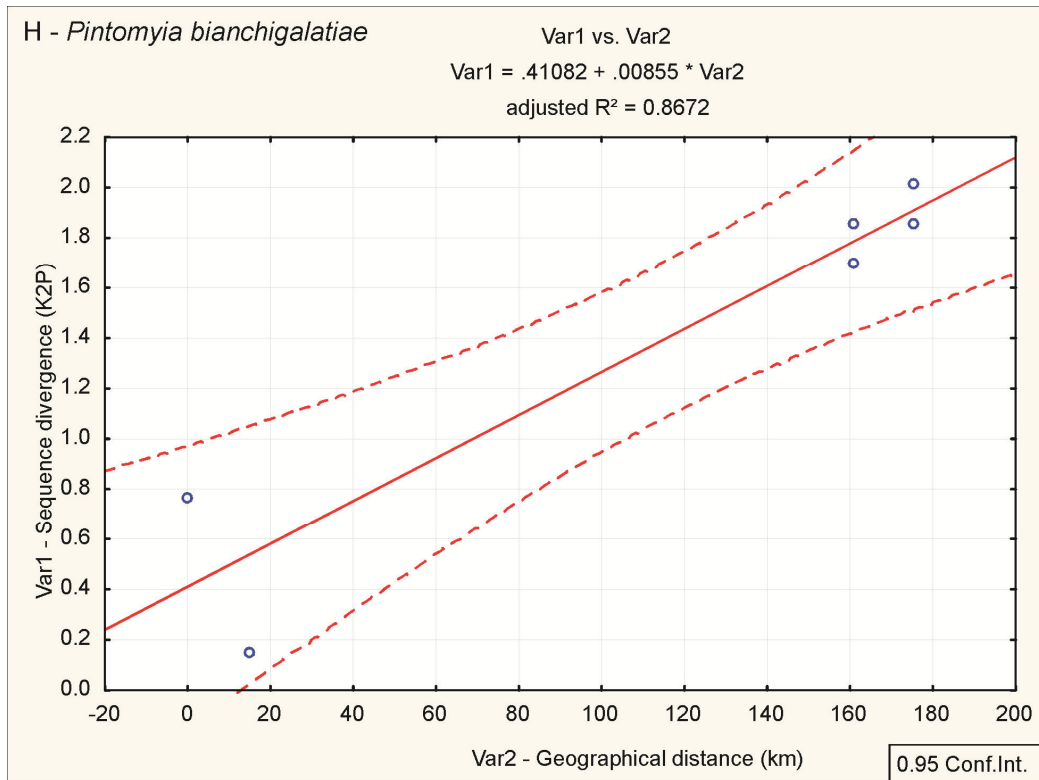
**Figure 5.15 - Supporting Information S6.E.** Correlation analyses showing the relationship between sequence divergence and geographical distance among *Micropygomyia schreiberi* specimens.



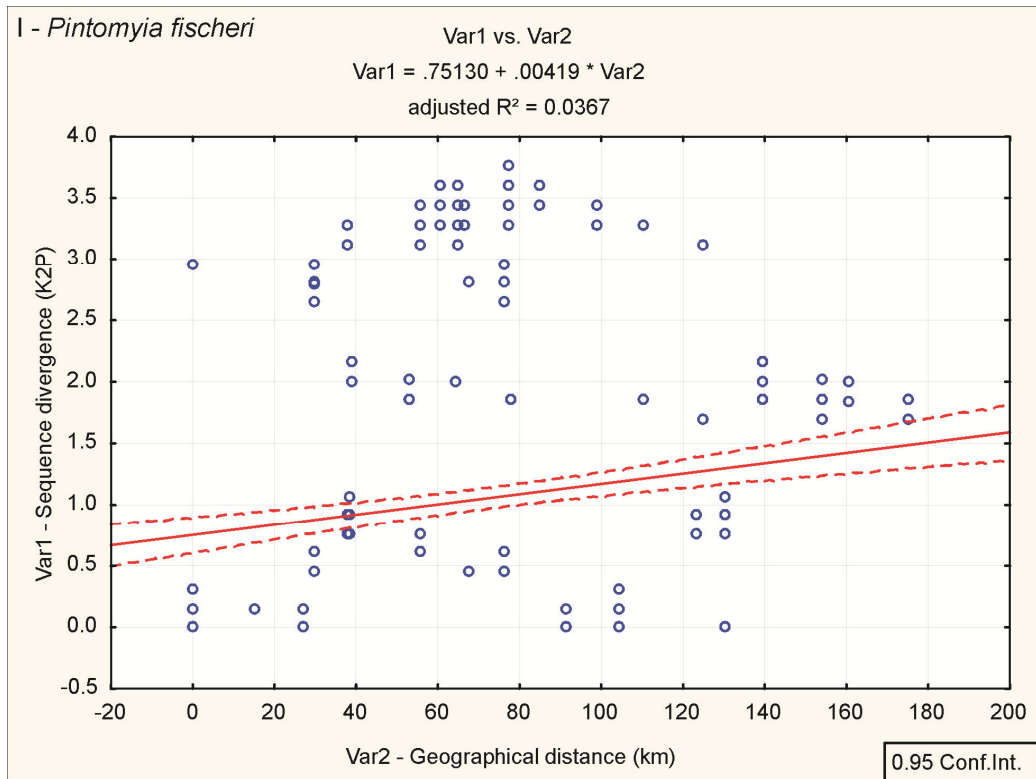
**Figure 5.16 - Supporting Information S6.F.** Correlation analyses showing the relationship between sequence divergence and geographical distance among *Migonemyia migonei* specimens.



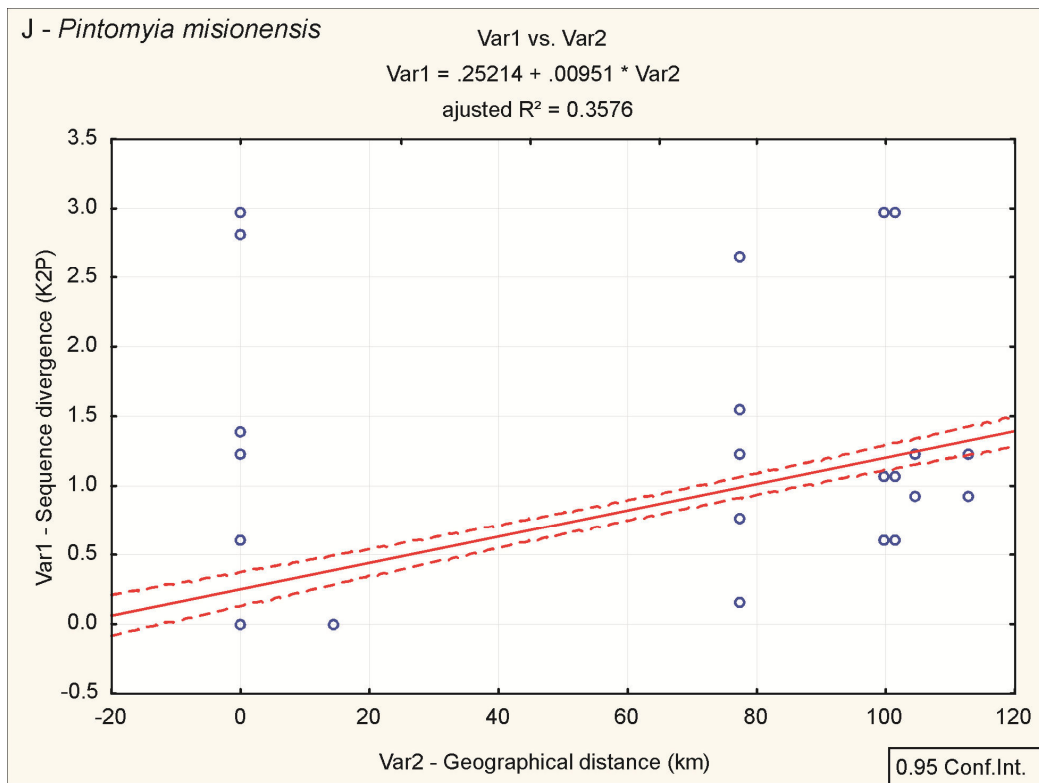
**Figure 5.17 - Supporting Information S6.G.** Correlation analyses showing the relationship between sequence divergence and geographical distance among *Nyssomyia intermedia* specimens.



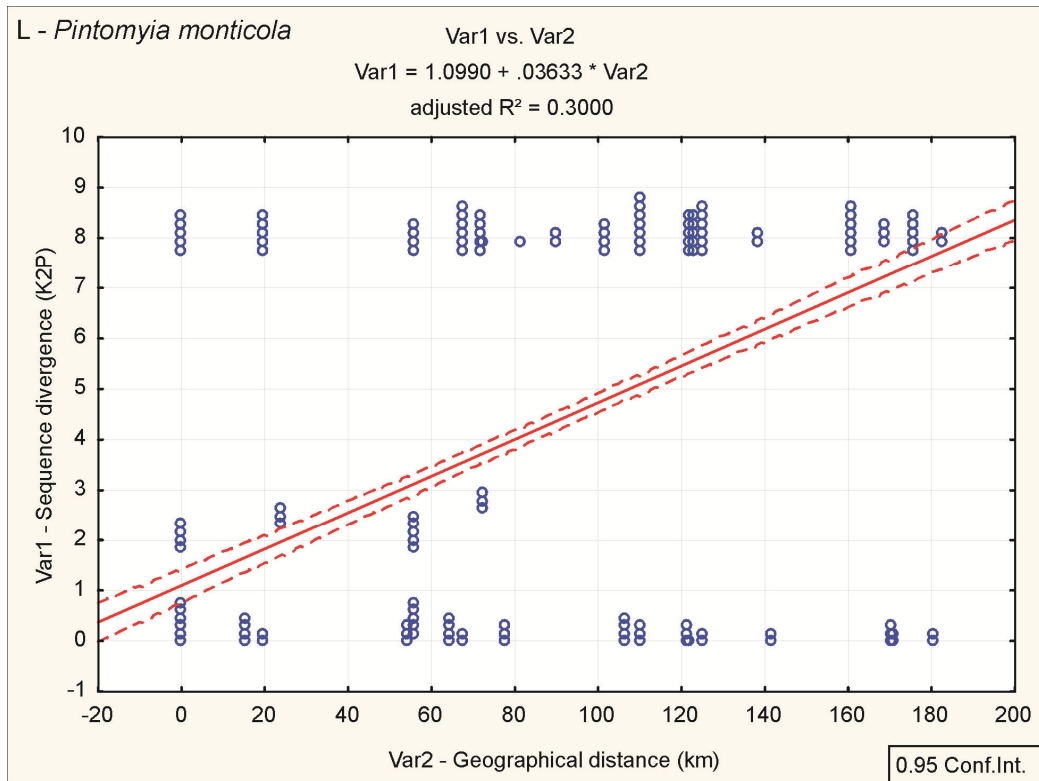
**Figure 5.18 - Supporting Information S6.H.** Correlation analyses showing the relationship between sequence divergence and geographical distance among *Pintomyia bianchigalatae* specimens.



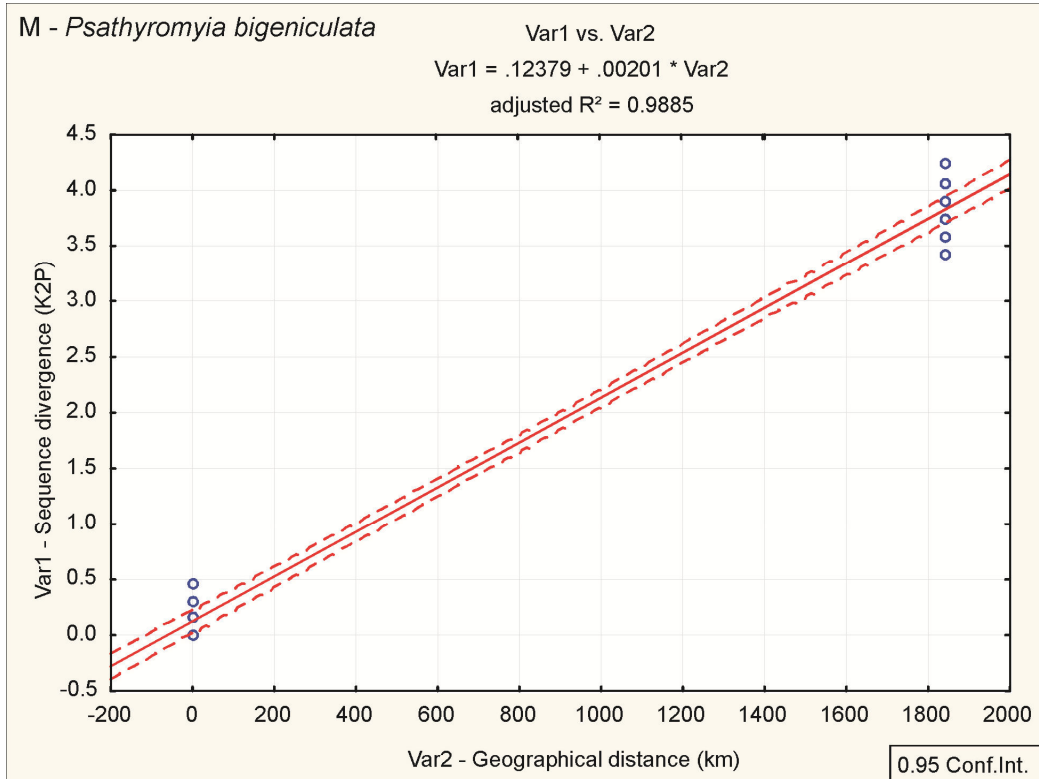
**Figure 5.19 - Supporting Information S6.I.** Correlation analyses showing the relationship between sequence divergence and geographical distance among *Pintomyia fischeri* specimens.



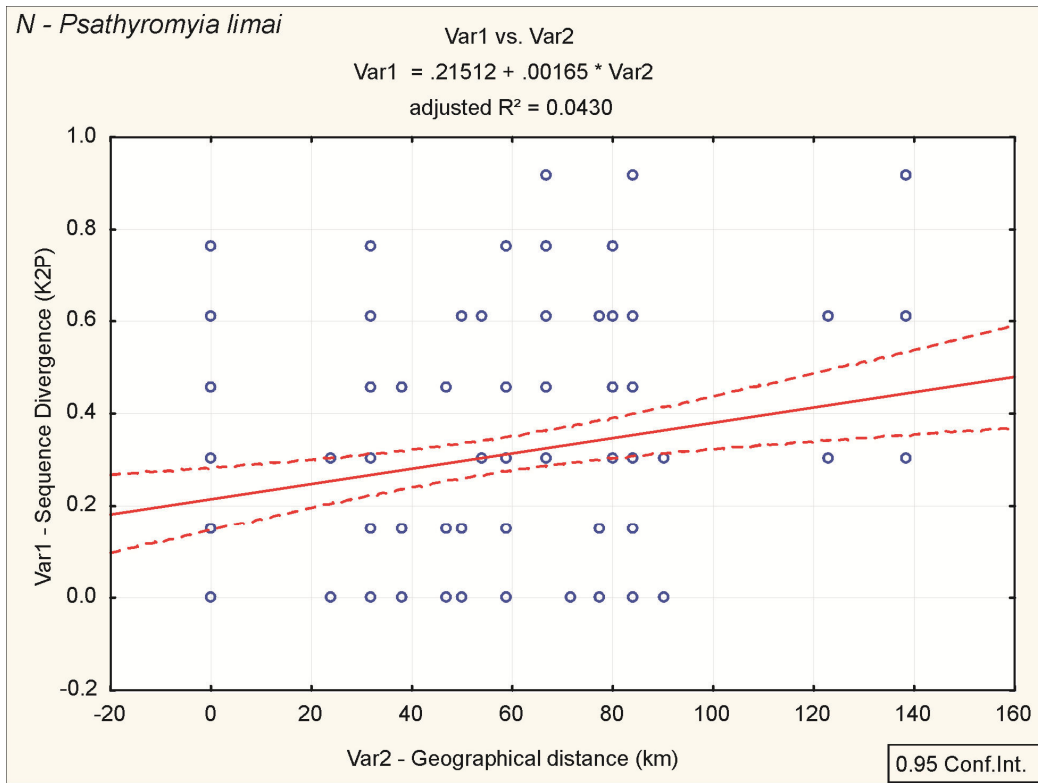
**Figure 5.20 - Supporting Information S6.J.** Correlation analyses showing the relationship between sequence divergence and geographical distance among *Pintomyia misionensis* specimens.



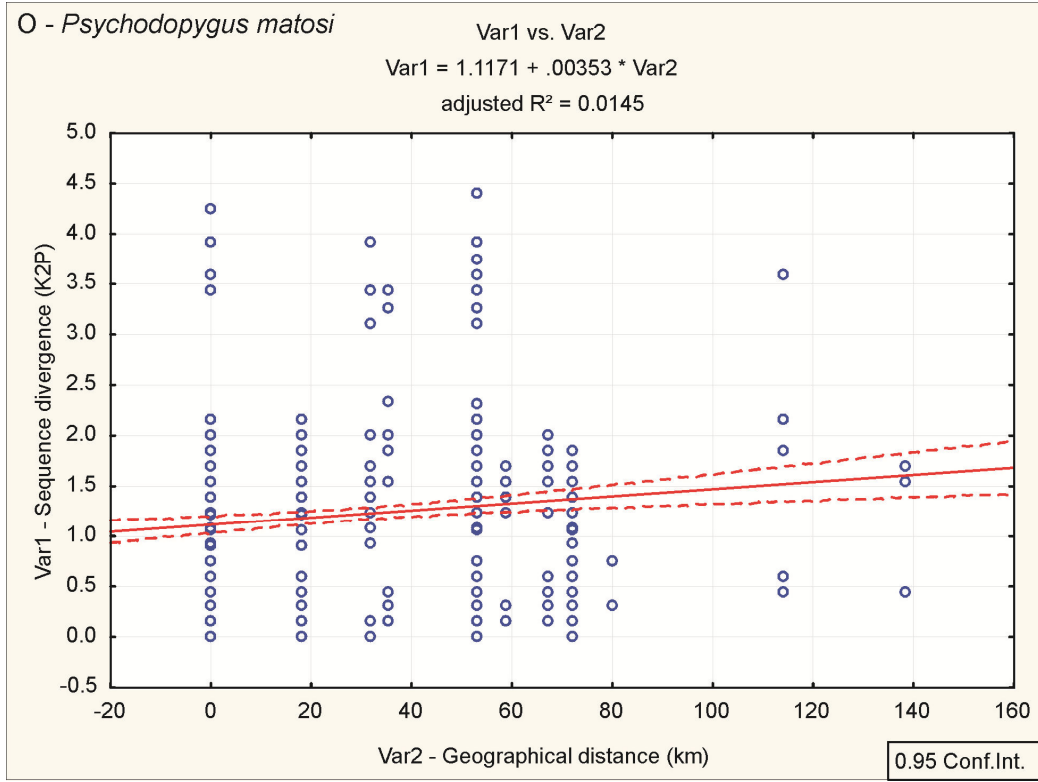
**Figure 5.21 - Supporting Information S6.L.** Correlation analyses showing the relationship between sequence divergence and geographical distance among *Pintomyia monticola* specimens.



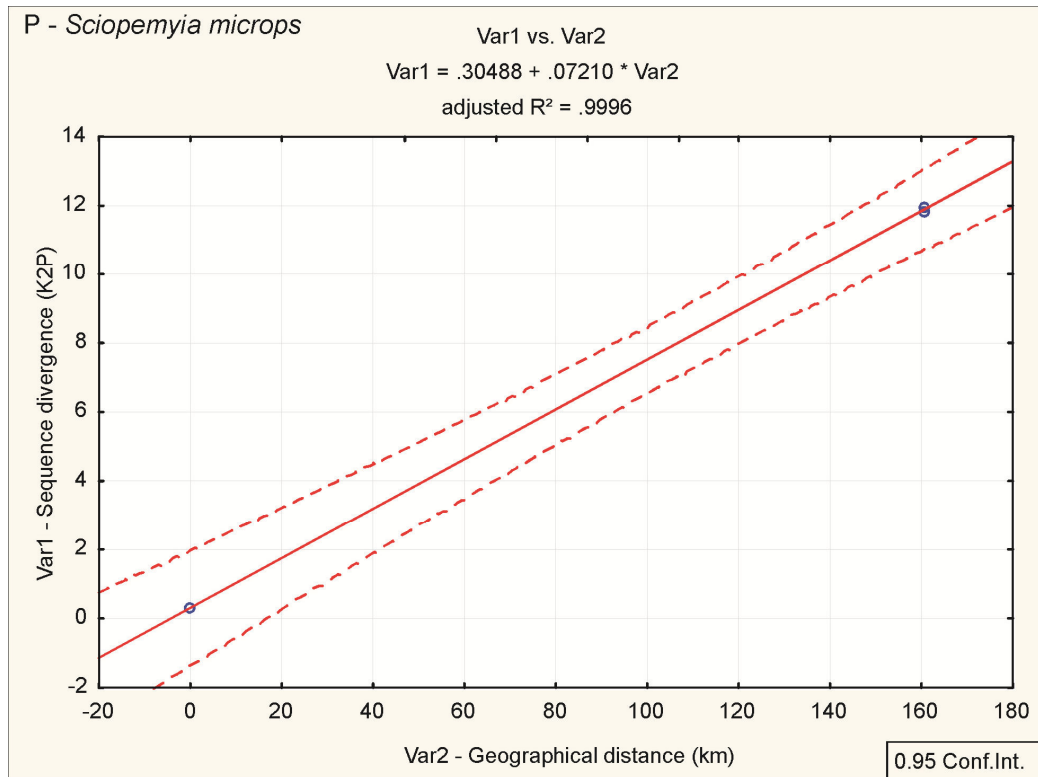
**Figure 5.22 - Supporting Information S6.M.** Correlation analyses showing the relationship between sequence divergence and geographical distance among *Psathyromyia bigeniculata* specimens.



**Figure 5.23 - Supporting Information S6.N.** Correlation analyses showing the relationship between sequence divergence and geographical distance among *Psathyromyia limai* specimens.



**Figure 5.24 - Supporting Information S6.O.** Correlation analyses showing the relationship between sequence divergence and geographical distance among *Psychodopygus matosi* specimens.



**Figure 5.25 - Supporting Information S6.P.** Correlation analyses showing the relationship between between sequence divergence and geographical distance among *Sciopemyia microps* specimens.



**Table 5.1 - Supporting Information S1.** Table showing the collections sites and number and sex of sand fly specimens for each analyzed species used to create the DNA barcoding tree in the Figure 2. Maximum and mean intraspecific values of genetic divergence (Kimura 2-parameter pairwise distances) are shown. As implemented by the Barcode of Life Database (BOLD), values are given only to species represented by three or more individuals and showing at least one nucleotide substitution. Nominal species marked with one asterisk showed distinct intraspecific lineages suggesting cryptic species complexes. Classification follows Galati (1995, 2003b) and the generic abbreviations follow Marcondes (2007).

Genus			♂	♀	% divergence [max. (mean)]
Species	Locality, State				
<b><i>Bichromomyia</i></b>					-/-
<i>Bichromomyia flaviscutellata</i>	Santa Teresa, ES		2		-/-
<b><i>Brumptomyia</i></b>					16.12 (12.5)
<i>Brumptomyia cunhai</i>	Pancas, ES		17		1.08 (0.39)
<i>Brumptomyia nitzulescui</i>	Alto Rio Novo, ES		1		1.54 (0.28)
	Domingos Martins, ES		4		
	Santa Maria de Jetibá, ES		11		
<i>Brumptomyia ortizi</i>	Bom Jesus do Itabapoana, RJ		2		-/-
<i>Brumptomyia</i> spp.	Bom Jesus do Itabapoana, RJ			5	-/-
	Domingos Martins, ES			2	
	Pancas, ES			1	
	Santa Maria de Jetibá, ES			2	
<b><i>Evandromyia</i></b>					19.2 (15)
<i>Evandromyia carmelinoi</i>	Cáceres, MT		2		-/-
<i>Evandromyia edwardsi</i> *					19.04 (5.14)
<i>Evandromyia edwardsi</i> PS1	Pancas, ES		1	3	-/-
<i>Evandromyia edwardsi</i> PS2	Pancas, ES			1	-/-
	Santa Maria de Jetibá, ES			1	
<i>Evandromyia edwardsi</i> PS3	Pancas, ES		1	2	0.3 (0.12)
	Santa Maria de Jetibá, ES			1	
	Santa Teresa, ES			1	
<i>Evandromyia lenti</i>	Pancas, ES		1		-/-
<i>Evandromyia</i> spp.	Alfredo Chaves, ES			1	-/-
	Pancas, ES			8	
	Santa Leopoldina, ES			2	
<i>Evandromyia termitophila</i>	Cáceres, MT			2	-/-
<i>Evandromyia tupynambai</i>	Pancas, ES		1		-/-
<b><i>Expapillata</i></b>					0.61 (0.25)
<i>Expapillata firmatoi</i>	Pancas, ES		3	3	0.61 (0.25)
<b><i>Lutzomyia</i></b>					15.30 (9.42)
<i>Lutzomyia alencari</i>	Pancas, ES		3		0.46 (0.31)
<i>Lutzomyia cruzi</i>	Cáceres, MT		6		4.1 (2.61)
<i>Lutzomyia dispar</i>	Cáceres, MT		2		-/-

<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Pancas, ES Cáceres, MT	10 6		5.07 (2.33)
<i>Lutzomyia renei</i>	Lagoa Santa, MG	10		0.46 (0.21)
<i>Lutzomyia</i> sp.	Cáceres, MT	1		-/-
<b>Micropygomyia</b>				16.26 (13.53)
<i>Micropygomyia capixaba</i>	Pancas, ES	4		-/-
<i>Micropygomyia echinatopharynx</i>	Cáceres, MT	1		-/-
<i>Micropygomyia ferreirana</i>	Bom Jesus do Itabapoana, RJ Domingos Martins, ES Pancas, ES Santa Maria de Jetibá, ES	2 19 3	1	3.13 (1.36)
<i>Micropygomyia peresi</i>	Cáceres, MT	1		-/-
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	Pancas, ES	22	3	0.46 (0.15)
<i>Micropygomyia schreiberi</i>	Mantenópolis, ES Marilândia, ES Pancas, ES	20	1	0.30 (0.15)
<b>Migonemyia</b>				1.54 (0.47)
<i>Migonemyia migonei</i>	Itaguaçu, ES Pancas, ES Santa Maria de Jetibá, ES	1 18 1	3 5	1.54 (0.47)
<b>Nyssomyia</b>				7.08 (3.56)
<i>Nyssomyia intermedia</i>	Pancas, ES Santa Leopoldina, ES	25 11	2 10	1.86 (0.79)
<i>Nyssomyia whitmani</i>	Cáceres, MT Iúna, ES	7 1	1	2.97 (1.64)
<i>Nyssomyia yuilli yuilli</i>	Wenceslau Guimarães, BA	1		-/-
<b>Pintomyia</b>				
<i>Pintomyia bianchigalatae</i>	Alto Rio Novo, ES Domingos Martins, ES Mantenópolis, ES		1 2 1	2.01 (1.39)
<i>Pintomyia fischeri</i>	Alto Rio Novo, ES Domingos Martins, ES Itaguaçu, ES Mantenópolis, ES Marilândia, ES Pancas, ES Santa Leopoldina, ES Santa Teresa, ES	4 1 1 12 2	1 7 1 1 3 3	3.77 (1.05)
<i>Pintomyia misionensis</i>	Alto Rio Novo, ES Domingos Martins, ES Ibitirama, ES Itaguaçu, ES	1	3 6 10	2.97 (0.87)

	Iúna, ES		5	
<i>Pintomyia monticola</i> *				8.8 (4.26)
<i>Pintomyia monticola</i> PS1	Alfredo Chaves, ES		2	2.97 (1.31)
	Domingos Martins, ES		10	
	Santa Teresa, ES		8	
<i>Pintomyia monticola</i> PS2	Alto Rio Novo, ES		8	0.46 (0.12)
	Iúna, ES		2	
	João Neiva, ES		2	
	Mantenópolis, ES		8	
	Marilândia, ES		8	
	Santa Teresa, ES		1	
<b><i>Pressatia</i></b>				0.46 (0.15)
<i>Pressatia choti</i>	Pancas, ES		17	0.46 (0.18)
<i>Pressatia</i> spp.	Pancas, ES		8	-/-
<b><i>Psathyromyia</i></b>				17.01 (11.51)
<i>Psathyromyia bigeniculata</i> *				4.23 (1.71)
<i>Psathyromyia bigeniculata</i> PS1	Santa Leopoldina, ES		1	5
				0.3 (0.1)
<i>Psathyromyia bigeniculata</i> PS2	Cáceres, MT		1	1
				-/-
<i>Psathyromyia limai</i>	Alfredo Chaves, ES			4
	Domingos Martins, ES		2	
	Itaguaçu, ES		2	5
	João Neiva, ES			2
	Marilândia, ES			2
	Santa Maria de Jetibá, ES			4
<i>Psathyromyia lutziana</i>	Pancas, ES		1	1
				-/-
<i>Psathyromyia pascalei</i>	Alfredo Chaves, ES		3	1
	Alto Rio Novo, ES		1	
	Baixo Guandu, ES		1	1
	Bom Jesus do Itabapoana, RJ		1	
	Domingos Martins, ES		1	3
	Pancas, ES		3	
	Santa Maria de Jetibá, ES		1	
<i>Psathyromyia pellowi</i>	João Neiva, ES		1	-/-
<b><i>Psychodopygus</i></b>				14.78 (11.48)
<i>Psychodopygus ayrozai</i>	Domingos Martins, ES		6	2.17 (1.35)
	Wenceslau Guimarães, BA		1	
<i>Psychodopygus davisi</i>	Santa Leopoldina, ES		5	2
				0.61 (0.39)
<i>Psychodopygus hirsutus</i>	Domingos Martins, ES		6	8
	João Neiva, ES			5
	Pancas, ES		2	1
	Santa Leopoldina, ES		1	2
<i>Psychodopygus matosi</i> *				4.41 (1.22)
<i>Psychodopygus matosi</i> PS1	Afonso Cláudio, ES		4	4
	Alfredo Chaves, ES		2	1
	Marilândia, ES			1
	Santa Maria de Jetibá, ES			2

<i>Psychodopygus matosi</i> PS2	Santa Teresa, ES Afonso Cláudio, ES	11 1	14 -/-
<b><i>Sciopemyia</i></b>			17.06 (13.77)
<i>Sciopemyia microps</i> *			11.98 (8.03)
<i>Sciopemyia microps</i> PS1	Iúna, ES		1 -/-
<i>Sciopemyia microps</i> PS2	Pancas, ES	2	-/-
<i>Sciopemyia sordellii</i>	Cáceres, MT		1 -/-
<i>Sciopemyia</i> spp.	Pancas, ES		3 -/-
<b><i>Trichophoromyia</i></b>			1.39 (0.5)
<i>Trichophoromyia viannamartinsi</i>	Wenceslau Guimarães, BA	14	2 1.39 (0.5)

**Table 5.2 - Supporting information S2.** Phlebotominae taxa sampled, museum specimen number, BOLD and GenBank accession numbers.

Identification	BIN	Sample ID	Museum ID	Process ID	GenBank
<i>Bichromomyia flaviscutellata</i>	BOLD:ACM6850	LBMI#0442	90526	AFBR541-14	KP112487
<i>Bichromomyia flaviscutellata</i>	BOLD:ACM6850	LBMI#0441	90525	AFBR540-14	KP112488
<i>Brumptomyia cunhai</i>	BOLD:ACK2711	LBMI#0261	90408	AFBR384-14	KP112489
<i>Brumptomyia cunhai</i>	BOLD:ACK2711	LBMI#0267	90416	AFBR390-14	KP112490
<i>Brumptomyia cunhai</i>	BOLD:ACK2711	LBMI#0004	90201	AFBR003-13	KP112491
<i>Brumptomyia cunhai</i>	BOLD:ACK2711	LBMI#0230	90386	AFBR358-14	KP112492
<i>Brumptomyia cunhai</i>	BOLD:ACK2711	LBMI#0231	90387	AFBR359-14	KP112493
<i>Brumptomyia cunhai</i>	BOLD:ACK2711	LBMI#0232	90388	AFBR360-14	KP112494
<i>Brumptomyia cunhai</i>	BOLD:ACK2711	LBMI#0234	90390	AFBR361-14	KP112495
<i>Brumptomyia cunhai</i>	BOLD:ACK2711	LBMI#0200	90354	AFBR335-14	KP112496
<i>Brumptomyia cunhai</i>	BOLD:ACK2711	LBMI#0268	90417	AFBR391-14	KP112497
<i>Brumptomyia cunhai</i>	BOLD:ACK2711	LBMI#0197	90353	AFBR332-14	KP112498
<i>Brumptomyia cunhai</i>	BOLD:ACK2711	LBMI#0239	90391	AFBR365-14	KP112499
<i>Brumptomyia cunhai</i>	BOLD:ACK2711	LBMI#0240	90392	AFBR366-14	KP112500
<i>Brumptomyia cunhai</i>	BOLD:ACK2711	LBMI#0269	90418	AFBR392-14	KP112501
<i>Brumptomyia cunhai</i>	BOLD:ACK2711	LBMI#0270	90419	AFBR393-14	KP112502
<i>Brumptomyia cunhai</i>	BOLD:ACK2711	LBMI#0283	90372	AFBR406-14	KP112503
<i>Brumptomyia cunhai</i>	BOLD:ACK2711	LBMI#0247	90394	AFBR372-14	KP112504
<i>Brumptomyia cunhai</i>	BOLD:ACK2711	LBMI#0064	90202	AFBR054-13	KP112505
<i>Brumptomyia nitzulescui</i>	BOLD:ACK6733	LBMI#0631	90726	AFBR702-14	KP112506
<i>Brumptomyia nitzulescui</i>	BOLD:ACK6733	LBMI#0328	90473	AFBR447-14	KP112507
<i>Brumptomyia nitzulescui</i>	BOLD:ACK6733	LBMI#0549	90637	AFBR638-14	KP112508
<i>Brumptomyia nitzulescui</i>	BOLD:ACK6733	LBMI#0329	90474	AFBR448-14	KP112509
<i>Brumptomyia nitzulescui</i>	BOLD:ACK6733	LBMI#0460	90571	AFBR559-14	KP112510
<i>Brumptomyia nitzulescui</i>	BOLD:ACK6733	LBMI#0332	90475	AFBR451-14	KP112511
<i>Brumptomyia nitzulescui</i>	BOLD:ACK6733	LBMI#0333	90476	AFBR452-14	KP112512
<i>Brumptomyia nitzulescui</i>	BOLD:ACK6733	LBMI#0334	90477	AFBR453-14	KP112513
<i>Brumptomyia nitzulescui</i>	BOLD:ACK6733	LBMI#0335	90478	AFBR454-14	KP112514
<i>Brumptomyia nitzulescui</i>	BOLD:ACK6733	LBMI#0336	90479	AFBR455-14	KP112515
<i>Brumptomyia nitzulescui</i>	BOLD:ACK6733	LBMI#0337	90480	AFBR456-14	KP112516
<i>Brumptomyia nitzulescui</i>	BOLD:ACK6733	LBMI#0338	90481	AFBR457-14	KP112517
<i>Brumptomyia nitzulescui</i>	BOLD:ACK6733	LBMI#0339	90482	AFBR458-14	KP112518
<i>Brumptomyia nitzulescui</i>	BOLD:ACK6733	LBMI#0636	90541	AFBR705-14	KP112519
<i>Brumptomyia nitzulescui</i>	BOLD:ACK6733	LBMI#0633	90728	AFBR704-14	KP112520
<i>Brumptomyia nitzulescui</i>	BOLD:ACK6733	LBMI#0632	90727	AFBR703-14	KP112521
<i>Brumptomyia ortizi</i>	BOLD:ACM5394	LBMI#0391	90737	AFBR494-14	KP112522
<i>Brumptomyia ortizi</i>	BOLD:ACM5394	LBMI#0394	90740	AFBR497-14	KP112523
<i>Brumptomyia</i> sp.	BOLD:ACK6733	LBMI#0330	90485	AFBR449-14	KP112524
<i>Brumptomyia</i> sp.	BOLD:ACK6733	LBMI#0639	90544	AFBR707-14	KP112525
<i>Brumptomyia</i> sp.	BOLD:ACK6733	LBMI#0331	90486	AFBR450-14	KP112527
<i>Brumptomyia</i> sp.	BOLD:ACK6733	LBMI#0638	90543	AFBR706-14	KP112528
<i>Brumptomyia</i> sp.	BOLD:ACK6733	LBMI#0201	90355	AFBR336-14	KP112533
<i>Brumptomyia</i> sp.	BOLD:ACM5394	LBMI#0392	90738	AFBR495-14	KP112526
<i>Brumptomyia</i> sp.	BOLD:ACM5394	LBMI#0389	90735	AFBR492-14	KP112529
<i>Brumptomyia</i> sp.	BOLD:ACM5394	LBMI#0390	90736	AFBR493-14	KP112530
<i>Brumptomyia</i> sp.	BOLD:ACM5394	LBMI#0393	90739	AFBR496-14	KP112531
<i>Brumptomyia</i> sp.	BOLD:ACM5394	LBMI#0388	90734	AFBR491-14	KP112532
<i>Evandromyia carmelinoi</i>	BOLD:ACK2880	LBMI#0398	90766	AFBR498-14	KP112534
<i>Evandromyia carmelinoi</i>	BOLD:ACK2880	LBMI#0400	90768	AFBR499-14	KP112535
<i>Evandromyia edwardsi</i>	BOLD:ACK5589	LBMI#0340	90487	AFBR459-14	KP112536
<i>Evandromyia edwardsi</i>	BOLD:ACK5589	LBMI#0253	90407	AFBR376-14	KP112537
<i>Evandromyia edwardsi</i>	BOLD:ACK5589	LBMI#0347	90494	AFBR466-14	KP112540
<i>Evandromyia edwardsi</i>	BOLD:ACK5589	LBMI#0164	90286	AFBR308-14	KP112543

<i>Evandromyia edwardsi</i>	BOLD:ACK5589	LBMI#0199	90356	AFBR334-14	KP112544
<i>Evandromyia edwardsi</i>	BOLD:ACK6779	LBMI#0244	90396	AFBR369-14	KP112539
<i>Evandromyia edwardsi</i>	BOLD:ACK6779	LBMI#0115	90203	AFBR266-14	KP112542
<i>Evandromyia edwardsi</i>	BOLD:ACK6779	LBMI#0262	90420	AFBR385-14	KP112546
<i>Evandromyia edwardsi</i>	BOLD:ACK6779	LBMI#0260	90409	AFBR383-14	KP112547
<i>Evandromyia edwardsi</i>	BOLD:ACK6780	LBMI#0252	90406	AFBR375-14	KP112538
<i>Evandromyia edwardsi</i>	BOLD:ACK6780	LBMI#0341	90488	AFBR460-14	KP112541
<i>Evandromyia lenti</i>	BOLD:ACK2880	LBMI#0026	90189	AFBR024-13	KP112548
<i>Evandromyia sp.</i>	BOLD:ACK6874	LBMI#0342	90173	AFBR461-14	KP112549
<i>Evandromyia sp.</i>	BOLD:ACK6874	LBMI#0280	90373	AFBR403-14	KP112552
<i>Evandromyia sp.</i>	BOLD:ACK6874	LBMI#0245	90398	AFBR370-14	KP112553
<i>Evandromyia sp.</i>	BOLD:ACK6874	LBMI#0140	90288	AFBR290-14	KP112554
<i>Evandromyia sp.</i>	BOLD:ACK6874	LBMI#0193	90357	AFBR329-14	KP112556
<i>Evandromyia sp.</i>	BOLD:ACK6874	LBMI#0237	90397	AFBR363-14	KP112557
<i>Evandromyia sp.</i>	BOLD:ACK6874	LBMI#0263	90421	AFBR386-14	KP112558
<i>Evandromyia sp.</i>	BOLD:ACK6874	LBMI#0118	90287	AFBR269-14	KP112559
<i>Evandromyia sp.</i>	BOLD:ACK6875	LBMI#0493	90581	AFBR589-14	KP112550
<i>Evandromyia sp.</i>	BOLD:ACK6875	LBMI#0494	90582	AFBR590-14	KP112551
<i>Evandromyia sp.</i>	BOLD:ACK6875	LBMI#0303	90456	AFBR424-14	KP112555
<i>Evandromyia termitophila</i>	BOLD:ACM6762	LBMI#0401	90769	AFBR500-14	KP112560
<i>Evandromyia termitophila</i>	BOLD:ACM6762	LBMI#0396	90.764	AFBR752-14	KP112561
<i>Evandromyia tupynambai</i>	BOLD:ACK6874	LBMI#0277	90374	AFBR400-14	KP112562
<i>Expapillata firmatoi</i>	BOLD:ACK2994	LBMI#0159	90292	AFBR306-14	KP112563
<i>Expapillata firmatoi</i>	BOLD:ACK2994	LBMI#0119	90289	AFBR270-14	KP112564
<i>Expapillata firmatoi</i>	BOLD:ACK2994	LBMI#0154	90291	AFBR302-14	KP112565
<i>Expapillata firmatoi</i>	BOLD:ACK2994	LBMI#0139	90290	AFBR289-14	KP112566
<i>Expapillata firmatoi</i>	BOLD:ACK2994	LBMI#0183	90318	AFBR320-14	KP112567
<i>Expapillata firmatoi</i>	BOLD:ACK2994	LBMI#0167	90317	AFBR310-14	KP112568
<i>Lutzomyia alencari</i>	BOLD:ACD9711	LBMI#0343	90174	AFBR462-14	KP112569
<i>Lutzomyia alencari</i>	BOLD:ACD9711	LBMI#0430	90505	AFBR529-14	KP112570
<i>Lutzomyia alencari</i>	BOLD:ACD9711	LBMI#0344	90175	AFBR463-14	KP112571
<i>Lutzomyia cruzi</i>	BOLD:AAZ5016	LBMI#0420	90788	AFBR519-14	KP112573
<i>Lutzomyia cruzi</i>	BOLD:AAZ5016	LBMI#0416	90784	AFBR515-14	KP112575
<i>Lutzomyia cruzi</i>	BOLD:ACM6900	LBMI#0413	90781	AFBR512-14	KP112577
<i>Lutzomyia cruzi</i>	BOLD:ACM6901	LBMI#0423	90791	AFBR522-14	KP112572
<i>Lutzomyia cruzi</i>	BOLD:ACM6901	LBMI#0406	90774	AFBR505-14	KP112574
<i>Lutzomyia cruzi</i>	BOLD:ACM6901	LBMI#0411	90779	AFBR510-14	KP112576
<i>Lutzomyia dispar</i>	BOLD:ACM5192	LBMI#0364	90761	AFBR477-14	KP112578
<i>Lutzomyia dispar</i>	BOLD:ACM5192	LBMI#0365	90762	AFBR478-14	KP112579
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	BOLD:AAZ5016	LBMI#0410	90778	AFBR509-14	KP112586
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	BOLD:AAZ5016	LBMI#0422	90790	AFBR521-14	KP112595
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	BOLD:ACD9711	LBMI#0044	90183	AFBR038-13	KP112580
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	BOLD:ACD9711	LBMI#0049	90188	AFBR042-13	KP112582
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	BOLD:ACD9711	LBMI#0047	90186	AFBR041-13	KP112583
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	BOLD:ACD9711	LBMI#0046	90185	AFBR040-13	KP112584
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	BOLD:ACD9711	LBMI#0045	90184	AFBR039-13	KP112585
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	BOLD:ACD9711	LBMI#0409	90777	AFBR508-14	KP112587
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	BOLD:ACD9711	LBMI#0403	90771	AFBR502-14	KP112589
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	BOLD:ACD9711	LBMI#0043	90182	AFBR037-13	KP112590
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	BOLD:ACD9711	LBMI#0042	90181	AFBR036-13	KP112591
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	BOLD:ACD9711	LBMI#0041	90180	AFBR035-13	KP112592
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	BOLD:ACD9711	LBMI#0039	90178	AFBR034-13	KP112593
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	BOLD:ACD9711	LBMI#0038	90177	AFBR033-13	KP112594
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	BOLD:ACM6900	LBMI#0408	90776	AFBR507-14	KP112588
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	BOLD:ACM6901	LBMI#0418	90786	AFBR517-14	KP112581
<i>Lutzomyia renei</i>	BOLD:ACM7046	LBMI#0490	90802	AFBR587-14	KP112596
<i>Lutzomyia renei</i>	BOLD:ACM7046	LBMI#0486	90798	AFBR583-14	KP112597

<i>Lutzomyia renei</i>	BOLD:ACM7046	LBMI#0484	90796	AFBR581-14	KP112598
<i>Lutzomyia renei</i>	BOLD:ACM7046	LBMI#0487	90799	AFBR584-14	KP112599
<i>Lutzomyia renei</i>	BOLD:ACM7046	LBMI#0483	90795	AFBR580-14	KP112600
<i>Lutzomyia renei</i>	BOLD:ACM7046	LBMI#0485	90797	AFBR582-14	KP112601
<i>Lutzomyia renei</i>	BOLD:ACM7046	LBMI#0489	90801	AFBR586-14	KP112602
<i>Lutzomyia renei</i>	BOLD:ACM7046	LBMI#0488	90800	AFBR585-14	KP112603
<i>Lutzomyia renei</i>	BOLD:ACM7046	LBMI#0481	90793	AFBR578-14	KP112604
<i>Lutzomyia renei</i>	BOLD:ACM7046	LBMI#0482	90794	AFBR579-14	KP112605
<i>Lutzomyia</i> sp.	BOLD:ACM6901	LBMI#0414	90782	AFBR513-14	KP112606
<i>Micropygomyia capixaba</i>	BOLD:ACK6942	LBMI#0282	90378	AFBR405-14	KP112607
<i>Micropygomyia capixaba</i>	BOLD:ACK6942	LBMI#0276	90376	AFBR399-14	KP112608
<i>Micropygomyia capixaba</i>	BOLD:ACK6942	LBMI#0278	90377	AFBR401-14	KP112609
<i>Micropygomyia capixaba</i>	BOLD:ACK6942	LBMI#0275	90375	AFBR398-14	KP112610
<i>Micropygomyia echinatopharynx</i>	BOLD:ACM7137	LBMI#0395	90.763	AFBR751-14	KP112611
<i>Micropygomyia ferreirana</i>	BOLD:ACK2238	LBMI#0603	90691	AFBR678-14	KP112612
<i>Micropygomyia ferreirana</i>	BOLD:ACK2238	LBMI#0286	90382	AFBR409-14	KP112613
<i>Micropygomyia ferreirana</i>	BOLD:ACK2238	LBMI#0285	90381	AFBR408-14	KP112614
<i>Micropygomyia ferreirana</i>	BOLD:ACK2238	LBMI#0321	90483	AFBR440-14	KP112615
<i>Micropygomyia ferreirana</i>	BOLD:ACK2238	LBMI#0322	90484	AFBR441-14	KP112616
<i>Micropygomyia ferreirana</i>	BOLD:ACK2238	LBMI#0284	90380	AFBR407-14	KP112617
<i>Micropygomyia ferreirana</i>	BOLD:ACK2238	LBMI#0585	90673	AFBR667-14	KP112618
<i>Micropygomyia ferreirana</i>	BOLD:ACK2238	LBMI#0148	90293	AFBR297-14	KP112619
<i>Micropygomyia ferreirana</i>	BOLD:ACK2238	LBMI#0117	90294	AFBR268-14	KP112620
<i>Micropygomyia ferreirana</i>	BOLD:ACK2238	LBMI#0550	90638	AFBR639-14	KP112621
<i>Micropygomyia ferreirana</i>	BOLD:ACK2238	LBMI#0264	90422	AFBR387-14	KP112622
<i>Micropygomyia ferreirana</i>	BOLD:ACK2238	LBMI#0279	90379	AFBR402-14	KP112623
<i>Micropygomyia ferreirana</i>	BOLD:ACK2238	LBMI#0082	90207	AFBR069-13	KP112624
<i>Micropygomyia ferreirana</i>	BOLD:ACK2238	LBMI#0257	90410	AFBR380-14	KP112625
<i>Micropygomyia ferreirana</i>	BOLD:ACK2238	LBMI#0243	90402	AFBR368-14	KP112626
<i>Micropygomyia ferreirana</i>	BOLD:ACK2238	LBMI#0242	90401	AFBR367-14	KP112627
<i>Micropygomyia ferreirana</i>	BOLD:ACK2238	LBMI#0238	90400	AFBR364-14	KP112628
<i>Micropygomyia ferreirana</i>	BOLD:ACK2238	LBMI#0235	90399	AFBR362-14	KP112629
<i>Micropygomyia ferreirana</i>	BOLD:ACK2238	LBMI#0203	90358	AFBR338-14	KP112631
<i>Micropygomyia ferreirana</i>	BOLD:ACK2238	LBMI#0204	90359	AFBR339-14	KP112632
<i>Micropygomyia ferreirana</i>	BOLD:ACK2238	LBMI#0206	90361	AFBR340-14	KP112633
<i>Micropygomyia ferreirana</i>	BOLD:ACM4770	LBMI#0385	90731	AFBR488-14	KP112636
<i>Micropygomyia ferreirana</i>	BOLD:ACM5781	LBMI#0246	90403	AFBR371-14	KP112630
<i>Micropygomyia ferreirana</i>	BOLD:ACM5781	LBMI#0207	90362	AFBR341-14	KP112634
<i>Micropygomyia ferreirana</i>	BOLD:ACM5781	LBMI#0208	90363	AFBR342-14	KP112635
<i>Micropygomyia peresi</i>	BOLD:ACM7136	LBMI#0397	90.765	AFBR753-14	KP112637
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	BOLD:ACK3053	LBMI#0190	90327	AFBR326-14	KP112638
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	BOLD:ACK3053	LBMI#0191	90328	AFBR327-14	KP112639
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	BOLD:ACK3053	LBMI#0192	90329	AFBR328-14	KP112640
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	BOLD:ACK3053	LBMI#0281	90384	AFBR404-14	KP112641
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	BOLD:ACK3053	LBMI#0194	90364	AFBR330-14	KP112642
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	BOLD:ACK3053	LBMI#0195	90365	AFBR331-14	KP112643
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	BOLD:ACK3053	LBMI#0018	90209	AFBR017-13	KP112644
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	BOLD:ACK3053	LBMI#0150	90298	AFBR299-14	KP112645
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	BOLD:ACK3053	LBMI#0149	90297	AFBR298-14	KP112646
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	BOLD:ACK3053	LBMI#0073	90213	AFBR061-13	KP112647
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	BOLD:ACK3053	LBMI#0147	90296	AFBR296-14	KP112648
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	BOLD:ACK3053	LBMI#0168	90319	AFBR311-14	KP112649
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	BOLD:ACK3053	LBMI#0227	90366	AFBR355-14	KP112650
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	BOLD:ACK3053	LBMI#0171	90320	AFBR313-14	KP112651
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	BOLD:ACK3053	LBMI#0072	90212	AFBR060-13	KP112652
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	BOLD:ACK3053	LBMI#0116	90214	AFBR267-14	KP112653
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	BOLD:ACK3053	LBMI#0155	90350	AFBR303-14	KP112654

<i>Micropygomyia quinquefer</i>	BOLD:ACK3053	LBMI#0180	90323	AFBR317-14	KP112655
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	BOLD:ACK3053	LBMI#0274	90383	AFBR397-14	KP112656
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	BOLD:ACK3053	LBMI#0182	90322	AFBR319-14	KP112657
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	BOLD:ACK3053	LBMI#0071	90211	AFBR059-13	KP112658
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	BOLD:ACK3053	LBMI#0016	90208	AFBR015-13	KP112659
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	BOLD:ACK3053	LBMI#0185	90324	AFBR322-14	KP112660
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	BOLD:ACK3053	LBMI#0187	90326	AFBR324-14	KP112661
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	BOLD:ACK3053	LBMI#0186	90325	AFBR323-14	KP112662
<i>Micropygomyia schreiberi</i>	BOLD:ACK2625	LBMI#0144	90300	AFBR294-14	KP112663
<i>Micropygomyia schreiberi</i>	BOLD:ACK2625	LBMI#0021	90216	AFBR020-13	KP112664
<i>Micropygomyia schreiberi</i>	BOLD:ACK2625	LBMI#0022	90217	AFBR021-13	KP112665
<i>Micropygomyia schreiberi</i>	BOLD:ACK2625	LBMI#0023	90218	AFBR022-13	KP112666
<i>Micropygomyia schreiberi</i>	BOLD:ACK2625	LBMI#0024	90190	AFBR023-13	KP112667
<i>Micropygomyia schreiberi</i>	BOLD:ACK2625	LBMI#0056	90219	AFBR049-13	KP112668
<i>Micropygomyia schreiberi</i>	BOLD:ACK2625	LBMI#0060	90223	AFBR052-13	KP112669
<i>Micropygomyia schreiberi</i>	BOLD:ACK2625	LBMI#0081	90225	AFBR068-13	KP112670
<i>Micropygomyia schreiberi</i>	BOLD:ACK2625	LBMI#0108	90226	AFBR259-14	KP112671
<i>Micropygomyia schreiberi</i>	BOLD:ACK2625	LBMI#0109	90227	AFBR260-14	KP112672
<i>Micropygomyia schreiberi</i>	BOLD:ACK2625	LBMI#0110	90228	AFBR261-14	KP112673
<i>Micropygomyia schreiberi</i>	BOLD:ACK2625	LBMI#0131	90229	AFBR282-14	KP112674
<i>Micropygomyia schreiberi</i>	BOLD:ACK2625	LBMI#0132	90230	AFBR283-14	KP112675
<i>Micropygomyia schreiberi</i>	BOLD:ACK2625	LBMI#0133	90231	AFBR284-14	KP112676
<i>Micropygomyia schreiberi</i>	BOLD:ACK2625	LBMI#0134	90232	AFBR285-14	KP112677
<i>Micropygomyia schreiberi</i>	BOLD:ACK2625	LBMI#0142	90301	AFBR292-14	KP112678
<i>Micropygomyia schreiberi</i>	BOLD:ACK2625	LBMI#0143	90299	AFBR293-14	KP112679
<i>Micropygomyia schreiberi</i>	BOLD:ACK2625	LBMI#0146	90302	AFBR295-14	KP112680
<i>Micropygomyia schreiberi</i>	BOLD:ACK2625	LBMI#0156	90303	AFBR304-14	KP112681
<i>Micropygomyia schreiberi</i>	BOLD:ACK2625	LBMI#0160	90304	AFBR307-14	KP112682
<i>Micropygomyia schreiberi</i>	BOLD:ACK2625	LBMI#0459	90570	AFBR558-14	KP112683
<i>Micropygomyia schreiberi</i>	BOLD:ACK2625	LBMI#0477	90568	AFBR574-14	KP112684
<i>Micropygomyia schreiberi</i>	BOLD:ACK2625	LBMI#0002	90215	AFBR002-13	KP112685
<i>Micropygomyia schreiberi</i>	BOLD:ACK2625	LBMI#0538	90626	AFBR629-14	KP112686
<i>Migonemyia migonei</i>	BOLD:ACD7233	LBMI#0011	90233	AFBR010-13	KP112687
<i>Migonemyia migonei</i>	BOLD:ACD7233	LBMI#0566	90654	AFBR652-14	KP112688
<i>Migonemyia migonei</i>	BOLD:ACD7233	LBMI#0567	90655	AFBR653-14	KP112689
<i>Migonemyia migonei</i>	BOLD:ACD7233	LBMI#0125	90245	AFBR276-14	KP112690
<i>Migonemyia migonei</i>	BOLD:ACD7233	LBMI#0013	90251	AFBR012-13	KP112691
<i>Migonemyia migonei</i>	BOLD:ACD7233	LBMI#0138	90309	AFBR288-14	KP112692
<i>Migonemyia migonei</i>	BOLD:ACD7233	LBMI#0137	90308	AFBR287-14	KP112693
<i>Migonemyia migonei</i>	BOLD:ACD7233	LBMI#0126	90246	AFBR277-14	KP112694
<i>Migonemyia migonei</i>	BOLD:ACD7233	LBMI#0127	90247	AFBR278-14	KP112695
<i>Migonemyia migonei</i>	BOLD:ACD7233	LBMI#0128	90248	AFBR279-14	KP112696
<i>Migonemyia migonei</i>	BOLD:ACD7233	LBMI#0323	90489	AFBR442-14	KP112697
<i>Migonemyia migonei</i>	BOLD:ACD7233	LBMI#0129	90249	AFBR280-14	KP112698
<i>Migonemyia migonei</i>	BOLD:ACD7233	LBMI#0130	90250	AFBR281-14	KP112699
<i>Migonemyia migonei</i>	BOLD:ACD7233	LBMI#0568	90656	AFBR738-14	KP112700
<i>Migonemyia migonei</i>	BOLD:ACD7233	LBMI#0135	90307	AFBR286-14	KP112701
<i>Migonemyia migonei</i>	BOLD:ACD7233	LBMI#0565	90653	AFBR651-14	KP112702
<i>Migonemyia migonei</i>	BOLD:ACD7233	LBMI#0050	90234	AFBR043-13	KP112703
<i>Migonemyia migonei</i>	BOLD:ACD7233	LBMI#0052	90236	AFBR045-13	KP112704
<i>Migonemyia migonei</i>	BOLD:ACD7233	LBMI#0083	90237	AFBR070-13	KP112705
<i>Migonemyia migonei</i>	BOLD:ACD7233	LBMI#0084	90238	AFBR071-13	KP112706
<i>Migonemyia migonei</i>	BOLD:ACD7233	LBMI#0085	90239	AFBR072-13	KP112707
<i>Migonemyia migonei</i>	BOLD:ACD7233	LBMI#0086	90240	AFBR073-13	KP112708
<i>Migonemyia migonei</i>	BOLD:ACD7233	LBMI#0087	90241	AFBR074-13	KP112709
<i>Migonemyia migonei</i>	BOLD:ACD7233	LBMI#0088	90242	AFBR075-13	KP112710
<i>Migonemyia migonei</i>	BOLD:ACD7233	LBMI#0089	90243	AFBR076-13	KP112711



<i>Migonemyia migonei</i>	BOLD:ACD7233	LBMI#0174	90331	AFBR314-14	KP112712
<i>Migonemyia migonei</i>	BOLD:ACD7233	LBMI#0170	90330	AFBR312-14	KP112713
<i>Migonemyia migonei</i>	BOLD:ACD7233	LBMI#0090	90244	AFBR077-13	KP112714
<i>Nyssomyia intermedia</i>	BOLD:ACK2790	LBMI#0220	90343	AFBR353-14	KP112715
<i>Nyssomyia intermedia</i>	BOLD:ACK2790	LBMI#0219	90342	AFBR352-14	KP112716
<i>Nyssomyia intermedia</i>	BOLD:ACK2790	LBMI#0254	90411	AFBR377-14	KP112717
<i>Nyssomyia intermedia</i>	BOLD:ACK2790	LBMI#0218	90341	AFBR351-14	KP112718
<i>Nyssomyia intermedia</i>	BOLD:ACK2790	LBMI#0217	90340	AFBR350-14	KP112719
<i>Nyssomyia intermedia</i>	BOLD:ACK2790	LBMI#0216	90339	AFBR349-14	KP112720
<i>Nyssomyia intermedia</i>	BOLD:ACK2790	LBMI#0215	90338	AFBR348-14	KP112721
<i>Nyssomyia intermedia</i>	BOLD:ACK2790	LBMI#0214	90337	AFBR347-14	KP112722
<i>Nyssomyia intermedia</i>	BOLD:ACK2790	LBMI#0213	90336	AFBR346-14	KP112723
<i>Nyssomyia intermedia</i>	BOLD:ACK2790	LBMI#0212	90335	AFBR345-14	KP112724
<i>Nyssomyia intermedia</i>	BOLD:ACK2790	LBMI#0209	90332	AFBR343-14	KP112725
<i>Nyssomyia intermedia</i>	BOLD:ACK2790	LBMI#0157	90313	AFBR305-14	KP112726
<i>Nyssomyia intermedia</i>	BOLD:ACK2790	LBMI#0153	90312	AFBR301-14	KP112727
<i>Nyssomyia intermedia</i>	BOLD:ACK2790	LBMI#0152	90311	AFBR300-14	KP112728
<i>Nyssomyia intermedia</i>	BOLD:ACK2790	LBMI#0141	90310	AFBR291-14	KP112729
<i>Nyssomyia intermedia</i>	BOLD:ACK2790	LBMI#0527	90615	AFBR731-14	KP112730
<i>Nyssomyia intermedia</i>	BOLD:ACK2790	LBMI#0120	90314	AFBR271-14	KP112731
<i>Nyssomyia intermedia</i>	BOLD:ACK2790	LBMI#0105	90261	AFBR256-14	KP112732
<i>Nyssomyia intermedia</i>	BOLD:ACK2790	LBMI#0104	90260	AFBR255-14	KP112733
<i>Nyssomyia intermedia</i>	BOLD:ACK2790	LBMI#0055	90259	AFBR048-13	KP112734
<i>Nyssomyia intermedia</i>	BOLD:ACK2790	LBMI#0054	90258	AFBR047-13	KP112735
<i>Nyssomyia intermedia</i>	BOLD:ACK2790	LBMI#0053	90257	AFBR046-13	KP112736
<i>Nyssomyia intermedia</i>	BOLD:ACK2790	LBMI#0479	90577	AFBR576-14	KP112737
<i>Nyssomyia intermedia</i>	BOLD:ACK2790	LBMI#0014	90256	AFBR013-13	KP112738
<i>Nyssomyia intermedia</i>	BOLD:ACK2790	LBMI#0010	90255	AFBR009-13	KP112739
<i>Nyssomyia intermedia</i>	BOLD:ACK2790	LBMI#0009	90254	AFBR008-13	KP112740
<i>Nyssomyia intermedia</i>	BOLD:ACK2790	LBMI#0008	90253	AFBR007-13	KP112741
<i>Nyssomyia intermedia</i>	BOLD:ACK2790	LBMI#0495	90583	AFBR591-14	KP112742
<i>Nyssomyia intermedia</i>	BOLD:ACK2790	LBMI#0496	90584	AFBR592-14	KP112743
<i>Nyssomyia intermedia</i>	BOLD:ACK2790	LBMI#0497	90585	AFBR593-14	KP112744
<i>Nyssomyia intermedia</i>	BOLD:ACK2790	LBMI#0498	90586	AFBR594-14	KP112745
<i>Nyssomyia intermedia</i>	BOLD:ACK2790	LBMI#0500	90588	AFBR596-14	KP112746
<i>Nyssomyia intermedia</i>	BOLD:ACK2790	LBMI#0501	90589	AFBR597-14	KP112747
<i>Nyssomyia intermedia</i>	BOLD:ACK2790	LBMI#0506	90594	AFBR602-14	KP112748
<i>Nyssomyia intermedia</i>	BOLD:ACK2790	LBMI#0005	90252	AFBR004-13	KP112749
<i>Nyssomyia intermedia</i>	BOLD:ACK2790	LBMI#0520	90608	AFBR614-14	KP112750
<i>Nyssomyia intermedia</i>	BOLD:ACK2790	LBMI#0521	90609	AFBR615-14	KP112751
<i>Nyssomyia intermedia</i>	BOLD:ACK2790	LBMI#0522	90610	AFBR616-14	KP112752
<i>Nyssomyia intermedia</i>	BOLD:ACK2790	LBMI#0523	90611	AFBR617-14	KP112753
<i>Nyssomyia intermedia</i>	BOLD:ACK2790	LBMI#0524	90612	AFBR618-14	KP112754
<i>Nyssomyia intermedia</i>	BOLD:ACK2790	LBMI#0525	90613	AFBR619-14	KP112755
<i>Nyssomyia intermedia</i>	BOLD:ACK2790	LBMI#0526	90614	AFBR620-14	KP112756
<i>Nyssomyia intermedia</i>	BOLD:ACK2790	LBMI#0528	90616	AFBR621-14	KP112757
<i>Nyssomyia intermedia</i>	BOLD:ACK2790	LBMI#0529	90617	AFBR622-14	KP112758
<i>Nyssomyia intermedia</i>	BOLD:ACK2790	LBMI#0530	90618	AFBR623-14	KP112759
<i>Nyssomyia intermedia</i>	BOLD:ACK2790	LBMI#0531	90619	AFBR624-14	KP112760
<i>Nyssomyia intermedia</i>	BOLD:ACK2790	LBMI#0532	90620	AFBR625-14	KP112761
<i>Nyssomyia whitmani</i>	BOLD:ACM7054	LBMI#0419	90787	AFBR518-14	KP112770
<i>Nyssomyia whitmani</i>	BOLD:ACM7055	LBMI#0405	90773	AFBR504-14	KP112763
<i>Nyssomyia whitmani</i>	BOLD:ACM7055	LBMI#0424	90792	AFBR523-14	KP112764
<i>Nyssomyia whitmani</i>	BOLD:ACM7055	LBMI#0407	90775	AFBR506-14	KP112765
<i>Nyssomyia whitmani</i>	BOLD:ACM7055	LBMI#0417	90785	AFBR516-14	KP112769
<i>Nyssomyia whitmani</i>	BOLD:ACO2803	LBMI#0415	90783	AFBR514-14	KP112762
<i>Nyssomyia whitmani</i>	BOLD:ACO2803	LBMI#0096	90433	AFBR081-13	KP112766

<i>Nyssomyia whitmani</i>	BOLD:ACO2803	LBMI#0412	90780	AFBR511-14	KP112767
<i>Nyssomyia whitmani</i>	BOLD:ACO2803	LBMI#0421	90789	AFBR520-14	KP112768
<i>Nyssomyia yuilli yuilli</i>	BOLD:ACM5584	LBMI#0356	90743	AFBR470-14	KP112771
<i>Pintomyia bianchigalatae</i>	BOLD:ACM6928	LBMI#0608	90696	AFBR682-14	KP112772
<i>Pintomyia bianchigalatae</i>	BOLD:ACM6928	LBMI#0476	90567	AFBR573-14	KP112773
<i>Pintomyia bianchigalatae</i>	BOLD:ACM6928	LBMI#0613	90701	AFBR686-14	KP112774
<i>Pintomyia bianchigalatae</i>	BOLD:ACM6928	LBMI#0456	90551	AFBR555-14	KP112775
<i>Pintomyia fischeri</i>	BOLD:ACK3063	LBMI#0448	90510	AFBR547-14	KP112776
<i>Pintomyia fischeri</i>	BOLD:ACK3063	LBMI#0605	90693	AFBR680-14	KP112777
<i>Pintomyia fischeri</i>	BOLD:ACK3063	LBMI#0017	90262	AFBR016-13	KP112778
<i>Pintomyia fischeri</i>	BOLD:ACK3063	LBMI#0031	90195	AFBR027-13	KP112779
<i>Pintomyia fischeri</i>	BOLD:ACK3063	LBMI#0475	90566	AFBR572-14	KP112780
<i>Pintomyia fischeri</i>	BOLD:ACK3063	LBMI#0604	90692	AFBR679-14	KP112782
<i>Pintomyia fischeri</i>	BOLD:ACK3063	LBMI#0032	90196	AFBR028-13	KP112783
<i>Pintomyia fischeri</i>	BOLD:ACK3063	LBMI#0606	90694	AFBR681-14	KP112784
<i>Pintomyia fischeri</i>	BOLD:ACK3063	LBMI#0609	90697	AFBR683-14	KP112785
<i>Pintomyia fischeri</i>	BOLD:ACK3063	LBMI#0610	90698	AFBR684-14	KP112786
<i>Pintomyia fischeri</i>	BOLD:ACK3063	LBMI#0508	90596	AFBR604-14	KP112787
<i>Pintomyia fischeri</i>	BOLD:ACK3063	LBMI#0660	90720	AFBR728-14	KP112788
<i>Pintomyia fischeri</i>	BOLD:ACK3063	LBMI#0537	90625	AFBR628-14	KP112789
<i>Pintomyia fischeri</i>	BOLD:ACK3063	LBMI#0612	90700	AFBR685-14	KP112790
<i>Pintomyia fischeri</i>	BOLD:ACK3063	LBMI#0582	90670	AFBR741-14	KP112791
<i>Pintomyia fischeri</i>	BOLD:ACK3063	LBMI#0510	90598	AFBR606-14	KP112792
<i>Pintomyia fischeri</i>	BOLD:ACK3063	LBMI#0583	90671	AFBR665-14	KP112793
<i>Pintomyia fischeri</i>	BOLD:ACK3063	LBMI#0629	90712	AFBR701-14	KP112795
<i>Pintomyia fischeri</i>	BOLD:ACK3063	LBMI#0518	90606	AFBR612-14	KP112796
<i>Pintomyia fischeri</i>	BOLD:ACK3063	LBMI#0028	90192	AFBR026-13	KP112797
<i>Pintomyia fischeri</i>	BOLD:ACK3063	LBMI#0033	90197	AFBR029-13	KP112798
<i>Pintomyia fischeri</i>	BOLD:ACK3063	LBMI#0519	90607	AFBR613-14	KP112799
<i>Pintomyia fischeri</i>	BOLD:ACK3063	LBMI#0584	90672	AFBR666-14	KP112800
<i>Pintomyia fischeri</i>	BOLD:ACK3063	LBMI#0458	90569	AFBR557-14	KP112801
<i>Pintomyia fischeri</i>	BOLD:ACK3063	LBMI#0509	90597	AFBR605-14	KP112802
<i>Pintomyia fischeri</i>	BOLD:ACK3063	LBMI#0027	90191	AFBR025-13	KP112803
<i>Pintomyia fischeri</i>	BOLD:ACK3063	LBMI#0107	90267	AFBR258-14	KP112804
<i>Pintomyia fischeri</i>	BOLD:ACK3063	LBMI#0067	90265	AFBR057-13	KP112805
<i>Pintomyia fischeri</i>	BOLD:ACK3063	LBMI#0066	90264	AFBR056-13	KP112806
<i>Pintomyia fischeri</i>	BOLD:ACK3063	LBMI#0034	90198	AFBR030-13	KP112807
<i>Pintomyia fischeri</i>	BOLD:ACK3063	LBMI#0036	90200	AFBR031-13	KP112808
<i>Pintomyia fischeri</i>	BOLD:ACK3063	LBMI#0106	90266	AFBR257-14	KP112810
<i>Pintomyia fischeri</i>	BOLD:ACK3063	LBMI#0449	90511	AFBR548-14	KP112811
<i>Pintomyia fischeri</i>	BOLD:ACM6946	LBMI#0557	90645	AFBR644-14	KP112781
<i>Pintomyia fischeri</i>	BOLD:ACM6946	LBMI#0556	90644	AFBR643-14	KP112794
<i>Pintomyia fischeri</i>	BOLD:ACM6946	LBMI#0450	90528	AFBR549-14	KP112809
<i>Pintomyia misionensis</i>	BOLD:ACK2926	LBMI#0092	90426	AFBR078-13	KP112812
<i>Pintomyia misionensis</i>	BOLD:ACK2926	LBMI#0103	90438	AFBR254-14	KP112813
<i>Pintomyia misionensis</i>	BOLD:ACK2926	LBMI#0102	90437	AFBR253-14	KP112814
<i>Pintomyia misionensis</i>	BOLD:ACK2926	LBMI#0572	90660	AFBR739-14	KP112815
<i>Pintomyia misionensis</i>	BOLD:ACK2926	LBMI#0100	90436	AFBR085-13	KP112816
<i>Pintomyia misionensis</i>	BOLD:ACK2926	LBMI#0098	90435	AFBR083-13	KP112817
<i>Pintomyia misionensis</i>	BOLD:ACK2926	LBMI#0097	90434	AFBR082-13	KP112818
<i>Pintomyia misionensis</i>	BOLD:ACK2926	LBMI#0093	90427	AFBR079-13	KP112819
<i>Pintomyia misionensis</i>	BOLD:ACK2926	LBMI#0562	90650	AFBR737-14	KP112821
<i>Pintomyia misionensis</i>	BOLD:ACK2926	LBMI#0570	90658	AFBR655-14	KP112822
<i>Pintomyia misionensis</i>	BOLD:ACK2926	LBMI#0569	90657	AFBR654-14	KP112823
<i>Pintomyia misionensis</i>	BOLD:ACK2926	LBMI#0114	90431	AFBR265-14	KP112824
<i>Pintomyia misionensis</i>	BOLD:ACK2926	LBMI#0113	90430	AFBR264-14	KP112825
<i>Pintomyia misionensis</i>	BOLD:ACK2926	LBMI#0112	90429	AFBR263-14	KP112826

<i>Pintomyia misionensis</i>	BOLD:ACK2926	LBMI#0111	90428	AFBR262-14	KP112827
<i>Pintomyia misionensis</i>	BOLD:ACK2926	LBMI#0563	90651	AFBR649-14	KP112828
<i>Pintomyia misionensis</i>	BOLD:ACK2926	LBMI#0561	90649	AFBR648-14	KP112829
<i>Pintomyia misionensis</i>	BOLD:ACK2926	LBMI#0624	90707	AFBR696-14	KP112830
<i>Pintomyia misionensis</i>	BOLD:ACK2926	LBMI#0623	90706	AFBR695-14	KP112831
<i>Pintomyia misionensis</i>	BOLD:ACK2926	LBMI#0560	90648	AFBR647-14	KP112832
<i>Pintomyia misionensis</i>	BOLD:ACK2926	LBMI#0571	90659	AFBR656-14	KP112833
<i>Pintomyia misionensis</i>	BOLD:ACK2926	LBMI#0559	90647	AFBR646-14	KP112834
<i>Pintomyia misionensis</i>	BOLD:ACK2926	LBMI#0558	90646	AFBR645-14	KP112835
<i>Pintomyia misionensis</i>	BOLD:ACM6931	LBMI#0640	90545	AFBR708-14	KP112820
<i>Pintomyia monticola</i>	BOLD:ACK2220	LBMI#0474	90565	AFBR571-14	KP112836
<i>Pintomyia monticola</i>	BOLD:ACK2220	LBMI#0547	90635	AFBR636-14	KP112837
<i>Pintomyia monticola</i>	BOLD:ACK2220	LBMI#0543	90631	AFBR734-14	KP112839
<i>Pintomyia monticola</i>	BOLD:ACK2220	LBMI#0541	90629	AFBR631-14	KP112840
<i>Pintomyia monticola</i>	BOLD:ACK2220	LBMI#0651	90553	AFBR719-14	KP112845
<i>Pintomyia monticola</i>	BOLD:ACK2220	LBMI#0652	90554	AFBR720-14	KP112846
<i>Pintomyia monticola</i>	BOLD:ACK2220	LBMI#0653	90555	AFBR721-14	KP112847
<i>Pintomyia monticola</i>	BOLD:ACK2220	LBMI#0099	90439	AFBR084-13	KP112850
<i>Pintomyia monticola</i>	BOLD:ACK2220	LBMI#0447	90527	AFBR546-14	KP112855
<i>Pintomyia monticola</i>	BOLD:ACK2220	LBMI#0101	90440	AFBR252-14	KP112856
<i>Pintomyia monticola</i>	BOLD:ACK2220	LBMI#0293	90445	AFBR415-14	KP112857
<i>Pintomyia monticola</i>	BOLD:ACK2220	LBMI#0451	90546	AFBR550-14	KP112859
<i>Pintomyia monticola</i>	BOLD:ACK2220	LBMI#0452	90547	AFBR551-14	KP112860
<i>Pintomyia monticola</i>	BOLD:ACK2220	LBMI#0453	90548	AFBR552-14	KP112861
<i>Pintomyia monticola</i>	BOLD:ACK2220	LBMI#0454	90549	AFBR553-14	KP112862
<i>Pintomyia monticola</i>	BOLD:ACK2220	LBMI#0455	90550	AFBR554-14	KP112863
<i>Pintomyia monticola</i>	BOLD:ACK2220	LBMI#0548	90636	AFBR637-14	KP112868
<i>Pintomyia monticola</i>	BOLD:ACK2220	LBMI#0291	90444	AFBR413-14	KP112870
<i>Pintomyia monticola</i>	BOLD:ACK2220	LBMI#0546	90634	AFBR635-14	KP112871
<i>Pintomyia monticola</i>	BOLD:ACK2220	LBMI#0465	90556	AFBR564-14	KP112872
<i>Pintomyia monticola</i>	BOLD:ACK2220	LBMI#0466	90557	AFBR565-14	KP112873
<i>Pintomyia monticola</i>	BOLD:ACK2220	LBMI#0467	90558	AFBR566-14	KP112874
<i>Pintomyia monticola</i>	BOLD:ACK2220	LBMI#0468	90559	AFBR567-14	KP112875
<i>Pintomyia monticola</i>	BOLD:ACK2220	LBMI#0469	90560	AFBR568-14	KP112876
<i>Pintomyia monticola</i>	BOLD:ACK2220	LBMI#0470	90561	AFBR569-14	KP112877
<i>Pintomyia monticola</i>	BOLD:ACK2220	LBMI#0473	90564	AFBR570-14	KP112878
<i>Pintomyia monticola</i>	BOLD:ACK2220	LBMI#0545	90633	AFBR634-14	KP112879
<i>Pintomyia monticola</i>	BOLD:ACK2220	LBMI#0544	90632	AFBR633-14	KP112880
<i>Pintomyia monticola</i>	BOLD:ACK2220	LBMI#0542	90630	AFBR632-14	KP112881
<i>Pintomyia monticola</i>	BOLD:ACK7188	LBMI#0308	90457	AFBR429-14	KP112843
<i>Pintomyia monticola</i>	BOLD:ACK7188	LBMI#0309	90458	AFBR430-14	KP112844
<i>Pintomyia monticola</i>	BOLD:ACK7189	LBMI#0602	90690	AFBR677-14	KP112838
<i>Pintomyia monticola</i>	BOLD:ACK7189	LBMI#0594	90682	AFBR746-14	KP112841
<i>Pintomyia monticola</i>	BOLD:ACK7189	LBMI#0593	90681	AFBR745-14	KP112842
<i>Pintomyia monticola</i>	BOLD:ACK7189	LBMI#0656	90716	AFBR724-14	KP112848
<i>Pintomyia monticola</i>	BOLD:ACK7189	LBMI#0657	90717	AFBR725-14	KP112849
<i>Pintomyia monticola</i>	BOLD:ACK7189	LBMI#0443	90529	AFBR542-14	KP112851
<i>Pintomyia monticola</i>	BOLD:ACK7189	LBMI#0444	90530	AFBR543-14	KP112852
<i>Pintomyia monticola</i>	BOLD:ACK7189	LBMI#0349	90496	AFBR467-14	KP112864
<i>Pintomyia monticola</i>	BOLD:ACK7189	LBMI#0658	90718	AFBR726-14	KP112865
<i>Pintomyia monticola</i>	BOLD:ACK7189	LBMI#0592	90680	AFBR671-14	KP112866
<i>Pintomyia monticola</i>	BOLD:ACK7189	LBMI#0601	90689	AFBR676-14	KP112867
<i>Pintomyia monticola</i>	BOLD:ACK7189	LBMI#0659	90719	AFBR727-14	KP112869
<i>Pintomyia monticola</i>	BOLD:ACK7189	LBMI#0426	90507	AFBR525-14	KP112883
<i>Pintomyia monticola</i>	BOLD:ACK7189	LBMI#0595	90683	AFBR672-14	KP112884
<i>Pintomyia monticola</i>	BOLD:ACK7190	LBMI#0445	90508	AFBR544-14	KP112853
<i>Pintomyia monticola</i>	BOLD:ACK7190	LBMI#0446	90509	AFBR545-14	KP112854

<i>Pintomyia monticola</i>	BOLD:ACK7190	LBMI#0350	90497	AFBR468-14	KP112858
<i>Pintomyia monticola</i>	BOLD:ACK7190	LBMI#0425	90506	AFBR524-14	KP112882
<i>Pressatia choti</i>	BOLD:ACJ9593	LBMI#0123	90276	AFBR274-14	KP112885
<i>Pressatia choti</i>	BOLD:ACJ9593	LBMI#0122	90269	AFBR273-14	KP112886
<i>Pressatia choti</i>	BOLD:ACJ9593	LBMI#0121	90284	AFBR272-14	KP112887
<i>Pressatia choti</i>	BOLD:ACJ9593	LBMI#0080	90283	AFBR067-13	KP112888
<i>Pressatia choti</i>	BOLD:ACJ9593	LBMI#0079	90282	AFBR066-13	KP112889
<i>Pressatia choti</i>	BOLD:ACJ9593	LBMI#0078	90281	AFBR065-13	KP112890
<i>Pressatia choti</i>	BOLD:ACJ9593	LBMI#0077	90280	AFBR064-13	KP112891
<i>Pressatia choti</i>	BOLD:ACJ9593	LBMI#0076	90279	AFBR063-13	KP112892
<i>Pressatia choti</i>	BOLD:ACJ9593	LBMI#0074	90277	AFBR062-13	KP112893
<i>Pressatia choti</i>	BOLD:ACJ9593	LBMI#0020	90275	AFBR019-13	KP112894
<i>Pressatia choti</i>	BOLD:ACJ9593	LBMI#0019	90274	AFBR018-13	KP112895
<i>Pressatia choti</i>	BOLD:ACJ9593	LBMI#0015	90273	AFBR014-13	KP112896
<i>Pressatia choti</i>	BOLD:ACJ9593	LBMI#0012	90272	AFBR011-13	KP112897
<i>Pressatia choti</i>	BOLD:ACJ9593	LBMI#0007	90271	AFBR006-13	KP112898
<i>Pressatia choti</i>	BOLD:ACJ9593	LBMI#0001	90268	AFBR001-13	KP112899
<i>Pressatia choti</i>	BOLD:ACJ9593	LBMI#0006	90270	AFBR005-13	KP112900
<i>Pressatia choti</i>	BOLD:ACJ9593	LBMI#0124	90278	AFBR275-14	KP112901
<i>Pressatia sp.</i>	BOLD:ACJ9593	LBMI#0175	90345	AFBR315-14	KP112902
<i>Pressatia sp.</i>	BOLD:ACJ9593	LBMI#0251	90405	AFBR374-14	KP112903
<i>Pressatia sp.</i>	BOLD:ACJ9593	LBMI#0250	90404	AFBR373-14	KP112904
<i>Pressatia sp.</i>	BOLD:ACJ9593	LBMI#0226	90367	AFBR354-14	KP112905
<i>Pressatia sp.</i>	BOLD:ACJ9593	LBMI#0228	90368	AFBR356-14	KP112906
<i>Pressatia sp.</i>	BOLD:ACJ9593	LBMI#0188	90347	AFBR325-14	KP112907
<i>Pressatia sp.</i>	BOLD:ACJ9593	LBMI#0184	90346	AFBR321-14	KP112908
<i>Pressatia sp.</i>	BOLD:ACJ9593	LBMI#0166	90344	AFBR309-14	KP112909
<i>Psathyromyia bigeniculata</i>	BOLD:ACM6710	LBMI#0404	90772	AFBR503-14	KP112911
<i>Psathyromyia bigeniculata</i>	BOLD:ACM6710	LBMI#0402	90770	AFBR501-14	KP112912
<i>Psathyromyia bigeniculata</i>	BOLD:ACM6810	LBMI#0504	90592	AFBR600-14	KP112910
<i>Psathyromyia bigeniculata</i>	BOLD:ACM6810	LBMI#0505	90593	AFBR601-14	KP112913
<i>Psathyromyia bigeniculata</i>	BOLD:ACM6810	LBMI#0499	90587	AFBR595-14	KP112914
<i>Psathyromyia bigeniculata</i>	BOLD:ACM6810	LBMI#0507	90595	AFBR603-14	KP112915
<i>Psathyromyia bigeniculata</i>	BOLD:ACM6810	LBMI#0502	90590	AFBR598-14	KP112916
<i>Psathyromyia bigeniculata</i>	BOLD:ACM6810	LBMI#0503	90591	AFBR599-14	KP112917
<i>Psathyromyia limai</i>	BOLD:ACK6674	LBMI#0553	90641	AFBR642-14	KP112918
<i>Psathyromyia limai</i>	BOLD:ACK6674	LBMI#0539	90627	AFBR630-14	KP112919
<i>Psathyromyia limai</i>	BOLD:ACK6674	LBMI#0325	90467	AFBR444-14	KP112920
<i>Psathyromyia limai</i>	BOLD:ACK6674	LBMI#0310	90490	AFBR431-14	KP112921
<i>Psathyromyia limai</i>	BOLD:ACK6674	LBMI#0326	90468	AFBR445-14	KP112922
<i>Psathyromyia limai</i>	BOLD:ACK6674	LBMI#0627	90710	AFBR699-14	KP112923
<i>Psathyromyia limai</i>	BOLD:ACK6674	LBMI#0290	90447	AFBR412-14	KP112924
<i>Psathyromyia limai</i>	BOLD:ACK6674	LBMI#0564	90652	AFBR650-14	KP112925
<i>Psathyromyia limai</i>	BOLD:ACK6674	LBMI#0555	90643	AFBR736-14	KP112926
<i>Psathyromyia limai</i>	BOLD:ACK6674	LBMI#0554	90642	AFBR735-14	KP112927
<i>Psathyromyia limai</i>	BOLD:ACK6674	LBMI#0324	90466	AFBR443-14	KP112928
<i>Psathyromyia limai</i>	BOLD:ACK6674	LBMI#0628	90711	AFBR700-14	KP112929
<i>Psathyromyia limai</i>	BOLD:ACK6674	LBMI#0540	90628	AFBR733-14	KP112930
<i>Psathyromyia limai</i>	BOLD:ACK6674	LBMI#0289	90446	AFBR411-14	KP112931
<i>Psathyromyia limai</i>	BOLD:ACK6674	LBMI#0551	90639	AFBR640-14	KP112932
<i>Psathyromyia limai</i>	BOLD:ACK6674	LBMI#0552	90640	AFBR641-14	KP112933
<i>Psathyromyia limai</i>	BOLD:ACK6674	LBMI#0313	90469	AFBR434-14	KP112934
<i>Psathyromyia limai</i>	BOLD:ACK6674	LBMI#0314	90491	AFBR435-14	KP112935
<i>Psathyromyia limai</i>	BOLD:ACK6674	LBMI#0315	90492	AFBR436-14	KP112936
<i>Psathyromyia limai</i>	BOLD:ACK6674	LBMI#0316	90465	AFBR437-14	KP112937
<i>Psathyromyia limai</i>	BOLD:ACK6674	LBMI#0312	90464	AFBR433-14	KP112938
<i>Psathyromyia lutziana</i>	BOLD:ACK4671	LBMI#0198	90369	AFBR333-14	KP112939

<i>Psathyromyia lutziana</i>	BOLD:ACK4671	LBMI#0181	90348	AFBR318-14	KP112940
<i>Psathyromyia pascalei</i>	BOLD:ACK5205	LBMI#0305	90459	AFBR426-14	KP112941
<i>Psathyromyia pascalei</i>	BOLD:ACK5205	LBMI#0266	90423	AFBR389-14	KP112942
<i>Psathyromyia pascalei</i>	BOLD:ACK5205	LBMI#0463	90574	AFBR562-14	KP112943
<i>Psathyromyia pascalei</i>	BOLD:ACK5205	LBMI#0462	90573	AFBR561-14	KP112944
<i>Psathyromyia pascalei</i>	BOLD:ACK5205	LBMI#0461	90572	AFBR560-14	KP112945
<i>Psathyromyia pascalei</i>	BOLD:ACK5205	LBMI#0457	90552	AFBR556-14	KP112946
<i>Psathyromyia pascalei</i>	BOLD:ACK5205	LBMI#0625	90708	AFBR697-14	KP112947
<i>Psathyromyia pascalei</i>	BOLD:ACK5205	LBMI#0258	90412	AFBR381-14	KP112948
<i>Psathyromyia pascalei</i>	BOLD:ACK5205	LBMI#0635	90730	AFBR749-14	KP112949
<i>Psathyromyia pascalei</i>	BOLD:ACK5205	LBMI#0386	90732	AFBR489-14	KP112950
<i>Psathyromyia pascalei</i>	BOLD:ACK5205	LBMI#0626	90709	AFBR698-14	KP112951
<i>Psathyromyia pascalei</i>	BOLD:ACK5205	LBMI#0534	90622	AFBR626-14	KP112952
<i>Psathyromyia pascalei</i>	BOLD:ACK5205	LBMI#0533	90621	AFBR732-14	KP112953
<i>Psathyromyia pascalei</i>	BOLD:ACK5205	LBMI#0304	90493	AFBR425-14	KP112954
<i>Psathyromyia pascalei</i>	BOLD:ACK5205	LBMI#0634	90729	AFBR748-14	KP112955
<i>Psathyromyia pascalei</i>	BOLD:ACK5205	LBMI#0307	90461	AFBR428-14	KP112956
<i>Psathyromyia pascalei</i>	BOLD:ACK5205	LBMI#0179	90349	AFBR316-14	KP112957
<i>Psathyromyia pascalei</i>	BOLD:ACK5205	LBMI#0311	90463	AFBR432-14	KP112958
<i>Psathyromyia pascalei</i>	BOLD:ACK5205	LBMI#0327	90462	AFBR446-14	KP112959
<i>Psathyromyia pelloni</i>	BOLD:ACK6607	LBMI#0288	90448	AFBR410-14	KP112960
<i>Psychodopygus ayrozai</i>	BOLD:ACM6740	LBMI#0599	90687	AFBR674-14	KP112961
<i>Psychodopygus ayrozai</i>	BOLD:ACM6740	LBMI#0616	90721	AFBR689-14	KP112962
<i>Psychodopygus ayrozai</i>	BOLD:ACM6740	LBMI#0620	90725	AFBR692-14	KP112963
<i>Psychodopygus ayrozai</i>	BOLD:ACM6740	LBMI#0618	90723	AFBR691-14	KP112964
<i>Psychodopygus ayrozai</i>	BOLD:ACM6740	LBMI#0600	90688	AFBR675-14	KP112965
<i>Psychodopygus ayrozai</i>	BOLD:ACM6740	LBMI#0622	90705	AFBR694-14	KP112966
<i>Psychodopygus ayrozai</i>	BOLD:ACM6740	LBMI#0378	90.754	AFBR750-14	KP112967
<i>Psychodopygus davisi</i>	BOLD:ACM6736	LBMI#0516	90604	AFBR610-14	KP112968
<i>Psychodopygus davisi</i>	BOLD:ACM6736	LBMI#0511	90599	AFBR607-14	KP112969
<i>Psychodopygus davisi</i>	BOLD:ACM6736	LBMI#0512	90600	AFBR608-14	KP112970
<i>Psychodopygus davisi</i>	BOLD:ACM6736	LBMI#0515	90603	AFBR609-14	KP112971
<i>Psychodopygus davisi</i>	BOLD:ACM6736	LBMI#0517	90605	AFBR611-14	KP112972
<i>Psychodopygus davisi</i>	BOLD:ACM6736	LBMI#0513	90601	AFBR729-14	KP112973
<i>Psychodopygus davisi</i>	BOLD:ACM6736	LBMI#0514	90602	AFBR730-14	KP112974
<i>Psychodopygus hirsutus</i>	BOLD:ACK6158	LBMI#0480	90578	AFBR577-14	KP112975
<i>Psychodopygus hirsutus</i>	BOLD:ACK6158	LBMI#0596	90684	AFBR747-14	KP112976
<i>Psychodopygus hirsutus</i>	BOLD:ACK6158	LBMI#0271	90424	AFBR394-14	KP112977
<i>Psychodopygus hirsutus</i>	BOLD:ACK6158	LBMI#0272	90425	AFBR395-14	KP112978
<i>Psychodopygus hirsutus</i>	BOLD:ACK6158	LBMI#0591	90679	AFBR744-14	KP112979
<i>Psychodopygus hirsutus</i>	BOLD:ACK6158	LBMI#0590	90678	AFBR743-14	KP112980
<i>Psychodopygus hirsutus</i>	BOLD:ACK6158	LBMI#0589	90677	AFBR742-14	KP112981
<i>Psychodopygus hirsutus</i>	BOLD:ACK6158	LBMI#0273	90385	AFBR396-14	KP112982
<i>Psychodopygus hirsutus</i>	BOLD:ACK6158	LBMI#0294	90449	AFBR416-14	KP112983
<i>Psychodopygus hirsutus</i>	BOLD:ACK6158	LBMI#0295	90450	AFBR417-14	KP112984
<i>Psychodopygus hirsutus</i>	BOLD:ACK6158	LBMI#0296	90451	AFBR418-14	KP112985
<i>Psychodopygus hirsutus</i>	BOLD:ACK6158	LBMI#0297	90452	AFBR419-14	KP112986
<i>Psychodopygus hirsutus</i>	BOLD:ACK6158	LBMI#0614	90702	AFBR687-14	KP112987
<i>Psychodopygus hirsutus</i>	BOLD:ACK6158	LBMI#0615	90703	AFBR688-14	KP112988
<i>Psychodopygus hirsutus</i>	BOLD:ACK6158	LBMI#0478	90576	AFBR575-14	KP112989
<i>Psychodopygus hirsutus</i>	BOLD:ACK6158	LBMI#0617	90722	AFBR690-14	KP112990
<i>Psychodopygus hirsutus</i>	BOLD:ACK6158	LBMI#0588	90676	AFBR670-14	KP112991
<i>Psychodopygus hirsutus</i>	BOLD:ACK6158	LBMI#0586	90674	AFBR668-14	KP112992
<i>Psychodopygus hirsutus</i>	BOLD:ACK6158	LBMI#0621	90704	AFBR693-14	KP112993
<i>Psychodopygus hirsutus</i>	BOLD:ACK6158	LBMI#0587	90675	AFBR669-14	KP112994
<i>Psychodopygus hirsutus</i>	BOLD:ACK6158	LBMI#0598	90686	AFBR673-14	KP112995
<i>Psychodopygus hirsutus</i>	BOLD:ACK6158	LBMI#0492	90580	AFBR588-14	KP112996

<i>Psychodopygus hirsutus</i>	BOLD:ACK6158	LBMI#0298	90453	AFBR420-14	KP112997
<i>Psychodopygus hirsutus</i>	BOLD:ACK6158	LBMI#0655	90715	AFBR723-14	KP112998
<i>Psychodopygus hirsutus</i>	BOLD:ACK6158	LBMI#0654	90714	AFBR722-14	KP112999
<i>Psychodopygus matosi</i>	BOLD:ACK6257	LBMI#0646	90536	AFBR714-14	KP113000
<i>Psychodopygus matosi</i>	BOLD:ACK6257	LBMI#0647	90537	AFBR715-14	KP113001
<i>Psychodopygus matosi</i>	BOLD:ACK6257	LBMI#0648	90538	AFBR716-14	KP113002
<i>Psychodopygus matosi</i>	BOLD:ACK6257	LBMI#0649	90539	AFBR717-14	KP113003
<i>Psychodopygus matosi</i>	BOLD:ACK6257	LBMI#0650	90540	AFBR718-14	KP113004
<i>Psychodopygus matosi</i>	BOLD:ACK6257	LBMI#0580	90668	AFBR663-14	KP113005
<i>Psychodopygus matosi</i>	BOLD:ACK6257	LBMI#0578	90666	AFBR661-14	KP113006
<i>Psychodopygus matosi</i>	BOLD:ACK6257	LBMI#0576	90664	AFBR660-14	KP113007
<i>Psychodopygus matosi</i>	BOLD:ACK6257	LBMI#0575	90663	AFBR659-14	KP113008
<i>Psychodopygus matosi</i>	BOLD:ACK6257	LBMI#0573	90661	AFBR657-14	KP113010
<i>Psychodopygus matosi</i>	BOLD:ACK6257	LBMI#0536	90624	AFBR627-14	KP113011
<i>Psychodopygus matosi</i>	BOLD:ACK6257	LBMI#0440	90524	AFBR539-14	KP113012
<i>Psychodopygus matosi</i>	BOLD:ACK6257	LBMI#0439	90523	AFBR538-14	KP113013
<i>Psychodopygus matosi</i>	BOLD:ACK6257	LBMI#0438	90522	AFBR537-14	KP113014
<i>Psychodopygus matosi</i>	BOLD:ACK6257	LBMI#0437	90521	AFBR536-14	KP113015
<i>Psychodopygus matosi</i>	BOLD:ACK6257	LBMI#0436	90520	AFBR535-14	KP113016
<i>Psychodopygus matosi</i>	BOLD:ACK6257	LBMI#0435	90519	AFBR534-14	KP113017
<i>Psychodopygus matosi</i>	BOLD:ACK6257	LBMI#0434	90518	AFBR533-14	KP113018
<i>Psychodopygus matosi</i>	BOLD:ACK6257	LBMI#0433	90517	AFBR532-14	KP113019
<i>Psychodopygus matosi</i>	BOLD:ACK6257	LBMI#0432	90516	AFBR531-14	KP113020
<i>Psychodopygus matosi</i>	BOLD:ACK6257	LBMI#0431	90515	AFBR530-14	KP113021
<i>Psychodopygus matosi</i>	BOLD:ACK6257	LBMI#0429	90514	AFBR528-14	KP113022
<i>Psychodopygus matosi</i>	BOLD:ACK6257	LBMI#0428	90513	AFBR527-14	KP113023
<i>Psychodopygus matosi</i>	BOLD:ACK6257	LBMI#0427	90512	AFBR526-14	KP113024
<i>Psychodopygus matosi</i>	BOLD:ACK6257	LBMI#0641	90531	AFBR709-14	KP113025
<i>Psychodopygus matosi</i>	BOLD:ACK6257	LBMI#0642	90532	AFBR710-14	KP113026
<i>Psychodopygus matosi</i>	BOLD:ACK6257	LBMI#0643	90533	AFBR711-14	KP113027
<i>Psychodopygus matosi</i>	BOLD:ACK6257	LBMI#0644	90534	AFBR712-14	KP113028
<i>Psychodopygus matosi</i>	BOLD:ACK6257	LBMI#0645	90535	AFBR713-14	KP113029
<i>Psychodopygus matosi</i>	BOLD:ACK6257	LBMI#0346	90499	AFBR465-14	KP113030
<i>Psychodopygus matosi</i>	BOLD:ACK6257	LBMI#0345	90498	AFBR464-14	KP113031
<i>Psychodopygus matosi</i>	BOLD:ACK6257	LBMI#0318	90455	AFBR439-14	KP113032
<i>Psychodopygus matosi</i>	BOLD:ACK6257	LBMI#0317	90454	AFBR438-14	KP113033
<i>Psychodopygus matosi</i>	BOLD:ACK6257	LBMI#0302	90470	AFBR423-14	KP113034
<i>Psychodopygus matosi</i>	BOLD:ACK6257	LBMI#0301	90472	AFBR422-14	KP113035
<i>Psychodopygus matosi</i>	BOLD:ACK6257	LBMI#0300	90471	AFBR421-14	KP113036
<i>Psychodopygus matosi</i>	BOLD:ACK6257	LBMI#0577	90665	AFBR740-14	KP113037
<i>Psychodopygus matosi</i>	BOLD:ACK6257	LBMI#0581	90669	AFBR664-14	KP113038
<i>Psychodopygus matosi</i>	BOLD:ACK6257	LBMI#0579	90667	AFBR662-14	KP113039
<i>Psychodopygus matosi</i>	BOLD:ACM6656	LBMI#0574	90662	AFBR658-14	KP113009
<i>Sciopemyia microps</i>	BOLD:ACK2973	LBMI#0095	90441	AFBR080-13	KP113040
<i>Sciopemyia sordellii</i>	BOLD:ACM7994	LBMI#0399	90.767	AFBR754-14	KP113043
<i>Sciopemyia</i> sp.	BOLD:ACK6379	LBMI#0255	90414	AFBR378-14	KP113045
<i>Sciopemyia</i> sp.	BOLD:ACK6379	LBMI#0229	90371	AFBR357-14	KP113046
<i>Sciopemyia</i> sp.	BOLD:ACK6778	LBMI#0265	90351	AFBR388-14	KP112545
<i>Sciopemyia</i> sp.	BOLD:ACK6778	LBMI#0202	90370	AFBR337-14	KP113041
<i>Sciopemyia</i> sp.	BOLD:ACK6778	LBMI#0259	90413	AFBR382-14	KP113042
<i>Sciopemyia</i> sp.	BOLD:ACK6778	LBMI#0256	90415	AFBR379-14	KP113044
<i>Trichophoromyia viannamartinsi</i>	BOLD:ACM6252	LBMI#0376	90752	AFBR480-14	KP113047
<i>Trichophoromyia viannamartinsi</i>	BOLD:ACM6252	LBMI#0375	90751	AFBR479-14	KP113048
<i>Trichophoromyia viannamartinsi</i>	BOLD:ACM6252	LBMI#0377	90753	AFBR481-14	KP113049
<i>Trichophoromyia viannamartinsi</i>	BOLD:ACM6252	LBMI#0379	90755	AFBR482-14	KP113050
<i>Trichophoromyia viannamartinsi</i>	BOLD:ACM6252	LBMI#0380	90756	AFBR483-14	KP113051
<i>Trichophoromyia viannamartinsi</i>	BOLD:ACM6252	LBMI#0381	90757	AFBR484-14	KP113052

<i>Trichophoromyia viannamartinsi</i>	BOLD:ACM6252	LBMI#0358	90745	AFBR472-14	KP113053
<i>Trichophoromyia viannamartinsi</i>	BOLD:ACM6252	LBMI#0360	90747	AFBR473-14	KP113054
<i>Trichophoromyia viannamartinsi</i>	BOLD:ACM6252	LBMI#0357	90744	AFBR471-14	KP113055
<i>Trichophoromyia viannamartinsi</i>	BOLD:ACM6252	LBMI#0354	90741	AFBR469-14	KP113056
<i>Trichophoromyia viannamartinsi</i>	BOLD:ACM6252	LBMI#0382	90758	AFBR485-14	KP113057
<i>Trichophoromyia viannamartinsi</i>	BOLD:ACM6252	LBMI#0383	90759	AFBR486-14	KP113058
<i>Trichophoromyia viannamartinsi</i>	BOLD:ACM6252	LBMI#0384	90760	AFBR487-14	KP113059
<i>Trichophoromyia viannamartinsi</i>	BOLD:ACM6252	LBMI#0363	90750	AFBR476-14	KP113060
<i>Trichophoromyia viannamartinsi</i>	BOLD:ACM6252	LBMI#0362	90749	AFBR475-14	KP113061
<i>Trichophoromyia viannamartinsi</i>	BOLD:ACM6252	LBMI#0361	90748	AFBR474-14	KP113062

**Table 5.3 - Supporting Information S7.** Matrix of geographical distance between the sampling localities estimated using the Geographic Distance Matrix Generator version 1.2.3. All the distances were estimated in kilometers (BA – state of Bahia; ES – state of Espírito Santo; MG – state of Minas Gerais; MT – Mato Grosso; RJ – state of Rio de Janeiro).

	AFC	ALC	ARN	BAG	BJI	CAC	DOM	IBI	ITA	IUN	JON	LAS	MAN	MAR	PAN	SAL	SMJ	SAT	WEG
Afonso Cláudio, ES (AFC)	0.00																		
Alfredo Chaves, ES (ALC)	31.89	0.00																	
Alto Rio Novo, ES (ARN)	137.89	168.61	0.00																
Baixo Guandu, ES (BAG)	98.68	127.30	45.89	0.00															
Rom Jesus do Itabapoana, RJ (BJI)	122.02	107.3	245.54	214.83	0.00														
Cáceres, MT (CAC)	1789.24	1803.93	1771.09	1795.37	1733.95	0.00													
Domingos Martins, ES (DOM)	36.55	23.59	160.80	117.07	130.53	1822.84	0.00												
Ibitirama, ES (IBI)	75.17	77.95	182.26	155.33	65.06	1727.48	99.70	0.00											
Itaguaçu, ES (ITA)	53.76	83.88	84.76	45.35	170.18	1787.35	77.24	112.82	0.00										
Iúna, ES (IUN)	72.81	81.44	170.21	145.40	78.95	1722.51	101.48	14.33	104.40	0.00									
João Nery, ES (JON)	72.46	89.98	106.12	60.58	193.64	1836.37	71.42	146.16	49.02	141.20	0.00								
Lagoa Santa, MG (LAS)	305.12	321.26	310.90	322.55	270.68	1484.17	339.17	247.28	306.35	240.43	355.08	0.00							
Mantenópolis, ES (MAN)	151.69	182.68	14.96	60.84	256.88	1763.83	175.42	192.97	98.98	180.48	120.97	309.01	0.00						
Mariândia, ES (MAR)	114.01	138.44	64.44	33.09	235.00	1827.46	123.02	179.32	66.54	170.87	53.92	355.65	77.62	0.00					
Pancas, ES (PAN)	113.72	141.97	38.72	15.55	230.38	1801.00	130.41	170.78	60.72	160.69	69.08	331.68	52.96	27.26	0.00				
Santa Leopoldina, ES (SAL)	55.66	60.59	139.36	93.55	167.79	1841.71	38.33	129.84	65.15	128.42	37.39	357.74	154.32	91.28	104.34	0.00			
Santa Maria de Jetibá, ES (SMJ)	35.34	58.61	113.83	70.21	157.32	1808.08	47.02	108.38	31.80	103.72	37.78	324.68	128.50	80.14	84.00	35.58	0.00		
Santa Teresa, ES (SAT)	52.78	72.01	110.22	64.62	174.23	1822.75	55.68	126.57	37.87	121.92	19.71	340.10	125.16	67.36	29.50	18.23	0.00		
Wenceslau Guimarães, BA (WEG)	751.61	780.15	616.17	653.00	860.73	1937.74	766.83	796.23	697.93	783.13	697.34	806.96	604.10	644.03	638.24	734.55	721.78	711.18	0.00



## 6. CAPÍTULO 4

### **Sistemática molecular de flebotomíneos neotropicais: o complexo *Lutzomyia longipalpis***

Nesse capítulo, um fragmento do gene *period* foi sequenciado e analisado para diferentes populações brasileiras de *Lutzomyia longipalpis* com o objetivo de caracterizar as diferentes espécies dentro do complexo e aumentar o conhecimento sobre a distribuição geográfica dessas espécies.

#### **6.1 Análise da diferenciação molecular de oito populações de *Lutzomyia longipalpis* utilizando um fragmento de 266 pb do gene *period***

##### **6.1.1 Metodologia**

A análise de diferenciação molecular foi realizada pela comparação das oito populações obtidas nesse estudo, que estão sendo analisadas pela primeira vez, em conjunto com cinco outras populações com som de cópula do tipo *burst* anteriormente obtidos de diferentes localidades brasileiras (Bauzer *et al.* 2002a,b; Araki *et al.* 2009). Foi obtida uma permissão do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis para coletas de flebotomíneos no Brasil (SISBIO#26066-1). Os flebotomíneos foram coletados no ambiente peridomiciliar usando armadilhas luminosas automáticas do tipo CDC e por busca ativa utilizando capturador manual de sucção do tipo Castro. A população de *Lu. longipalpis* obtida anteriormente de Salvaterra (Ilha de Marajó), estado do Pará, não foi incluída nas análises devido ao reduzido número de indivíduos analisados (Souza *et al.* 2004). Também foram retiradas das análises três sequências da amostra original com som de cópula do tipo *burst* de Estrela e uma sequência da amostra original com som de cópula do tipo *burst* de Sobral. Isso porque elas foram consideradas como potencialmente resultantes de introgressão a partir de espécies com som de cópula do tipo pulsado em uma análise filogenética preliminar (evolução mínima) utilizando todas as sequências já publicadas do gene *period* para populações de *Lu. longipalpis* (dados não mostrados).

As novas amostras foram coletadas de localidades pertencentes aos quatro maiores biomas brasileiros: Mata Atlântica, Floresta Amazônica, Caatinga e Cerrado. A associação entre a população e seu bioma foi feita de acordo com informações providenciadas pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE 2014). As populações representando o bioma Mata Atlântica foram coletadas nos estados de Minas Gerais (Ipanema; 19° 48' 03" S, 41° 42' 46" O), Espírito Santo (Afonso Cláudio; 20° 04' 28" S, 41° 07' 26" O) e Pernambuco (Itamaracá; 7° 44' 53" S, 34° 49' 52" O). A população representando o bioma Cerrado foi coletada no estado de Tocantins (Palmas; 10° 12' 47" S, 48° 21' 37" O). O bioma da Floresta Amazônica foi representado pela população por duas populações coletadas no estado do Pará, Barcarena (1° 30' 21" S, 48° 37' 32" O) e Camará (0° 54' 12" S, 48° 35' 24" O), a primeira situada no continente e a última na Ilha de Marajó. Ainda, de acordo com o IBGE, duas populações foram coletadas em áreas de transição de biomas (ecótonos); a população de Nova Porteirinha (15° 48' 09" S, 43° 18' 02" O), estado de Minas Gerais, situada em um ecótono Cerrado/Caatinga e a população de Passira (7° 59' 42" S, 35° 34' 49" O), estado de Pernambuco, situada em um ecótono Caatinga/Mata Atlântica. Para as populações com som de cópula do tipo *burst* analisadas anteriormente (Bauzer *et al.* 2002a,b; Araki *et al.* 2009), as localizações foram definidas como a seguir: Sobral (estado do Ceará) e Estrela (estado de Alagoas) pertencendo ao bioma Caatinga; Pancas (estado do Espírito Santo) pertencendo ao bioma Mata Atlântica; Jaíba (Estado de Minas Gerais) e Natal (estado do Rio Grande do Norte) como parte dos ecótonos Cerrado/Caatinga e Caatinga/Mata Atlântica, respectivamente. Essa informação é resumida na Figura 6.1.1 que mostra as localidades de todas as populações com som de cópula do tipo *burst* consideradas neste estudo.

As amostras coletadas na localidade de Palmas foram inspecionadas inicialmente e revelaram alta frequência de machos apresentando um par de pintas abdominais (localizado no quarto tergito) ou dois pares de pintas abdominais (no terceiro e quarto tergitos), com um pequeno número de machos com um fenótipo intermediário (um par de pequenas pintas abdominais no terceiro tergito além do par de pintas no quarto tergito). Esse padrão de distribuição do fenótipo das pintas também já foi encontrado para as localidades de Sobral, de Jaíba e de Estrela de Alagoas indicando a coexistência de duas diferentes espécies cujos machos podem ser diferenciados pelo número de pintas abdominais (uma pinta – 1S ou duas pintas – 2S) (Bauzer *et al.* 2007, Araki *et al.* 2009). Nessas três localidades, o fenótipo 2S

foi associado com o som de cópula do tipo *burst*. Portanto, os machos da amostra de *Lu. longipalpis sensu lato* da população de Palmas foram separados em 1S e 2S.

Os sons foram gravados como reportado por Souza *et al.* (2004) usando casais virgens com idade entre dois e nove dias dentro de uma caixa acrílica do INSECTAVOX (Gorczyca & Hall 1987) por cinco minutos a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Se o casal falhou em copular, foi então substituído por outro casal. Para as gravações, uma vídeo-câmera Sony Hi8CCD-TRV65 e um gravador de DVD Panasonic DMR-ES10 foram usados. Um conversor CED1401 A/D foi usado para digitalizar os sinais acústicos os quais foram posteriormente analisados usando o programa Spike2 (versão 4.08).

A análise molecular foi feita usando um fragmento do gene *period* desenhado para amplificar uma região variável (íntron) flanqueada por regiões conservadas (éxons) que contém os sítios dos primers. Esse tipo de marcador é reconhecido por ser muito útil já que pode ser altamente variável e informativo, ao mesmo tempo em que pode apresentar a conservação necessária na região dos primers para estudos ao longo da extensão filogenética de interesse.

O DNA genômico foi extraído de machos coletados no campo ou machos da primeira geração de fêmeas oriundas do campo seguindo a metodologia descrita por Jowett (1998). A PCR consistiu de uma denaturação inicial a  $95^{\circ}\text{C}$  por 3 minutos seguido de 35 ciclos de  $95^{\circ}\text{C}$  por 30 s,  $55^{\circ}\text{C}$  por 30 s e  $72^{\circ}\text{C}$  por 30 s e uma extensão final a  $72^{\circ}\text{C}$  por 7 minutos, levando a amplificação de um fragmento de 266 pares de bases (pb) contendo um íntron de 54 pb. Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando o Wizard PCR Prep Kit (Promega) e clonados usando o CloneJET PCR Cloning Kit (Fermentas) ou o PGEM T Easy Vector System I (Promega). O DNA plasmidial foi recuperado usando o método de lise alcalina (Sambrook & Russel 2001) em microplacas de 96 poços. Os fragmentos clonados foram seqüenciados utilizando ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction V3.0 or V3.1 kits (Applied Biosystems) em um sequenciador ABI 3730 DNA no Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil.

Entre cinco e oito seqüências foram obtidas por indivíduo e as seqüências foram alinhadas gerando um consenso ou, para indivíduos com mais de seis seqüências disponíveis, duas seqüências consenso representando ambos alelos (denominados haplótipos A e B). As seqüências foram submetidas ao GenBank (números de acesso: KC164381 - KC164504). As seqüências de DNA foram editadas e alinhadas usando o programa BioEdit versão 7.0.9.0 (Hall 1999). Análises

do polimorfismo e teste de neutralidade foram realizadas utilizando o programa DnaSP 5.1 (Librado & Rozas 2009). As novas sequências do gene *period* foram comparadas com aquelas previamente obtidas para amostras de *Lu. longipalpis* que compartilharam o som de cópula do tipo *burst* (Bauzer *et al.* 2002a,b; Araki *et al.* 2009). A diferenciação entre as populações foi medida estimando o índice de fixação  $F_{ST}$  usando os programas DnaSP 5.1 e Proseq versão 2.91 (Filatov 2002) e a significância foi determinada por teste de permutação (10.000 replicatas) usando o último programa. O programa DnaSP 5.1 também foi usado para realizar os testes de neutralidade  $D$  de Tajima (Tajima 1989),  $D^*$  e  $F^*$  de Fu e Li (Fu & Li 1993) e  $R_2$  de Ramos-Onsins e Rosas (Ramos-Onsins & Rosas 2002). Isolamento por distância foi avaliado testando a associação entre os valores de  $F_{ST}$  com a distância geográfica em quilômetros usando o teste de Mantel implementado no programa Arlequin v3.11 (Excoffier *et al.* 2005). A significância do teste foi obtida por 1.000 permutações.

As relações genéticas espaciais entre as populações de *Lu. longipalpis s. l.* com som de cópula do tipo *burst* assim como a identificação de possíveis barreiras genéticas entre elas foram examinadas utilizando o programa SAMOVA versão 12.02 (Dupanloup *et al.* 2002). Os grupos foram definidos com base na homogeneidade geográfica e máxima diferenciação de uma para a outra. Os valores dos coeficientes da variação entre populações ( $F_{CT}$ ) foram calculados aumentando o número de grupos  $K$  (de 2 a 11) a partir de cada uma das 500 condições randômicas iniciais. Avaliamos os valores de  $F_{CT}$  para definir o número ótimo de grupos (Dupanloup *et al.* 2002). A análise de variância molecular (AMOVA) foi conduzida utilizando o programa Arlequin v3.11. Essa análise foi realizada utilizando o modelo hierárquico providenciado pela SAMOVA.

A rede de haplótipos foi estimada e o número máximo de conexões entre pares de sequências foi calculado usando 95% de limite estatístico baseado no método implementado no programa TCS v1.21 (Clement *et al.* 2000). Uma vez que recombinação é um dos fatores que pode causar ambigüidades, utilizamos o maior fragmento não recombinante inferido pelo programa IMgc para evitar alteração na rede de haplótipos (Woerner *et al.* 2007). A rede de haplótipos foi convertida em uma hierarquia de clados usando a regra de aninhamento definida por Templeton *et al.* (1987) e refinada por Templeton & Sing (1993). A hipótese nula de não associação geográfica de haplótipos e clados foi testada usando o programa GeoDis 2.6 (Posada *et al.* 2000). Para os clados com variação genética e/ou geográfica, realizamos um teste de permutação para determinar quando existiu associação

entre local de amostragem e clados. Um teste mais objetivo que usa informação sobre a distância geográfica também foi aplicado. Os dados foram resumidos como duas distâncias estatísticas, a distância do clado ( $D_c$ ) para a extensão geográfica de um clado, e a distância do clado aninhado ( $D_n$ ) para a distância de um clado para o centro geográfico do clado aninhado. A chave de inferência do GeoDis foi aplicada sempre quando a hipótese nula foi rejeitada com objetivo de identificar o mais apropriado evento demográfico ou histórico relacionado ao padrão de estrutura genética observado. O programa DnaSP 5.1 foi usado para testar a hipótese de que polimorfismos do fragmento não recombinante do gene *period* apresentasse qualquer significativo desvio de evolução neutra empregando o teste de Fu's  $F_s$  (Fu 1997). Os intervalos de confiança foram testados por 10.000 simulações coalescentes. Análises das expansões demográficas e espaciais foram conduzidas para determinar a distribuição e os valores esperados (em equilíbrio para ausência de recombinação). O programa Arlequin foi usado para esse propósito. Diferenças estatisticamente significativas entre as distribuições observada e modelo foram avaliadas por meio do desvio da soma dos quadrados (SSD) e de estatística *raggedness* ( $r$ ) (Harpending 1994, Excoffier 2004), para rejeitar a hipótese de expansão demográfica.

### 6.1.2 Resultados

Inicialmente, uma análise dos sinais acústicos produzidos durante a cópula pelos machos das populações de Afonso Cláudio, Barcarena, Camará, Ipanema, Itamaracá, Nova Porteirinha, Palmas (1S e 2S) e Passira foi realizada. Os resultados mostraram que em todas as amostras, exceto Palmas 1S, um som de cópula do tipo *burst* foi produzido e apresentou alta similaridade com os sinais acústicos gravados para outras populações do complexo *Lu. longipalpis* anteriormente incluídas na espécie do complexo que apresenta som de cópula do tipo *burst* (Souza *et al.* 2004, Araki *et al.* 2009). O som produzido pelos machos de Palmas 1S foi caracterizado como do tipo pulsado e por isso essa amostra não foi considerada para as análises moleculares.

Um total de 124 sequências do gene *period* de 85 indivíduos foram obtidas para as oito novas populações com som de cópula do tipo *burst* descritas neste estudo. A Tabela 6.1.1 apresenta os sumários dos polimorfismos com o número de sítios polimórficos ( $S$ ) e as medidas de diversidade nucleotídica ( $\pi$  e  $\theta$ ) calculadas para cada população. As amostras de Ipanema e Itamaracá foram apontadas como

a menos e a mais polimórfica, respectivamente. A Tabela 6.1.1 apresenta também os resultados de quatro testes de neutralidade que foram aplicados para as referidas populações baseado no fragmento do gene *period* de 266 pb. Nenhum desvio evidente de neutralidade foi detectado para o fragmento analisado. A maioria das substituições de base nucleotídica foi sinônima ou ocorreu na região intrônica. Duas substituições não sinônimas foram observadas em três diferentes sequências. Uma destas substituições foi observada no primeiro éxon de uma sequência de Nova Porteirinha e a outra ocorreu no segundo éxon de duas sequências de Itamaracá. Essas mutações de substituição não foram observadas em nenhuma das amostras de *Lu. longipalpis* analisadas anteriormente (Bauzer *et al.* 2002a,b; Araki *et al.* 2009). A análise da diferenciação molecular revelou ausência de diferenças fixas entre as populações estudadas. Os valores de  $F_{ST}$  (Hudson *et al.* 1992) computados entre todas as populações analisadas revelaram valores moderados mas significantes de distância genética entre as amostras da região Amazônica e um número de amostras representando os outros três biomas considerados (Tabela 6.1.2). Esse resultado indicou a possibilidade de restrição de fluxo gênico entre as populações da região Amazônica e as outras. Além disso, a distância genética entre as duas populações da região Amazônica não foram significativas apesar de ter sido um dos maiores valores de  $F_{ST}$  computados. Como esperado, os valores computados foram muito menores do que os observados para as comparações anteriormente reportadas entre as populações com som de cópula do tipo *burst* e as com som de cópula do tipo pulsado (Araki *et al.* 2009).

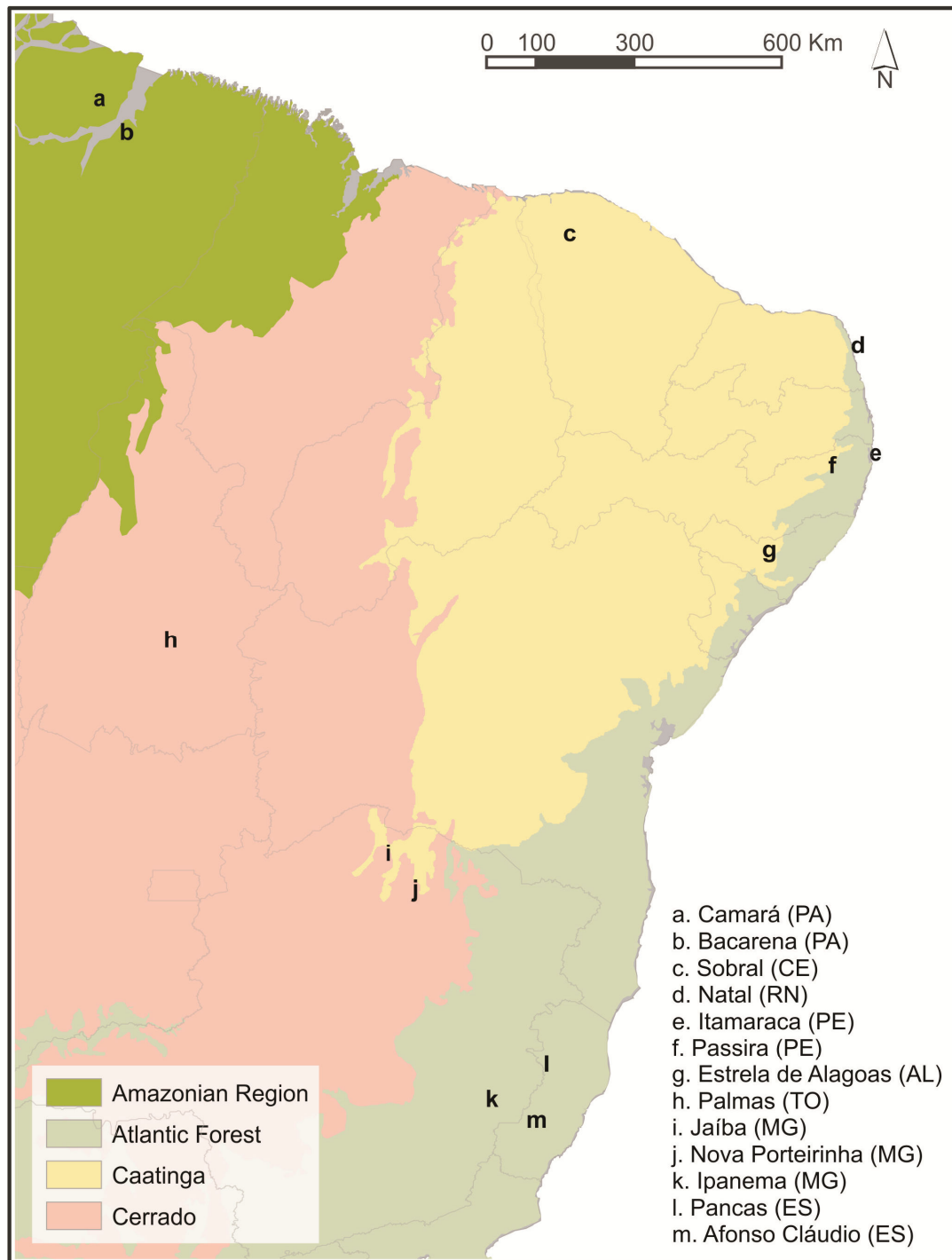
SAMOVA revelou que o maior  $F_{CT}$  resultou de um  $k = 2$  grupos (1 – Camará e 2 - Afonso Cláudio, Barcarena, Estrela, Ipanema, Itamaracá, Jaíba, Natal, Nova Porteirinha, Palmas, Pancas, Passira e Sobral) e foi seguido por um valor muito próximo de  $F_{CT}$  resultante de um  $k = 3$  grupos (1 – Camará; 2 – Barcarena; e 3 - Afonso Cláudio, Estrela, Ipanema, Itamaracá, Jaíba, Natal, Nova Porteirinha, Palmas, Pancas, Passira e Sobral), em que as populações da região Amazônica foram subdivididas em norte e sul do delta do rio Amazonas. Os valores de  $F_{CT}$  computados para  $k \geq 4$  foram muito menores que aqueles computados para um pequeno número de grupos. Uma vez que a análise de SAMOVA não indica se os valores de  $F_{CT}$  computados são significativamente diferentes, consideramos o  $k = 3$  grupos como os grupos populacionais definidos. Esse padrão também separou Barcarena de todas as populações do sul, em concordância com a diferenciação genética pelos valores de  $F_{ST}$  os quais mostraram diferenças moderadas e

significantes entre as amostras da região Amazônica e algumas populações pertencentes a outros biomas avaliados. AMOVA então foi empregado utilizando os grupos definidos pela análise de SAMOVA. Os resultados indicaram que a maior parte da variação total (85.87%) é distribuída dentro das populações (Tabela 6.1.3). Quando a distância genética definida como  $F_{ST}$  foi comparada com distância geográfica entre as amostras, uma pequena correlação positiva, mas significativa, foi observada entre amostras da Mata Atlântica, do Cerrado e da Caatinga ( $r^2 = 0.338$ ;  $p < 0.05$ ). Uma alta e significativa correlação positiva foi obtida quando amostras da região Amazônica foram também consideradas na análise ( $r^2 = 0.527$ ;  $p < 0.005$ ).

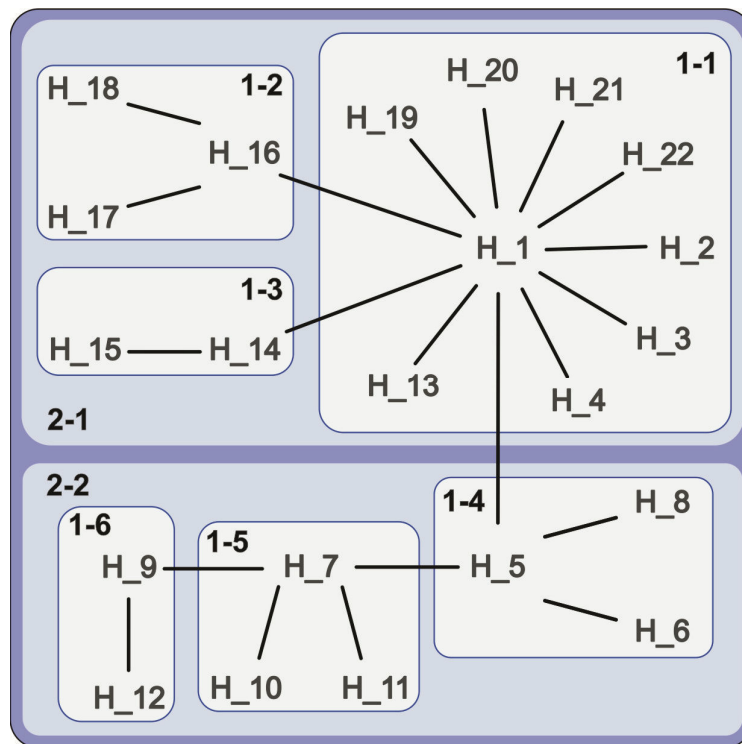
Um fragmento não-recombinante de 142 pb foi usado para a construção da rede de haplótipos o qual incluía o primeiro éxon mais o íntron do fragmento de 266 pb amplificado originalmente. Sequências idênticas foram agrupadas em um total de 22 haplótipos. A Tabela 6.1.4 mostra a frequência de cada haplótipo distribuído ao longo de todas as regiões consideradas neste estudo. O haplótipo H\_01 ocorreu em todos os biomas analisados e foi inferido como a sequência ancestral baseado em uma probabilidade de grupo externo de 0.26, de acordo com sua localização relativa às outras sequências e suas frequências. A fim de computar o número de haplótipos restritos a cada região, as regiões de ecótono compreendendo Caatinga mais qualquer outra região foram considerados como sendo meramente Caatinga. Nesse sentido, o número de haplótipos restritos aos biomas da região Amazônica, da Caatinga e da Mata Atlântica foram um, nove e cinco, respectivamente. O bioma do Cerrado foi o único que não apresentou haplótipos restritos. A Tabela 6.1.4 também mostra os resultados do teste  $F_s$  de  $F_u$  obtido para os três grupos de populações (Barcarena, Camará e populações não amazônicas) os quais foram definidos com base na análise de SAMOVA combinada com as comparações par-a-par de  $F_{ST}$ . O grupo de populações não amazônicas mostrou um valor negativo e significativo de  $F_s$  de  $F_u$ , o que pode indicar um número excessivo de alelos como resultado de expansão populacional ou efeito carona. A análise de expansão populacional antiga baseada na diversidade das sequências de DNA revelou uma distribuição do número de diferenças entre pares de haplótipos das populações não amazônicas com um perfil unimodal esperado que não diferiu significativamente do modelo de expansão rápida, com baixos valores de  $r$  (0.0846;  $p = 0.778$ ) e SSD (0.0003;  $p = 0.809$ ).

A rede de haplótipos, obtida usando o programa TCS (Figura 6.1.2), indica a presença dois clados aninhados, cada um composto de três subclados. Os clados 1-1 e 1-4 foram os únicos que apresentaram haplótipos de todos os biomas analisados. Finalmente, os clados 1-3 e 1-6 não apresentaram haplótipos da região Amazônica e nem da Mata Atlântica. A análise aninhada de contingência determinou uma associação não randômica significativa entre os clados 1-4 e 2-2 e suas respectivas localizações geográficas (Tabela 6.1.5). O mesmo resultado foi obtido para a análise de todos os clados. A chave de inferência foi aplicada somente para os clados aninhados que apresentaram valores significativos para  $D_n$ ,  $D_n$  ou I-T. Foi inferido que restrição de fluxo gênico com isolamento por distância foi o mais plausível processo que modelou a distribuição atual dos haplótipos dentro dos clados com um passo, clados 1-1, 1-4 e 1-5, e aqueles com dois passos, clado 2-2 (Tabela 6.1.6). Para análise global dos clados, os valores de  $D_n$  foram significativamente invertidos dos valores de  $D_c$  na comparação entre os clados 2-1 e 2-2. No entanto, o único clado que mostrou significativamente alto valor de  $D_n$  (clado 2-2) é separado do centro geográfico do clado 2-1 por áreas geográficas intermediárias que não foram amostradas. Não é conhecido, até o momento, se existem populações com som de cópula do tipo *burst* ocorrendo nessa área. Se este é o caso, colonização a longa distância e/ou fragmentação no passado poderiam explicar a distribuição atual dos haplótipos. Se esta espécie está presente na área acima mencionada, a conclusão é que a amostragem foi inadequada para discriminar entre expansão contínua, colonização a longa distância e fragmentação no passado.





**Figura 6.1.1.** Distribuição das populações de *Lu. longipalpis* que produzem som de cópula do tipo *burst* e biomas associados. PA, estado do Pará; TO, estado de Tocantins; CE, estado do Ceará; RN, estado do Rio Grande do Norte; PE, estado de Pernambuco; AL, estado de Alagoas; MG, estado de Minas Gerais; ES, estado do Espírito Santo.



**Figura 6.1.2.** Rede de haplótipos com base em parcimônia mostrando 22 haplótipos de um fragmento não-recombinante do gene *period* de 142 pb.

**Tabela 6.1.1.** Sumário das análises realizadas para as oito populações de *Lu. longipalpis* estudadas

População	N	n	S	$\pi$	$\theta$	$D_T$	$D^*$	$F^*$	$R_2$
<b>Afc</b>	12	18	17	0.0163 (0.000005)	0.0186 (0.000059)	-0.474	-0.814	-0.830	0.122
<b>Ipa</b>	12	20	13	0.0094 (0.000004)	0.0138 (0.000034)	-1.163	-1.208	-1.386	0.098
<b>Npo</b>	15	25	21	0.0175 (0.000005)	0.0209 (0.000063)	-0.593	-0.337	-0.487	0.101
<b>Pal</b>	11	17	17	0.0155 (0.000002)	0.0189 (0.000062)	-0.695	-0.477	-0.622	0.102
<b>Ita</b>	8	10	19	0.0217 (0.000008)	0.0252 (0.000131)	-0.655	-0.735	-0.806	0.116
<b>Pas</b>	7	9	14	0.0188 (0.000010)	0.0194 (0.000086)	-0.141	-0.317	-0.307	0.143
<b>Bar</b>	10	13	11	0.0133 (0.000004)	0.0133 (0.000039)	-0.095	-0.060	-0.080	0.149
<b>Cam</b>	10	12	10	0.0111 (0.000010)	0.0124 (0.000036)	-0.443	-0.154	-0.260	0.142

N, número de indivíduos; n, número de sequências obtidas; S, número de sítios polimórficos;  $\pi$ , diversidade nucleotídica baseada no número médio de diferenças par-a-par;  $\theta$ , diversidade nucleotídica baseada no número de sítios segregantes. Variâncias dos valores de  $\pi$  e  $\theta$  mostradas em parênteses.  $D_T$ , D de Tajima;  $D^*$  e  $F^*$  de Fu e Li;  $R_2$ ,  $R_2$  de Ramos-Onsins e Rozas. Afc: Afonso Cláudio; Ipa: Ipanema; Npo: Nova Porteirinha; Pal: Palmas; Ita: Itamaracá; Pas: Passira; Bar: Barcarena; Cam: Camará.

**Tabela 6.1.2.** Subdivisão estatística populacional de  $F_{ST}$  para 13 populações brasileiras de *Lutzomyia longipalpis* s. l. que produzem som de cópula do tipo *burst*.

Bioma	Mata Atlântica		Mata Atlântica/ Caatinga		Caatinga		Caatinga/Cerrado		Cerrado		Amazônia	
	Ipá	Pan	Ita	Pas	Nat	Est	Sob	Jai	Npo	Pal	Bar	Cam
<b>Afc</b>	0.039 <sup>ns</sup>	0.006 <sup>ns</sup>	0.064 <sup>ns</sup>	0.051 <sup>ns</sup>	0.080*	0.052 <sup>ns</sup>	0.016 <sup>ns</sup>	0.038 <sup>ns</sup>	0.041 <sup>ns</sup>	0.104*	0.161*	0.166*
<b>Ipá</b>		0.014 <sup>ns</sup>	0.067 <sup>ns</sup>	0.075 <sup>ns</sup>	0.066 <sup>ns</sup>	0.035 <sup>ns</sup>	0.039 <sup>ns</sup>	0.043 <sup>ns</sup>	0.046 <sup>ns</sup>	0.078 <sup>ns</sup>	0.230*	0.235*
<b>Pan</b>			0.047 <sup>ns</sup>	0.057 <sup>ns</sup>	0.041*	0.034*	0.022 <sup>ns</sup>	0.029 <sup>ns</sup>	0.029 <sup>ns</sup>	0.062*	0.172**	0.173*
<b>Ita</b>				0.000 <sup>ns</sup>	0.035 <sup>ns</sup>	0.020 <sup>ns</sup>	0.003 <sup>ns</sup>	0.001 <sup>ns</sup>	0.000 <sup>ns</sup>	0.027 <sup>ns</sup>	0.130 <sup>ns</sup>	0.135 <sup>ns</sup>
<b>Pas</b>					0.004 <sup>ns</sup>	0.018 <sup>ns</sup>	0.000 <sup>ns</sup>	0.000 <sup>ns</sup>	0.000 <sup>ns</sup>	0.021 <sup>ns</sup>	0.128 <sup>ns</sup>	0.139 <sup>ns</sup>
<b>Nat</b>						0.000 <sup>ns</sup>	0.000 <sup>ns</sup>	0.001 <sup>ns</sup>	0.000 <sup>ns</sup>	0.011 <sup>ns</sup>	0.120*	0.202*
<b>Est</b>							0.004 <sup>ns</sup>	0.000 <sup>ns</sup>	0.003 <sup>ns</sup>	0.011 <sup>ns</sup>	0.123*	0.199*
<b>Sob</b>								0.000 <sup>ns</sup>	0.000 <sup>ns</sup>	0.044 <sup>ns</sup>	0.133*	0.184*
<b>Jai</b>									0.000 <sup>ns</sup>	0.006 <sup>ns</sup>	0.092 <sup>ns</sup>	0.169 <sup>ns</sup>
<b>Npo</b>										0.024 <sup>ns</sup>	0.110*	0.171*
<b>Pal</b>											0.080 <sup>ns</sup>	0.168 <sup>ns</sup>
<b>Bar</b>												0.186 <sup>ns</sup>

As significâncias dos valores de  $F_{ST}$  foram avaliadas por 1000 permutações randômicas (\* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , ns (não-significante) =  $p > 0.05$ ). Afc = Afonso Cláudio; Ipá = Ipanema; Pan = Pancas; Npo = Nova Porteirinha; Jai = Jaíba; Pal = Palmas; Est = Estrela; Ita = Itamaracá; Pas = Passira; Nat = Nataí; Sob = Sobral; Bar = Barcarena; Cam = Camará.

**Tabela 6.1.3.** Resultados AMOVA para populações brasileiras de *Lutzomyia longipalpis* s. l. que produzem som de cópula do tipo *burst*.

<b>Fonte de variação</b>	
	<b>Porcentagem de variação</b>
Entre grupos	11.79
Entre populações dentro dos grupos	2.34
Dentro das populações	85.87
<b>Índices de Fixação</b>	
$F_{SC}$ (haplótipos/populações dentro dos grupos)	0.02651 <sup>**</sup>
$F_{ST}$ (haplótipos/populações/grupos)	0.14125 <sup>***</sup>
$F_{CT}$ (populações/grupos)	0.11787 <sup>*</sup>

**Tabela 6.1.4.** Frequência de haplótipos do fragmento do gene *period* e estatística Fs de Fu para treze populações brasileiras de *Lutzomyia longipalpis* s. l. com som de cópula do tipo *burst*.

Haplótipo	Norte			Central			Nordeste			Sudeste					
	Amazônia	Bar	Cam	Cerrado	Caatinga	Nat	Mata Atlântica	Pas	Ita	Caatinga	Jai	Npo	Ipá	Pan	Afc
H_01	9		3	7	14	11		3	3	7		14	14	14	6
H_05				2	6	1		2	2	1			2	2	2
H_16				1	1	2				3		3	1	1	1
H_20				1					1			1	1	1	1
H_07					1			1	2	1		2	2	1	2
H_14				1				1							
H_06	1		1	1											
H_08	3		8												
H_02					1	2									
H_03												1			
H_04												1			
H_09										1		1			
H_12					1			1							
H_13								1							
H_15					2	1									
H_18					1	1									
H_19						1									
H_22									1						
H_10														1	1
H_11														1	3
H_17														1	1
H_21														2	2
n	13	12	12	13	25	20	18	9	9	14	23	19	24	17	
Fs	0.774	0.806							-16.03***						

n, número de haplótipos para cada população. Valores de Fs de Fu marcados com asterisco indicam desvio significativo ( $p < 0,001$ ) da neutralidade como apontado por 10.000 simulações coalescentes. Populações foram abreviadas como a seguir: Bar = Barcarena; Cam = Camará; Pal = Palmas; Est = Estrela; Sob = Sobral; Nat = Natal; Pas = Passira; Ita = Itamaracá; Jai = Jaíba; Npo = Nova Porteirinha; Ipá = Ipanema; Pan = Pancas; Afc = Afonso Cláudio.

**Table 6.1.5.** Análise aninhada de contingência de associações geográficas para um fragmento não-recombinante do gene *period* de populações brasileiras de *Lutzomyia longipalpis* s. l. que produzem som de cópula do tipo *burst*. A designação dos clados refere-se a Figura 6.1.2.

<b>Clado</b>	<b>Qui-Quadrado</b>	<b>Probabilidade</b>
<b>1-1</b>	111.06	0.20
<b>1-2</b>	13.85	0.56
<b>1-3</b>	4.00	1.00
<b>1-4</b>	38.98	< 0.05
<b>1-5</b>	12.09	0.68
<b>1-6</b>	4.00	1.00
<b>2-1</b>	21.59	0.60
<b>2-2</b>	36.70	< 0.05
<b>Global</b>	26.83	< 0.00

**Table 4.1.6.** Inferências filogeográficas baseadas na análise aninhada dos haplótipos de populações brasileiras de *Lu. longipalpis* s. l. com som de cópula do tipo *burst*. A designação dos clados refere-se à Figura 6.1.2.

<b>Clado</b>	<b>Cadeia de Inferência</b>	<b>Inferência</b>
<b>1-1</b>	1,2,3,4,NO	Fluxo gênico restrito com isolamento por distância
<b>1-4</b>	1,2,3,4,NO	Fluxo gênico restrito com isolamento por distância
<b>1-5</b>	1,2,3,4,NO	Fluxo gênico restrito com isolamento por distância
<b>2-2</b>	1,2,3,4,NO	Fluxo gênico restrito com isolamento por distância
<b>Global</b>	If: 1,2,11,12,13,14,NO	Colonização a longa distância e/ou fragmentação no passado.
<b>Global</b>	If:1,2,11,12,13,14,YES	Desenho amostral inadequado para discriminar entre expansão contínua, colonização a longa distância e fragmentação no passado.



## **6.2. Caracterização molecular de onze populações brasileiras do complexo *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) utilizando um fragmento do gene *period* de 446 pb.**

### **6.2.1 Metodologia**

#### **6.2.1.1 Amostragem de flebotomíneos**

Analizamos onze novas populações brasileiras de *Lutzomyia longipalpis*: 1) população com som de cópula do tipo *burst* (Cametá, estado do Pará); 2) populações com som de cópula do tipo pulsado [Lassance, estado de Minas Gerais; Palmas 1 pinta (1S), estado de Tocantins; e Pirenópolis, estado de Goiás]; e 3) populações com sons de cópula não gravados [Araçatuba 2 pintas (2S), estado de São Paulo; Araci, Cavunge e Olindina, estado da Bahia; Cáceres, estado do Mato Grosso; Porto Nacional, estado do Tocantins; e Vila Pavão, estado do Espírito Santo] (Figura 6.2.1). As informações sobre os sons de cópula dos machos das populações estudadas foram fornecidas por F. M. Vigoder (comunicação pessoal).

Os espécimes de flebotomíneos foram coletados sob a permissão permanente dada a A. A. Peixoto (número de registro: 5399387) pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Os flebotomíneos foram capturados no ambiente peridomiciliar incluindo abrigos de animais domésticos usando armadilhas luminosas automáticas do tipo CDC e busca ativa com auxílio de capturador manual de sucção do tipo Castro. Os espécimes coletados foram encaminhados ao Laboratório de Biologia Molecular de Insetos do Instituto Oswaldo Cruz onde foram submetidos ao processo de gravação de som e, posteriormente, identificados de acordo com caracteres morfológicos propostos por Galati (2003a) e classificados filogeneticamente seguindo o proposto por Galati (2003b). Os espécimes não foram depositados em nenhuma coleção de insetos, pois a extração do DNA genômico foi realizada utilizando todo o corpo de cada indivíduo.

#### **6.2.1.2 Extração do DNA genômico, amplificação e sequenciamento do fragmento do gene *period***

O DNA genômico foi extraído de indivíduos machos e seguiu o proposto por Jowett (1998) com poucas modificações. Usamos 50 µL de tampão de extração e incubamos a 37 °C overnight.

Usamos os primers 5llper1 (5'-CAATGGCTTCTACATCACTC-3') e 3llper2 (5'-TCAGATGAACTCTTGCTGTC-3') para amplificar um fragmento de 446 pb do gene *period* ortólogo de *Drosophila* que inclui parte do domínio PAS/CLD, um íntron (54 pb) e o começo do domínio *per<sup>S</sup>* (Mazzoni *et al.* 2002, 2006). Para amplificação foram usados os seguintes passos: 1) denaturação (95 °C por três minutos); 2) seguido por 35 ciclos de denaturação (95 °C por 30 segundos), anelamento (55 °C por 30 segundos) e extensão (72 °C por 45 segundos); 3) e uma extensão final (72 °C por 10 minutos). Os produtos da PCR foram purificados usando o kit Illustra GFX DNA and Gel Band Purification® (GE Healthcare). Os fragmentos purificados foram clonados usando o kit CloneJET PCR Cloning® (Fermentas), transformados utilizando células competentes de *Escherichia coli* e o DNA plasmidial foi extraído utilizando lise alcalina em microplacas de 96 poços (Sambrook and Russel, 2001) e filtrados em placas com filtro de 96 poços. Os fragmentos clonados foram sequenciados na Fundação Oswaldo Cruz (PDTIS/FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brasil com um sequenciador ABI 3730.

### 6.2.1.3 Análises de sequências e filogenéticas

As sequências foram editadas usando o programa BioEdit v 7.0.9.0 (Hall 1999) e alinhadas usando o MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation) (Edgar 2004). Construímos dois blocos de alinhamento de sequências. O primeiro bloco (B1) foi composto por todas as sequências do gene *period* (446 pb) obtidas para as onze novas populações estudadas mais sequências de dois espécimes da população da gruta da Lapinha (população com som de cópula do tipo *pulsado*) e de dois espécimes da população de Ipanema (população com som de cópula do tipo *burst*). O segundo bloco (B2) foi composto por sequências do gene *period* anteriormente publicadas ou em preparação mais as novas sequências das onze novas populações. O B2 teve um comprimento de 266 pb porque as sequências anteriormente publicadas tiveram esse comprimento. As populações analisadas e o tipo de som de cópula apresentado pelos machos de cada uma estão contidos na Tabela 6.2.1. A localização geográfica de cada uma é apresentada na Figura 6.2.1.

Utilizamos o programa DnaSP v. 5.10.01 (Librado and Rozas 2009) e o programa Proseq (Filatov 2002) para averiguar os polimorfismos das sequências e para estimar o fluxo gênico e a diferenciação genética por meio do índice de fixação ( $F_{ST}$ ) entre as onze novas populações e para realizar os testes de neutralidade D de

Tajima (Tajima 1989) e  $F_s$  de Fu (Fu 1997). O programa Proseq 2.91 também foi utilizado para avaliar a significância dos valores de  $F_{ST}$  por meio de 1.000 permutações randômicas. Utilizamos cada matriz de valores par-a-par do índice de  $F_{ST}$  do B1 e B2 para construir uma árvore de agrupamento de vizinhos usando o programa MEGA 6.0 (Tamura *et al.* 2013) para verificar as populações que apresentam maior fluxo gênico entre si. Todas as árvores foram visualizadas no programa Figtree v.1.4.0 (Rambault 2012).

O programa TCS 1.21 (Clement *et al.* 2000) foi usado para construir uma rede de haplótipos usando parcimônia estatística com 95 % de confiança (Templeton *et al.* 1992). Uma vez que recombinação pode interferir nas análises filogenéticas mesmo quando parcimônia estatística é usada, utilizamos o programa IMgc (Woerner *et al.* 2007) para obter o maior bloco não-recombinante de sequências (NRB) para ambos blocos de sequência B1 e B2. Sítios com polimorfismos de inserção ou deleção ou com alinhamento ambíguo foram removidos. Mesmo assim, alguns estado de caráter dos sítios com violação do modelo de sítios infinitos foram mudados para “N” pelo IMgc. Manualmente, nós removemos os sítios que apresentaram mudanças para “N” de cada NRB. Essa remoção foi realizada de maneira a manter o maior número de sequências e de sítios possível. Os blocos não-recombinantes foram nomeados BNR1 para o B1 e NRB2 para o B2. Esses dois blocos não-recombinantes foram usados no TCS 1.21 para inferir as redes de haplótipos.

Utilizamos o programa jModelTest2 (Darriba *et al.* 2012) para conduzir a seleção estatística do modelo de substituição nucleotídica com melhor ajuste para ser usado nas análises filogenéticas. O modelo ótimo de substituição foi determinado pelo método de Akaike (AIC). Uma árvore filogenética usando o B1 foi estimada por máxima verossimilhança utilizando o programa PhyML 3.0 (Guindon *et al.* 2010). A árvore foi visualizada no programa Figtree 1.4.0.

### **6.2.2 Resultados**

Obtivemos um total de 213 sequências do fragmento de 446 pb do gene *period* para 126 indivíduos das onze novas populações brasileiras de *Lu. longipalpis* amostradas (Tabela 6.2.2). As sequências incluíram 342 sítios conservados e 102 sítios polimórficos dos quais 16 foram *singletons* e 76 foram sítios parcimoniosamente informativos (Figura 6.2.2). Entre os sítios polimórficos, três *singletons* e 29 sítios parcimoniosamente informativos ocorreram após o sítio 266. O

número de sítios polimórficos foi 76 na região de éxons, representando 74.5 % do total de sítios polimórficos e 19.4 % do total de sítios dessas regiões. Já na região do íntron, o número de sítios polimórficos foi 26, representando 25.5 % do total de sítios polimórficos e 48.1 % do total de sítios dessa região. As sequências não apresentaram deleções ou inserções e a maioria das mudanças nucleotídicas foram sinônimas, exceto pelas mudanças na 29° posição da sequência ACIper01b que mudou uma Serina (TCC) para Treonina (ACC) e da sequência PIRper04a que mudou uma Serina (TCC) para Prolina (CCC) (Figura 6.2.2).

Analizamos um total de 605 sequências do fragmento de 266 pb do gene *period* (B2) para as populações indicadas na Tabela 6.2.1. As sequências incluíram 182 sítios conservados e 82 sítios polimórficos, dos quais 19 foram *singletons* e 63 foram sítios parcimoniosamente informativos (Figura 6.2.3). O número de sítios polimórficos foi 54 (12 *singletons* e 42 sítios parcimoniosamente informativos) nas regiões de éxons, representando 65.8 % do total de sítios polimórficos e 25.5 % do total de sítios nessa região. Na região do íntron, o número de sítios polimórficos foi 28, representando 34.1 % do total de sítios polimórficos e 51.8% do total de sítios dessa região. Dois sítios apresentaram lacunas no alinhamento, uma no 12° sítio e outra no 41° sítio. Essas lacunas foram as mesmas reportadas anteriormente para as populações de Estrela (1S e 2S) (ver Araki *et al.* 2009 para mais detalhes). Encontramos cinco mudanças não sinônimas as quais são apresentadas a seguir: 1) na 29° posição, mudou uma Serina (TCC) para Treonina (ACC) na sequência de ACIper01b e mudou uma Serina (TCC) para Prolina (CCC) na sequência de PIRper04a; 2) na 129° posição, mudou um Ácido Aspártico (GAT) por uma Glicina (GGT) na sequência de Est1S03B; 3) na 198° posição, mudou uma Leucina (CTA) por uma Valina (GTA) na sequência Est1S04; 4) na 206° posição, mudou um Ácido Aspártico (GAT) por Ácido Glutâmico (GAA) na sequência Est1S14A; e 5) na 217° posição, mudou uma Asparagina (AAT) por uma Treonina (ACT) na sequência Est14A (Figura 6.2.3).

A Tabela 6.2.2 mostra, para cada uma das onze populações, o número de indivíduos ( $n_i$ ), o número de sequências das amostras ( $n_s$ ), o número de haplótipos ( $n_h$ ), número de sítios polimórficos (S), número médio de diferenças par-a-par ( $\pi$ ), e o parâmetro neutro ( $\theta$ ) baseado no número de sítios segregantes. As populações de Palmas 1S e Pirenópolis tiveram os maiores números de sítios polimórficos e a população de Araci teve o menor número. A Tabela 6.2.2 também mostrou os valores dos testes de neutralidade D de Tajima e  $F_s$  de Fu. Todos os valores foram

não-significativos ( $p > 0.10$ ). Os sumários dos polimorfismos para as outras populações foram anteriormente analisados (Araki *et al.* 2009; Bauzer *et al.* em preparação)

A Tabela 6.2.3 mostra os valores de  $F_{ST}$  calculados para as onze populações brasileiras de *Lu. longipalpis* utilizando o fragmento de 446 pb do gene *period*. As comparações par-a-par mostraram que o valor de  $F_{ST}$  entre as populações de Araci e Cavunge foi menor que qualquer valor entre uma dessas duas populações e qualquer uma das outras nove populações estudadas. Os valores também foram menores para entre as populações do grupo composto por Cáceres, Cametá, Olindina e Vila Pavão entre si em relação às demais populações. O mesmo ocorreu para entre as populações do grupo composto por Lassance, Palmas 1S, Pirenópolis e Porto Nacional em relação às demais populações. A população de Araçatuba mostrou altos valores de  $F_{ST}$  em relação a cada uma das outras populações, mas os valores foram ligeiramente menores em relação ao grupo composto pelas populações de Cáceres, Cametá, Olindina e Vila Pavão (Tabela 6.2.3).

A Tabela 6.2.4 mostra os valores de  $F_{ST}$  para 33 populações brasileiras de *Lu. longipalpis* usando um fragmento de 266 pb do gene *period*. Os valores par-a-par de  $F_{ST}$  foram baixos entre as populações de Araci, Cavunge e Jacobina em relação às demais. O mesmo ocorreu entre as populações de Cáceres, Cametá, Olindina, Vila Pavão e as populações com som de cópula do tipo *burst* e também entre as populações de Lassance, Palmas 1S, Pirenópolis, Porto Nacional e as populações com som de cópula do tipo pulsado (exceto pela população de Jacobina). A população de Araçatuba apresentou altos valores de  $F_{ST}$  em relação a cada uma de todas as outras populações (Tabela 6.2.4).

A Figura 6.2.4 apresenta uma árvore de agrupamento de vizinhos utilizando os valores de  $F_{ST}$  da matriz da Tabela 6.2.2 para as onze populações de *Lu. longipalpis*. Essa árvore apresentou dois grupos maiores: Grupo A e Grupo D. O Grupo A apresentou dois grupos menores: o primeiro (Grupo B) composto pelas populações de Lassance, Porto Nacional, Pirenópolis e Palmas 1S e o segundo (Grupo C) composto pelas populações de Araci e Cavunge. O Grupo D também mostrou dois grupos menores: o primeiro (Grupo E) composto somente pela população de Araçatuba e o segundo (Grupo F) composto por Cametá, Olindina e Vila Pavão (Figura 6.2.4). As populações de cada grupo compartilharam mais sítios e apresentaram menos diferenças fixas com populações do mesmo grupo quando comparadas com populações de outros grupos (Tabela 6.2.5). O número de sítios

exclusivos para cada população também foi maior quando uma população foi comparada com outra de outro grupo (Tabela 6.2.6).

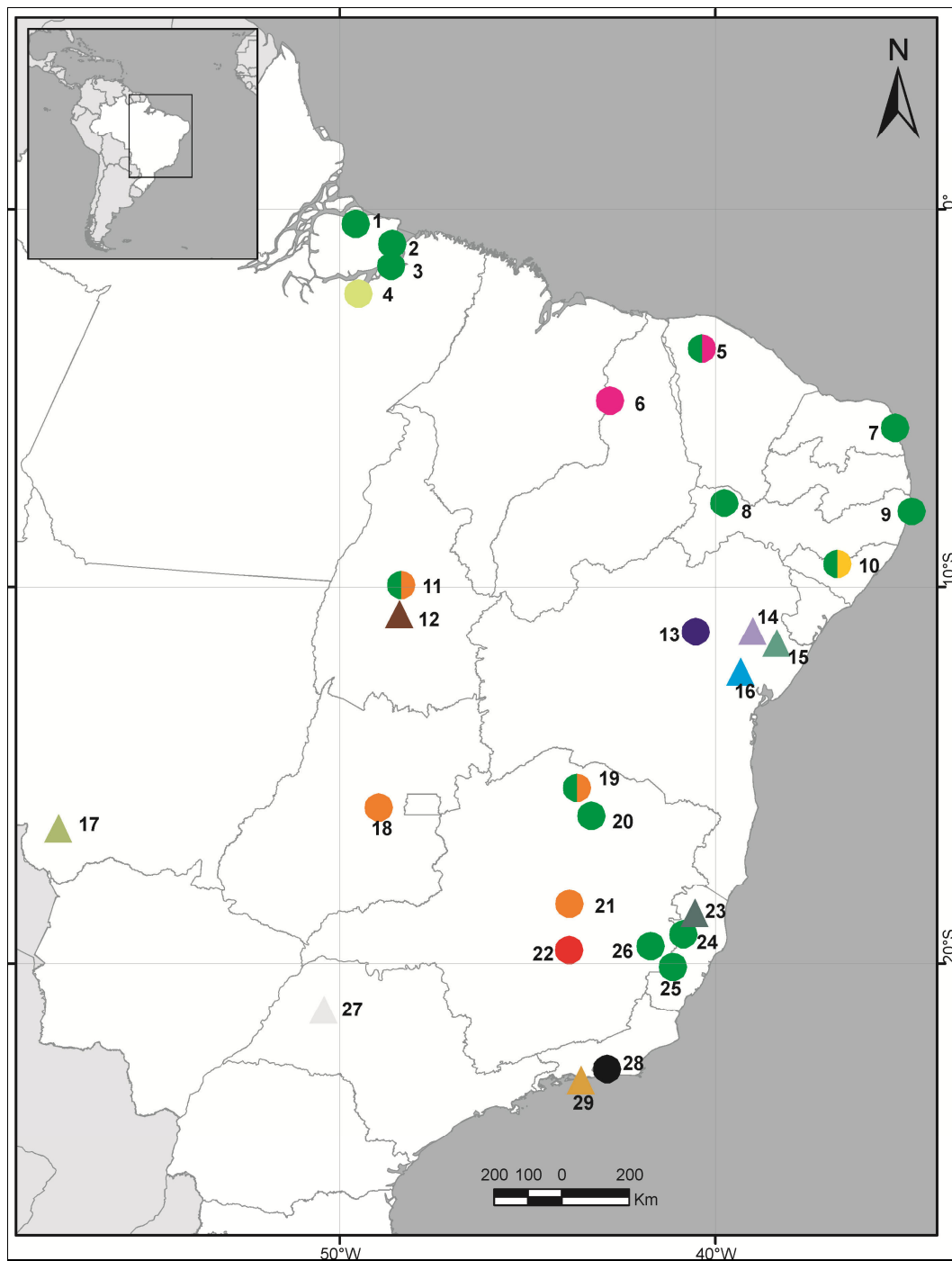
A Figura 6.2.5 apresenta uma árvore de agrupamento de vizinhos usando os valores de  $F_{ST}$  da matriz da Tabela 6.2.4. A árvore mostrou um Grupo 1 mais homogêneo e composto pelas populações com som de cópula do tipo *burst* mais as populações de Cáceres, Olindina e Vila Pavão e outros grupos menores. O Grupo 1 foi mais homogêneo e foi composto pelas populações com som de cópula do tipo *burst* mais as populações de Cáceres, Olindina e Vila Pavão. Os outros foram mais heterogêneos e compostos pelas populações com som de cópula do tipo pulsado, pelas populações com som do tipo misto e pelas populações de Araci, Barra de Guaratiba, Cavunge, Palmas 1S, Pirenópolis e Porto Nacional.

O NRB1 foi composto de 181 sequências com 58 pb de comprimento. Um total de 23 haplótipos foi identificado para o NRB1. A distribuição desses haplótipos entre as onze novas populações analisadas, o número de sítios segregantes para o NRB1 e o número de sequências representadas em cada população foi mostrado (Tabela 6.2.7). A Figura 6.2.6 apresenta a rede para esses 23 haplótipos. O Haplótipo 1, o mais freqüente, ocorreu apenas nas populações de Cáceres, Cametá, Ipanema, Olindina e Vila Pavão. O Haplótipo 2, o segundo mais freqüente, ocorreu nas populações de Jacobina, Lapinha, Lassance, Palmas 1S, Pirenópolis e Porto Nacional. O terceiro mais freqüente, Haplótipo 4, ocorreu nas populações de Araci e Cavunge, mas também nas de Palmas 1S e Porto Nacional (Figura 6.2.6). O Haplótipo 2 foi inferido com a maior probabilidade de grupo externo (0.27).

O NRB2 foi composto por 479 sequências com um comprimento de 66 pb de comprimento. Um total de 25 haplótipos foi identificado para o NRB2. A distribuição desses haplótipos entre as 33 populações analisadas, os sítios segregantes para o NRB2 e o número de sequências representadas em cada população foi mostrado. (Tabela 6.2.8). A Figura 6.2.7 mostra a rede para esses 25 haplótipos. O Haplótipo 7 foi o mais freqüente e foi representado principalmente nas populações com som de cópula do tipo *burst* e das populações de Araçatuba, Olindina e Vila Pavão. Duas sequências da população de Jacobina e uma da população de Estrela 1S também pertenceram ao Haplótipo 7. A maior parte dos haplótipos das populações com som de cópula do tipo *burst* que ocorreram em baixa freqüência foram mais relacionados ao Haplótipo 7. Os Haplótipos 1 e 2 foram ocorreram principalmente nas populações com som de cópula do tipo pulsado, mas o Haplótipo 2 também ocorreu em algumas populações com som de cópula do tipo *burst*. O Haplótipo 1 foi mais freqüente nas

populações de Araci, Cavunge e Jacobina. A maioria dos haplótipos com baixa frequência das populações com som de cópula do tipo pulsado foram mais relacionados aos haplótipos 1 e 2 (Figura 6.2.7). O Haplótipo 2 foi inferido com a maior probabilidade de grupo externo (0.34).

O modelo de substituição nucleotídica determinado pelo AIC foi o modelo JC +  $\gamma$ . A Figura 6.2.8 apresenta a topologia da árvore de máxima verossimilhança. Esta mostrou que a maioria das sequências de Araçatuba não foi agrupada dentro de um dos dois maiores clados da árvore (Clado A e Clado B). O Clado A foi composto por uma sequência pertencente à população de Araçatuba e sequências pertencentes as populações de Cáceres, Cametá, Ipanema, Olindina e Vila Pavão. O Clado B foi composto por sequências pertencentes às populações de Araci, Cavunge, Lapinha, Lassance, Palmas 1S, Pirenópolis e Porto Nacional. O Clado C, um clado menor dentro do Clado B, foi composto apenas por sequências pertencentes às populações de Araci e de Cavunge (Figura 6.2.8).



**Figura 6.2.1.** Mapa mostrando as localizações geográficas de cada uma das 33 populações analisadas. Círculos indicam populações com som de cópula gravado. Triângulos indicam som de cópula não gravado. Verde = som de cópula do tipo *burst*; Azul = Pulsado 1; Vermelho = Pulsado 2; Magenta = Pulsado 3; Laranja = Pulsado 4; Amarelo = Pulsado 5. (1-Marajó; 2-Camará; 3-Barcarena; 4-Cametá; 5-Sobral (1S e 2S); 6-Teresina; 7-Natal; 8-Passira; 9-Itamaracá; 10-Estrela; 11-Palmas (1S e 2S); 12-Porto Nacional; 13-Jacobina; 14-Araci; 15-Olindina; 16-Cavunge; 17-Cáceres; 18-Pirenópolis; 19-Jaíba (1S e 2S); 20-Nova Porteirinha; 21-Lassance; 22-Lapinha; 23-Vila Pavão; 24-Pancas; 25-Afonso Cláudio; 26-Ipanema; 27-Araçatuba; 28-Mesquita; 29-Barra de Guaratiba.





LASper03h .....T.....A.....C.....C.....  
 LASper04h .....T.....A.....C.....A.....CT.....A.....TA.....G.....G.....  
 LASper05a .....T.....T.....T.....C.....C.....C.....G.....T.....A.....  
 LASper05b .....C.....T.....C.....T.....A.....C.....G.....A.....  
 LASper06a .....T.....A.....C.....C.....T.....CT.....C.....T.....G.....T.....C.....G.....  
 LASper06b .....T.....A.....A.....C.....C.....C.....T.....G.....T.....C.....G.....A.....  
 LASper07h .....T.....T.....C.....C.....C.....T.....G.....T.....A.....  
 LASper08h .....T.....C.....C.....C.....G.....G.....A.....  
 LASper09h .....T.....C.....C.....C.....A.....T.....G.....T.....G.....A.....  
 LASper10a .....T.....A.....C.....C.....A.....T.....G.....T.....G.....A.....  
 LASper10b T.....T.....T.....T.....C.....C.....A.....TA.....C.....G.....A.....  
 LASper11a .....T.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....A.....  
 LASper11b .....T.....T.....C.....C.....A.....C.....C.....G.....G.....  
 OLlper01a .....T.....C.....C.....C.....A.....T.....TG.....G.....C.....C.....C.....G.....A.....  
 OLlper01b .....T.....CC.....T.....C.....T.....CG.....C.....TTA.....G.....C.....C.....G.....  
 OLlper02a .....T.....C.....A.....C.....C.....T.....TG.....G.....C.....C.....A.....G.....A.....  
 OLlper02b .....T.....C.....T.....C.....A.....C.....A.....T.....G.....C.....C.....G.....AA.....  
 OLlper03h .....T.....C.....T.....C.....C.....A.....T.....G.....C.....C.....G.....A.....  
 OLlper04h .....C.....T.....CC.....T.....C.....CG.....C.....TTA.....G.....C.....C.....G.....  
 OLlper05a .....T.....T.....CC.....T.....C.....CG.....C.....A.....T.....TG.....G.....C.....C.....G.....A.....  
 OLlper05b .....TC.....T.....T.....C.....T.....C.....CG.....C.....TTA.....G.....C.....C.....G.....AA.....  
 OLlper06h .....T.....C.....C.....C.....A.....T.....TG.....G.....C.....C.....C.....G.....A.....  
 OLlper07a .....T.....C.....T.....C.....C.....A.....TA.....G.....C.....G.....G.....A.....  
 OLlper07b .....T.....C.....T.....C.....C.....A.....T.....TG.....G.....C.....C.....T.....G.....GA.....  
 OLlper08a .....T.....C.....C.....C.....C.....A.....T.....TG.....G.....C.....C.....C.....G.....A.....  
 OLlper08b .....T.....C.....C.....C.....C.....A.....T.....TG.....G.....C.....C.....C.....G.....GA.....  
 OLlper10a .....TC.....T.....C.....T.....C.....C.....A.....T.....TG.....G.....C.....C.....C.....G.....A.....  
 OLlper10b .....T.....C.....C.....C.....A.....T.....TG.....G.....C.....C.....C.....G.....A.....  
 OLlper11a .....T.....T.....C.....T.....C.....C.....A.....T.....TG.....G.....C.....C.....C.....G.....A.....  
 OLlper11b .....TTC.....T.....T.....C.....T.....C.....CG.....C.....TTA.....G.....C.....C.....G.....AA.....  
 OLlper12a .....T.....T.....C.....T.....T.....C.....C.....C.....T.....TG.....G.....C.....C.....C.....G.....A.....  
 OLlper12b .....CTT.....T.....C.....T.....T.....AC.....T.....T.....TG.....G.....C.....C.....C.....G.....A.....  
 PALper01a .....T.....C.....C.....C.....T.....T.....T.....C.....G.....A.....  
 PALper01b .....C.....C.....C.....C.....T.....G.....T.....C.....G.....A.....  
 PALper02h .....C.....T.....T.....A.....G.....C.....C.....TA.....G.....G.....A.....  
 PALper03a .....T.....T.....C.....C.....A.....T.....TA.....G.....C.....C.....G.....A.....  
 PALper03b .....T.....T.....T.....T.....C.....C.....T.....TA.....G.....C.....C.....G.....A.....  
 PALper04h .....T.....T.....T.....C.....T.....A.....G.....C.....C.....G.....C.....T.....G.....T.....G.....  
 PALper05h .....T.....C.....C.....A.....C.....T.....TA.....G.....C.....C.....G.....  
 PALper06a .....T.....T.....CT.....C.....T.....TA.....G.....C.....C.....G.....  
 PALper06b .....T.....T.....A.....C.....C.....A.....TA.....G.....T.....T.....C.....G.....  
 PALper07h .....T.....C.....C.....C.....C.....TA.....G.....T.....C.....G.....A.....  
 PALper08a T.....T.....T.....C.....A.....A.....C.....C.....A.....C.....TA.....G.....T.....C.....G.....A.....  
 PALper08b .....T.....C.....C.....A.....C.....G.....TA.....G.....C.....C.....G.....A.....  
 PALper09h .....TCT.....C.....C.....C.....CT.....T.....T.....C.....G.....  
 PALper10a .....T.....C.....C.....C.....G.....G.....AT.....  
 PALper10b .....T.....C.....C.....C.....TA.....G.....T.....C.....G.....  
 PALper11a .....T.....C.....C.....C.....CCT.....C.....T.....T.....C.....C.....A.....  
 PALper11b .....T.....T.....G.....C.....C.....A.....CCT.....TA.....G.....T.....T.....C.....C.....G.....A.....  
 PALper13h .....T.....T.....T.....C.....A.....C.....C.....TA.....G.....C.....G.....A.....  
 PIRper01a .....T.....T.....T.....A.....C.....C.....C.....A.....A.....T.....TA.....T.....T.....T.....GA.....GG.....  
 PIRper01b .....T.....A.....C.....C.....C.....A.....C.....T.....G.....C.....C.....C.....GA.....AA.....  
 PIRper02h .....A.....C.....C.....CC.....TA.....G.....T.....T.....C.....C.....G.....A.....  
 PIRper03a .....A.....A.....A.....A.....TG.....G.....T.....G.....TA.....G.....T.....C.....T.....AG.....A.....  
 PIRper03b .....T.....T.....T.....G.....C.....A.....C.....G.....TA.....G.....C.....G.....GG.....  
 PIRper04a .....C.....T.....C.....T.....A.....C.....C.....A.....C.....TA.....G.....T.....C.....C.....G.....A.....  
 PIRper04b .....T.....T.....T.....A.....C.....C.....A.....C.....TA.....G.....C.....C.....GA.....GG.....AA.....  
 PIRper05a .....T.....T.....T.....T.....C.....C.....C.....TA.....G.....C.....C.....G.....A.....  
 PIRper05b .....C.....T.....C.....AC.....A.....C.....CTA.....G.....C.....C.....G.....A.....  
 PIRper06a .....T.....C.....C.....C.....C.....T.....T.....T.....C.....G.....AG.....  
 PIRper06b .....T.....T.....C.....TCG.....C.....A.....C.....TAC.....C.....T.....GC.....GG.....  
 PIRper07a .....T.....T.....C.....C.....CT.....TA.....T.....T.....C.....T.....G.....G.....  
 PIRper07b .....C.....T.....A.....TT.....C.....G.....C.....TA.....G.....T.....C.....T.....C.....G.....A.....  
 PIRper08b .....C.....T.....A.....T.....C.....C.....G.....C.....TA.....G.....C.....T.....C.....T.....G.....AC.....  
 PIRper09a .....T.....A.....T.....T.....CC.....C.....A.....T.....TAC.....C.....T.....C.....G.....A.....  
 PIRper09b .....T.....T.....T.....CC.....C.....C.....C.....T.....T.....T.....C.....G.....  
 PIRper10a .....T.....T.....TT.....C.....C.....C.....C.....T.....G.....T.....G.....C.....G.....  
 PIRper10b .....T.....A.....C.....C.....A.....C.....  
 PIRper11a .....T.....T.....A.....A.....C.....AC.....A.....C.....TA.....G.....T.....T.....C.....C.....G.....A.....  
 PIRper11b .....T.....T.....C.....C.....C.....T.....G.....T.....C.....C.....G.....  
 PIRper12a .....T.....A.....T.....T.....C.....C.....G.....T.....G.....TAC.....T.....A.....C.....T.....C.....GG.....G.....  
 PIRper12b .....CC.....T.....C.....C.....C.....C.....A.....TA.....G.....T.....C.....C.....G.....A.....  
 PIRper13a .....T.....T.....T.....T.....C.....C.....A.....C.....TA.....G.....T.....C.....G.....A.....  
 PIRper13b .....C.....T.....T.....A.....C.....C.....C.....G.....C.....TA.....G.....T.....C.....G.....AT.....  
 PNAper01a .....T.....T.....T.....A.....C.....C.....A.....C.....TA.....G.....T.....C.....G.....A.....  
 PNAper01b .....T.....T.....T.....A.....C.....C.....C.....C.....TA.....G.....T.....C.....G.....GG.....  
 PNAper02a .....T.....T.....T.....A.....C.....C.....A.....C.....TA.....G.....T.....C.....G.....GG.....  
 PNAper02b .....T.....T.....T.....A.....C.....C.....CC.....C.....A.....C.....G.....  
 PNAper03h .....T.....C.....C.....C.....TA.....G.....T.....C.....G.....  
 PNAper04a .....T.....T.....T.....C.....C.....C.....TA.....G.....T.....C.....G.....  
 PNAper04b .....T.....C.....C.....C.....C.....T.....G.....T.....C.....G.....A.....  
 PNAper05a .....T.....T.....T.....T.....C.....C.....C.....C.....T.....T.....T.....C.....G.....  
 PNAper05b .....T.....A.....C.....C.....C.....CCT.....C.....TA.....G.....C.....G.....  
 PNAper06h .....T.....T.....T.....A.....C.....C.....C.....G.....C.....T.....G.....T.....G.....  
 PNAper07a .....T.....T.....T.....C.....A.....CT.....TA.....G.....T.....G.....A.....  
 PNAper07b .....T.....T.....T.....C.....C.....T.....T.....G.....  
 PNAper08a .....T.....T.....T.....A.....C.....C.....G.....C.....C.....G.....A.....  
 PNAper08b .....T.....T.....C.....T.....A.....C.....C.....G.....T.....C.....G.....  
 PNAper09a .....T.....T.....T.....A.....A.....C.....C.....C.....TA.....G.....T.....C.....C.....G.....A.....  
 PNAper09b .....T.....T.....T.....A.....C.....C.....C.....C.....TA.....G.....T.....C.....C.....G.....A.....  
 PNAper10a .....T.....T.....T.....A.....C.....C.....CC.....C.....TA.....G.....T.....C.....C.....GA.....  
 PNAper10b .....T.....T.....T.....T.....C.....C.....C.....C.....T.....T.....T.....C.....G.....A.....  
 PNAper12a .....T.....C.....T.....A.....A.....A.....C.....C.....C.....T.....T.....T.....C.....G.....  
 PNAper12b .....T.....TG.....T.....A.....A.....C.....C.....C.....TA.....G.....T.....C.....C.....G.....  
 PNAper14a .....T.....T.....T.....T.....C.....C.....A.....C.....TA.....G.....C.....G.....A.....  
 PNAper14b .....T.....T.....T.....A.....C.....C.....CC.....C.....TA.....G.....C.....G.....A.....  
 PNAper15a .....T.....T.....T.....T.....C.....C.....C.....C.....G.....AT.....

```

PNAper15b T.....T.....A.....C.....C.T.....T.....G...A.
PNAper16h T.....A..T.C..T.....T.A.....C.....C.....C.....TA...G...G...A.
PNAper17a .....T.....T.....G..C..A...C.....C.T.....G.T.....C...GG..A..
PNAper17b .....T.....C.....C.....C.....C.....GG...A.
PNAper18h T.....C.....T.....A.....T.....C.....C..A.....TA.....C.....G...A.
VPAper01a .....C.....T.C...T.....A.....T.....C.....C.....T.....G..G...C.CA...C...G...A..
VPAper01b .....T.C...T.....C.....T.....C.....C.....C.....T.....TG..G...C.C...C...G...A..
VPAper02h .....T.C.....T.....C.....C.....A.....T.....TG..G...C.C...C...G...A..
VPAper03a .....T.C.....T.....C.....CG.....TA.....G.....C.C...C...G...A..
VPAper03b .....C.....T.C.T.....T.....C.....C.....TA.....G.....C.C...C...G...A..
VPAper04h .....T.C.....T.....C.....A.....T.....TG..G...C.C...C...G...A..
VPAper05h .....T.C.....T.....C.....A.....T.....TG..G...C.C...C...G...A..
VPAper06a .....T.C.....A.....T.....C.....C.....C.....T.....G.....C.C...C...AA.
VPAper06b .....C.C.....A.....T.....C.....A.....T.....G..G...C.C...C...G...A..
VPAper08h .....T.C.....T.....C.....A.....T.....G.....C.C...C...G...A..
VPAper09h .....T.T.C.T.....T.....C.....A.....T.....TG..G...C.C...C...G...A..
VPAper10a .....CT.C.....T.....C.....T.....GT.....C.C...C...G...A..
VPAper10b .....C.....T.C.T.....T.....C.....T.....TA.....G.....C.C...C...G...A..
VPAper11h .....T.C.....T.....C.....C.....C.....T.....TG..G...C.C...C...G...A..
VPAper12h .....T...T.T.C.....T.....C.....TC.....C.C...ACT...AA.
VPAper13a .....C.C.....A.....T.....C.....A.....T.....G..G...C.C...C...G...A..
VPAper13b .....T.C.....A.....T.....C...AC.....C.....A.....T.....G.....C.C...C...G...A..

```

**Figura 6.2.2** Alinhamento dos sítios variáveis nas sequências do fragmento do gene *period* de 446 pb para as onze novas populações brasileiras de *Lu. longipalpis* analisadas incluindo sequências de dois indivíduos de *Lu. longipalpis* da população de Ipanema (Minas Gerais) e de dois da de Lapinha (Minas Gerais). Os pontos indicam nucleotídeos iguais à primeira sequência alinhada. No cabeçalho mostramos as posições dos sítios e os sítios que apresentaram somente mutações sinônimas (S) e os que apresentaram mutações não-sinônimas (N). Cada sequência foi nomeada de acordo com a população (três primeiras letras maiúsculas), gene sequenciado (três primeiras letras minúsculas), número do indivíduo e alelo (“a” e “b” para indivíduo que apresentou dois alelos e “h” para indivíduo que apresentou apenas um alelo). O nome de cada população foi abreviado como a seguir: IPA = Ipanema; LAP = Lapinha; ART = Araçatuba; ACI = Araci; CAC = Cáceres; CMT = Cameté; CVG = Cavunge; LAS = Lassance; OLI = Olindina; PAL = Palmas 1S; PIR = Pirenópolis; PNA = Porto Nacional; e VPA = Vila Pavão.



ARTper09h .A.T....OGT.....A.A....T.....T.....T.T.....A.....  
ARTper10a .A.....OG.....A.....T.....T.....T.....A.....T.....  
ARTper10b .A.....CG.C..C..A.....GA.....T.T..C.C.....A.....  
ARTper11a .A.....CGTC.....A.....T.....T.T.....C.....A.....  
ARTper11b .A.....G.....G.....T.T.....C.....A.A.....  
ARTper12a .A.....T.G.....T.....T.....C.....A.....  
ARTper12b .A.....OG.....A.....G.....T.T.A.C.....T.T.....A.....  
ACIper01a .....A.A.....C.....A.....  
ACIper01b .....A.....C.....  
ACIper02h .....A.....  
ACIper03h .....A.....  
ACIper05h .....A.A.....C.....A.....  
ACIper06a .A.....A.A.....C.....A.....  
ACIper06b .....A.A.....C.....A.....  
ACIper07a .....A.A.....C.....A.....  
ACIper07b .....A.....  
ACIper08h .....A.....  
ACIper09a .....A.....  
ACIper09b .....A.A.....AA.....  
ACIper10a .....A.A.....C.....  
ACIper10b .A.....A.A.....C.....A.....  
ACIper11a .....A.A.....C.....A.....  
ACIper11b .....A.....  
BARCs01 .A.....OG..C..A.....T.T.....C..A.....A.....  
BARCs01 .A.....OGT..C..A.....T.TT...C.....A.....T.....A.....  
BARCs02 .A.....OG..C..A.....T.T.....C.....G.....A.....A.....  
BARCs03 .A.....OG..C..A.....T.T.....C..A.....A.....  
BARCs04 .A.....CG..C..A.....T.T.....C..A.....A.....  
BARCs05A .A.....OGT..C..A.....T.TT...C.....A.....T.....A.....  
BARCs05B .A.....OG..C..A.....T.T.....C.....C.....T.....A.....  
BARCs06A .A.....OG..C..A.....T.T.....C.....G.....A.....A.....  
BARCs06B .A.....OG..C..A.....T.T.....C.....A.....A.....  
BARCs07 .A.....OGT..C..A.A.....T.T.....C.....T.....T.....AA.....  
BARCs08A .A.....OGT..C..A.....T.TT...C.....A.....T.....A.....  
BARCs08B .A.....OG..C..A.....T.T.....C.....A.....A.....  
BARCs09 .A.....OG..C..A.....T.T.....C.....A.....A.....  
BG01 .A.....OG.....A.....TA..G.....A.A.....  
BG02 .A.....OG.....A.....TA..G.....A.A.....  
BG03 .A.....OG.....A.....TA..G.....A.A.....  
BG04 .A.....OG.....A.....TA..G.....A.A.....  
BG05 .A.....OG.....A.....TA..G.....A.A.....  
BG06 .A.....OG.....A.....TA..G.....A.A.....  
BG07 .A.....OG.....A.....TA..G.....A.A.....  
BG09 .A.....OG.....A.....TA..G.....A.A.....  
BG10 .A.....OG.....A.....TA..G.....A.A.....  
BG12 .A.....OG.....A.....TA..G.....A.A.....  
BG13 .A.....OG.....A.....TA..G.....A.A.....  
BG14 .A.....OG.....A.....TA..G.....A.A.....  
BG15 .A.....OG.....A.....TA..G.....A.A.....  
BG16 .A.....OG.....A.....TA..G.....A.A.....  
BG17 .A.....OG.....A.....TA..G.....A.A.....  
BG18 .A.....OG.....A.....TA..G.....A.A.....  
BG19 .A.....OG.....A.....TA..G.....A.A.....  
BG20 .A.....OG.....A.....TA..G.....A.A.....  
BG21 .A.....OG.....A.....TA..G.....A.A.....  
BG22 .A.....OG.....A.....TA..G.....A.A.....  
BG23 .A.....OG.....A.....TA..G.....A.A.....  
BG24 .A.....OG.....A.....TA..G.....A.A.....  
BG25 .A.....OG.....A.....TA..G.....A.A.....  
BG26 .A.....OG.....A.....TA..G.....A.A.....  
CAQper01a .A.....OG..C..A.....T.T.....C.....T.C.....A.....T.....  
CAQper01b .A.....OGT..C..A.....T.T.....C.....C.C.T.....A.A.....  
CAQper02a .A.....C..A.....T.T.T.....C.....C.....T.....A.A.....  
CAQper02b .A.....CG..C..A.....T.T.....C.....C.C.T.....A.....  
CAQper03a .A.....OG..C..A.....T.T.....C.....C.C.T.C.....A.....  
CAQper03b .A.....OGT..C..TA.....T.T.....C.....A.....A.....  
CAQper04a .A.....OG..C..AA.....T.T.....C.....C.C.T.....A.A.....  
CAQper04b .A.....OG..C..AA.....T.T.....C.....C.C.T.....A.A.....  
CAQper05a .A.....OG..C..A.....T.T.....C.....T.....A.A.T.....  
CAQper05b .A.....OG..C..A.....T.T.....C.....T.....T.....A.....  
CAQper06h .A.....CG..C..A..T.....C.....TT..C.....A.....T.....A.A.T.....  
CAQper07h .A.....OG..C..A.....A.....T.T.....C.....T.....TA.....  
CAQper08a .A.....OG..C..A.T.....T.T.....C.....T..G.....T.C.....A.....  
CAQper08b .A.....OG..C..A.....T.T.....C.....C.C.T.....T.....A.....  
CAQper10a .A.....OG..C..A.....A.....T.T.....C.....A.....A.....  
CAQper10b .A.....OGT..C..TA.T.....T.T.....C.....A.....T.....A.....  
CAQper11h .A.....OG..C..A.T.....T.T.....C.....A.....AA.....  
CAQper12a .A.....OG..C..A.....T.T.....C.....T.....A.....  
CAQper12b .A.....OG..C..A.T.....T.T.....C.....A.....C.T.....A.....  
CAQper13h .A.....OGT..C..A.....T.T.....C.....T.....A.A.....

CACper14h .A.....C...A.....T.T.....C.....AA.....  
 CACper15a .A.....CG...C...A.....T.T.....C.....A.....T.C.....A.....  
 CACper15b .A.....CG...C...A.....T.T.....C.....A.....A.....A.....  
 CMTper01h .A.....CG...C...A.....T.T.....C.....A.....A.....A.....  
 CMTper02a .A.....CG...C...A.....T.T.....C.....A.....A.....A.....  
 CMTper02b .A.....CGT...C...A.....T.TT...C.....A.....T.....A.....  
 CMTper03a .A.....CG...C...A.....T.T.....C.....A.....A.....A.....  
 CMTper03b .A.....CGT...C...TA.....T.T.....C.....A.A...C.C.T...T...A...T...  
 CMTper04h .A.....CG...C...A.....T.T.....C.....G.....A.A...  
 CMTper05h .A.....CG...C...A.....T.T.....C.....G.....A.A...  
 CMRs01 .A.....CGT...C...A.....T.TT...C.....A.....T.....A.....  
 CMRs12B .A.....CGT...C...A.....T.TT...C.....A.....T.....A.....  
 CMRs04 .A.....CGT...C...A.....T.TT...C.....A.....T.....A.....  
 CMRs05A .A.....CG...C...A.....T.T.....C.....G.....A.A...  
 CMRs05B .A.....CGT...C...A.....T.TT...C.....A.....T.....A.....  
 CMRs06 .A.....CGT...C...A.....T.TT...C.....A.....T.....A.....  
 CMRs07 .A.....CGT...C...A.A.....T.T.....C.....T.....AA...  
 CMRs08 .A.....CGT...C...A.....T.TT...C.....A.....T.....A.....  
 CMRs09 .A.....CG...C...A.....T.T.....C.....C.....T.....A.....  
 CMRs10 .A.....CGT...C...A.....T.TT...C.....A.....T.....A.....  
 CMRs11 .A.....CGT...C...A.....T.TT...C.....A.....T.....A.....  
 CMRs12A .A.....CG...C...A.....T.T.....C.....G.....A.A...  
 CVQper01h .....A.A.....C.....  
 CVQper02a .A.....CG...C.....  
 CVQper02b .....A.A.....C.....  
 CVQper03a .....A.A.....C.....  
 CVQper03b .....A.A.....C.....A.....  
 CVQper04a .....  
 CVQper04b .A.....CG...C.....  
 CVQper05a .A.....CG...C.....  
 CVQper05b .A.....CG...C.....AA...  
 CVQper06a .A.....CG...C.....  
 CVQper06b .....A.A.....C.....  
 CVQper07h .A.....CG...C.....  
 CVQper08h .A.....CG...C.....  
 CVQper09a .A.....CG...C.....  
 CVQper09b .A.....CG...A.....T.....A.....T.....A.....  
 CVQper10h .....A.A.....C.....  
 CVQper11a .....A.A.....C.....  
 CVQper11b .....  
 CVQper12a .A.....CG...C.....  
 CVQper12b .....  
 Est1S03A .A.....CG.....A.A.G.-C.....A.....C.....A.....  
 Est1S03B .A.....CG.A.....A.A.G.-C.....T.C.....G.T.....A.....  
 Est1S04 .A.....CG.A.....A.A.G.-C.....T.C.....G.....A.....  
 Est1S08 .A.....CGT...C...TA.T.T.....T.T.....C.....A.A...C.C.T...T...A...A...  
 Est1S09 .A.....CG.....A.A.G.-C.....A.....C.....A.....  
 Est1S10A .A.....CG.....A.A.G.-C.....A.....C.....A.....  
 Est1S10B .A.....CG.A.....A.A.G.-C.....T.C.....T.....A.....  
 Est1S19 .....A.A.T.G.-C.....A.....C.....A.....  
 Est1S11A .A.....CG.A.....A.A.G.-C.....T.C.....A.....  
 Est1S11B .A.....CG.....A.A.G.-C.....A.....C.....A.....  
 Est1S12 .....A.A.T.G.-C.....A.....C.....A.....  
 Est1S18 .A.....CG.A.....A.A.G.-C.....T.C.....A.....  
 Est1S07 .A.....CG.....A.....TA.G.....A.....A.....  
 Est1S06A .A.....CG.....A.A.G.-C.....A.....C.....A.....  
 Est1S06B .A.....CG.A.....A.A.G.-C.....T.C.....A.....  
 Est1S13A .A.....CG...C...A.....T.T.....C.....A.....T.....A.A...  
 Est1S13B .A.....CG.A.....A.A.G.-C.....T.C.....A.....  
 Est1S14A .A.....CG.....A.A.G.-C.....T.C.....A.C...A.....  
 Est1S14B .A.....CG...C...A.....T.....T.T.....C.....A.....T.....A.A...  
 Est1S17 .A.....CG.....A.A.G.-C.....A.....C.....A.....  
 Est1Ss09A .A.....CG.....A.A.G.-C.....-T.C.....G.....A.....A.....  
 Est1Ss09B .A.....CG.....A.A.G.-C.....A.....C.....T.....A.....  
 Est2S02 .A.....CGT...C...A.....T.T.....C.....T.....A.....  
 Est2S04A .A.....CGT...C...A.....T.T.....C.....T.....A.....  
 Est2S04B .A.....CG...C...A.....T.T.....C.....A.....T.....A.A...  
 Est2S05A .A.....CGT...C...A.....T.T.....C.....T.....A.....  
 Est2S05B .A.....CG...C...A.....T.T.....C.....A.....A.A...  
 Est2S06A .A.....CGT...C...A.....T.T.....C.....G.....A.A...  
 Est2S06B .A.....CG...C...A.....T.T.....C.....A.....T.....A.A...  
 Est2S07 .A.....CGT...C...A.....T.T.....C.....T.....A.....  
 Est2S08 .A.....CGT...C...A.....T.T.....C.....T.....A.....  
 Est2S24A .A.....CG.A.....A.A.G.-C.....T.C.....A.....  
 Est2S24B .A.....CG...C...A.....T.T.....C.....C.....T.....A.....  
 Est2S26A .A.....CG...C...A.....T.T.....C.....A.....T.....A.A.T...  
 Est2S26B .A.....CG...C...A...T.....C.....TT...C.....C.C.T.C...A.....  
 Est2S27 .A.....CG...C...A.....T.T.....C.....T.....A.A...  
 Est2S28B .A.....CG...C...TA.....T.T.....C.....A.....T.....A.A...  
 Est2S28A .A.....TG...C...A.....T.T.....C.....C.....T.....A.....

Est2S30A .....A.A.....C.....  
 Est2S30B .....CG.A.....A.A.A.-C.....A.....  
 Est2S25 .....A.....CG...C...A.....T.T...C.C.....C.T.....A.....  
 Est2S29 .....A.....CG...C...A.....T.T...C.....A.....T.....A.A.....  
 Est2S31A .....A.....CG...C...A.....T.T...C.....A.....T.C.....A.....  
 Est2S31B .....A.....CG...C...A.....T.T...C.....A.....T.C.....A.....  
 Est2S32 .....A.....CG...C...A.....T.T...C.....A.....T.....A.A.....  
 Est2Ss07B .....A.....CGT...C...TA.....T.T...C.....A.....T.....A.A.....  
 Est2Ss07A .....A.....CG...C...A.....T.T...C.C.....C.T.....A.....  
 Est2Ss06 .....A.....CG...C...A.....T.T...C.....T.....A.A.....  
 Est2Ss05 .....A.....CG...C...A.....T.T...C.....A.....T.....A.A.....  
 Est2Ss04 .....A.....CG...C...A.....T.T...C.....A.....T.C.....A.A.....  
 Est2Ss03 .....A.....CG...C...A.....A.....T.T...C.....A.....T.C.....A.A.....  
 Est2Ss01 .....A.....CG...C...A.....T.T...C.....A.....T.....A.A.....  
 IPAs01 .....A.....CG...C...A.....T.T...C.....C.T.....A.A.....  
 IPAs02A .....A.....CG...C...A.....T.T...C.....A.....T.....A.A.....  
 IPAs02B .....A.....CG...C...A.....T.T...C.....A.....T.....A.A.....  
 IPAs04 .....A.....CG...C...A.....T.T...C.....T.....A.....  
 IPAs06A .....A.....CG...C...A.....T.T...C.....A.....T.....A.A.....  
 IPAs06B .....A.....CGT...C...TA.....T.T...C.....A.....T.....A.A.....  
 IPAs07A .....A.....CG...C...A.....T.T...C.....A.....T.....A.A.....  
 IPAs07B .....A.....CG...C...A.....T.T...C.....A.....T.....A.A.....  
 IPAl3B .....A.....CG...C...A.....T.T...C.....T.....T.....A.....  
 IPAs03A .....A.....CGT...C...TA.....T.T...C.....A.....T.....A.A.....  
 IPAs03B .....A.....CG...C...A.....T.T...C.....A.....T.....A.A.....  
 IPAs05A .....A.....CG...C...A.....T.T...C.....A.....T.....A.A.....  
 IPAs05B .....A.....CGT...C...A.....T.T...C.....A.....T.....A.A.....  
 IPAs08A .....A.....CG...C...A...T.....C.....TT.....C.....A.....  
 IPAs08B .....A.....CG...C...A.....A.....T.T...C.....T.....A.....  
 IPAl0 .....A.....CG...C...A.....T.T...C.....A.....T.....A.A.....  
 IPAl1A .....A.....CG...C...A.....T.T...C.....A.....T.....A.A.....  
 IPAl1B .....A.....CGT...C...A.....T.T...C.....A.....T.....A.A.....  
 IPAl2 .....A.....CG...C...A.....T.T...C.....G.....T.....A.....  
 IPAl3A .....A.....CG...C...A.....T.T...C.....AG.....T.....A.....  
 ITM16 .....A.....CG...C...AA.....T.T...C.....A.....C.C.T.C.....A.....  
 ITMs01 .....A.....CG...C...A...T.....C.....TT.....C.....A.....T.....A.....  
 ITMs03 .....A.....CGT...C...A.....T.T...C.....A.....C.T.....A.A.....  
 ITMs04 .....A.....CG...C...A.....T.T...C.....A.....T.....A.A.....  
 ITMs05A .....A.....CG...C...A.....T.T...C.....G.....C.T.....A.....  
 ITMs05B .....A.....CGT...C...A.....T.T...C.....A.....C.T.....A.A.....  
 ITM07A .....A.....CG...C...A.....T.T...C.....A.....T.....A.A.....  
 ITM07B .....A.....CGT...C...TA.....T.T...C.....A.....A.....  
 ITM08 .....A.....CGT...C...TA.....T.T...C.....A.A.....C.C.T...T.....A.....  
 ITML0 .....A.....CG...C.C.A.....T.T...C.....G.....C.T.....A.....  
 Jac07r217 .....A.....CG.....A.....  
 Jac09r218 .....A.....  
 Jac13r221 .....A.....CG...C...A...T.....C.....TT.....C.....C.....T.....TA.....  
 Jac08r224 .....A.....A.....C.....A.....  
 Jac11r225 .....A.....A.A.....C.....A.....  
 Jac12r226 .....A.....C.....A.....  
 Jac03r229 .....A.....C.....  
 Jac04r230 .....A.....A.A.....C.....  
 Jac20r232 .....A.....C.....  
 Jac21r233 .....A.....CG...C...A.....T.T...C.....A.....T.....A.A.....  
 Jac22r234 .....A.....C.....  
 Jac14r247 .....A.....CG...C...A...T.....C.....TT.....C.....C.....T.....TA.....  
 Jac17r248 .....A.....C.....A.....  
 Jac05r249 .....A.....A.....C.....  
 Jac25r251 .....A.....  
 Jac27r253 .....A.....  
 Jac16r431 .....A.T...CG...C...A.....T.T...C.....A.....C.C.T.....A.....  
 Jac10r490 .....A.....  
 Jac28r512 .....A.....C...A.A.....C.....  
 Jac29r513 .....A.....A.A.....C.....  
 Jac30r514 .....A.....C.....  
 Jac01r547 .....A.....C.....  
 JailS13 .....A.....CG.....A.....C.....CT.....A.....C.....  
 JailS12 .....C.....CGT.....A.....G.....A.....  
 JailS08B .....C.....CGT.....A.....T.....A.....T.....A.....  
 JailS08A .....TA.....CG.....A.....T.....A.....CT.....A.....  
 JailS07 .....C.....CGT.....A.....T.....A.....T.....A.....  
 JailS03B .....A.....CG..A...A.....T.....A.....T.....A.....  
 JailS03A .....A.....CGT.A...A.....C.....A.....A.....A.....  
 JailS02B .....A.....CG.....A.....A.....A.....A.....  
 JailS02A .....A.....CGT.A...A.....T.....T.....A.....A.....  
 JailS01B .....A.....CG...C...A.....T.....C.....A.....T.....A.....  
 JailS01A .....A.....CG...A...A...G.....C.....CG.....C.....A.....  
 JailSs03B .....A.T...CGT.A...A.....T.....C.....A.....T.CT.....A.....  
 JailSs03A .....TA.....CG.....A.....C.....C.....A.....  
 JailS15B .....A.....CG.....A.....T.....C.....T.....A.....

JailS15A .A.....CG.....A.....G.....A.....  
 JailS14B .A.....CG.A....A.....T.....A.....T.....A.....  
 JailS14A .A.....CG.A....A.....T.....C.....A.....T.....A.....  
 Jai2S14B .A.....CGT..C.TA.....T.T.....C.....T.....A.....  
 Jai2S14A .A.....CG...C.A.....T.T.....C.....A.....T.....A.A.....  
 Jai2S09B .A.....CG...C.A.....A.....T.T.....C.....A.....T.C.....A.....  
 Jai2S09A .A.....CG...C.A.....T.T.....C.....A.A..C.C.T..T.....A.....  
 Jai2S12 .A.....CG...C.A.....A.....T.TT.....C.....C.C.T.....A.....  
 Jai2Ss11B .A.....CG...C.A.....T.T.....C.....A.....T.....A.A.....  
 Jai2Ss11A .A.....CG...C.A.....T.T.....C.....A.....A.A.....  
 Jai2Ss10B .A.....CG...C.A.....T.T.....C.....A.....T.....A.A.....  
 Jai2Ss10A .A.....CGT..C.TA...T.....T.T.....C.....C.C.T.C.....A.....  
 Jai2S08 .A.....CG...C.A.....T.T.....C.....A.....T.....A.A.....  
 Jai2S06 .A.....CG...C.A.....A.....T.T.....C.....A.....T.....A.A.T.....  
 Jai2Ss04B .A.....CGT..C.A.....T.T.....C.....T.....T.....A.....  
 Jai2Ss04A .A.....CG...C.A.....T.T.....C.....T.....A.....  
 Jai2Ss01 .A.....CG...C.A.....T.T..C.C.....A.....A.....  
 Jai2Ss02 .A.....CG...C.A.....A.....T.T.....C.....A.....T.C.....A.....  
 Lap02r254 .A.....CG.A....A.....T.....A.....A.....A.....  
 Lap03r255 .A.....CG.A....A.....T.....A.....A.....A.....  
 Lap04r256 .A.....CG...C.....A.....A.....A.....A.....  
 Lap06r257 .A.....CGT.A....A.....G.....T.....A.....  
 Lap09r258 .A.....CG.A....A.....T.....A.....A.....A.....  
 Lap10r280 .A.....CG.A....A.....T.....A.....A.....A.....  
 Lap12r282 .A.....CG.A.....A.....T.....A.....A.....A.....  
 Lap14r284 .A.....CG...C.....A.....T.....A.....A.....A.....  
 Lap16r286 .A.....CG.A....A.....T.....T.....A.....A.....A.....  
 Lap17r287 .A.....CG...C.....A.....A.....A.....A.....A.....  
 Lap25r416 .A.....CG.A....A.....T.....A.....A.....A.....  
 Lap30r417 .A.....CG...C.....A.....T.....A.....A.....A.....  
 Lap11r492 .A.....CG...C.....A.....T.....A.....A.....A.....  
 Lap13r493 .A.....CG.A....A.....T.....A.....A.....A.....  
 Lap15r494 .A.....CG.A....A.....T.....A.....A.....A.....  
 Lap23r495 .A.....CG.A....A.....T.....A.....A.....A.....  
 Lap29r496 .A.....CG...C.....A.....G.....A.....CT.....A.....C.....  
 Lap20r516 .A.....CG...C.....A.....A.....A.....A.....A.....  
 Lap21r517 .A.....CG.A....A.....C.....T.....A.....A.....  
 Lap22r518 .A.....CG...C.....A.....T.....A.....A.....A.....  
 Lap27r519 .A.....CG...CC.A.....A.....A.....A.....A.....  
 Lap28r520 .A.....CG...C.....A.....TT.....C.....A.....A.....  
 Lap18r551 .A.....CGT.A....A.....T.....G.....T.....A.....C.....  
 LASper01a .A.....CG...C.....A.....T.....A.....A.....A.....  
 LASper01b .A.....CG...C.....A.....A.....G.....T.....A.....G.....  
 LASper02a .A.....CG...C.....A.....T.....A.....A.....A.....C.....  
 LASper02b .A.....CG...C.....A.....C.....A.....T.....A.....  
 LASper03h .A.....CGT.A....A.....A.....A.....A.....A.....  
 LASper04h .A.....CG...C.....A.....C.....A.....T.CT.....A.....A.....  
 LASper05a .A.....CG.A....A.....T.....C.....T.....A.....A.....  
 LASper05b .A.....CG...C.....A.....T.....A.....A.....A.....  
 LASper06a .A.....CG...C.....A.....T.....C.....T.....T.CT.....A.....C.....  
 LASper06b .A.....CG...C.....A.....T.....A.....C.....A.....T.....A.....  
 LASper07h .A.....CG.A....A.....T.....C.....T.....A.....A.....  
 LASper08h .A.....CG...C.....A.....T.....C.....A.....A.....  
 LASper09h .A.....CG.A....A.....T.....T.....A.....A.....  
 LASper10a .A.....CGT.A....A.....A.....A.....A.....A.....  
 LASper10b .A.....CG.A....A.....TT.....C.....A.....T.....A.....  
 LASper11a .A.....CG...C.....A.....T.....C.....A.....T.....A.....  
 LASper11b .A.....CGT.A....A.....T.....C.....A.....A.....A.....  
 Mar01A .A.....CGT..C.TA.....T.T.....C.....A.A..C.C.T..T.....A.....T.....  
 Mar01B .A.....CG..C.C..A..T.....C.....T.T.....C.....A.....T.....A.A.T.....  
 Mar02 .A.....CGT..C.A.....T.TT.....C.....A.....T.....A.....  
 Mar03 .A.....CGT..C.A.....T.TT.....C.....A.....T.....A.....  
 Mar11 .A.....CGT..C.A.....T.TT.....C.....A.....T.....A.....  
 Mesq02A .A.....CG...C.....A.....T.....T.....A.....A.....  
 Mesq02B .A.....CG...C.....A.....T.....A.....A.....A.....  
 Mesq04 .A.....CG...C.....A.....TA.....G.....A.....A.....  
 Mesq05 .A.....CG...C.....A.....T.....T.....A.....A.....  
 Nat02r578 .A.....CG...C.....A.....T.T.....C.....T.....A.....A.....  
 Nat01r601 .A.....CG...C.....A.....T.T.....C.....C.....T.....A.....A.....  
 Nat03r605 .A.....C.T..C.A.....T.T.....CC.....T.....A.....  
 Nat06r607 .A.....CG...C.....A.....T.T.....C.....G.....A.....A.....  
 Nat10r611 .A.....CG...C.....A.....T.T.....C.....T.....A.....  
 Nat13r614 .A.....CG...C.....A.....T.TT.....C.....C.T.....A.....A.....  
 Nat16r615 .A.....CG...C.....A.....T.T.....C.....A.....C.....T.....A.....A.....  
 Nat17r619 .A.....CG...C.....A.....T.T.....C.....A.....T.....A.....  
 Nat19r684 .A.....CGT..C.A.....T.T.....C.....C.C.T.....A.....  
 Nat12r689 .A.....CG...C.....A.....T.T.....C.....A.....T.....T.....A.....  
 Nat14r691 .A.....CG...C.....A.....T.T.....CT.....T.....T.....A.....  
 Nat18r694 .A.....CG...C.....A.....T.T.....C.....A.....T.....A.....A.....  
 Nat22r695 .A.....CG...C.....A.....T.T.....C.....A.....C.T.C.....A.....



Nat04r700 .A.....CG....C...A.....A.....T.TT....C.....T.C.....A.....  
 Nat05r702 .A.....CG....C...A.....A.....T.T....C.....A.....T.....A.....  
 Nat07r704 .A.....CG....C...A.....A.....T.T....C.....A.....T.C.....A.....  
 Nat11r706 .A.....CG....C...A.....A.....T.T....C.....A.....T.C.....A.....  
 Nat15r708 .A.....CG....C...A.....A.....T.T....C.....A.....T.....A.....  
 Nat21r718 .A.....CG....C...A.....A.....T.T....OC...A.....T.C.....A.....  
 Nat23r720 .A.....CG....C...A...T.....C.....T.T....C.....A.....T.....A.....  
 Nat24r722 .A.....CG....C...A.....A.....T.T....CT.....T.....T.....A.....  
 NPQper01h .A.....CG....C...A.....A.....T.T....C.....C.....T.....A.....  
 NPQper03h .A.....CG....C...A.....A.....T.T....C.....A.A...C.C.T...T...A.....  
 NPQper04h .A.....CGT...C...A.....C.....TT....C.....C.....T.....A.....  
 NPQper05a .A.....CG....C...A.....A.....T.T....C.....A.....T.....A.....  
 NPQper05b .A.....CG....C...A.....A.....T.T....C.....A.....T.C.....A.....  
 NPQper06a .A.....CG....C...A.....A.....T.T....C.....A.....T.C.....A.....  
 NPQper06b .A.....CG....C...A.....A.....T.T....C.....A.....T.....A.....  
 NPQper08a .A.....CG....C...A.....A.....T.T....C.....A.....T.....A.....  
 NPQper08b .A.....CG....C...A.....A.....T.T....C.....A.....T.....A.....  
 NPQper09a .A.....CGT...C.TA.....A.....T.T....C.....A...C.C.T.C...A.....  
 NPQper09b .A.....CGT...C.TA.....A.....T.T....C.....A...C.C.T.C...A.....  
 NPQper11a .A.....CG....C...A.....A.....T.T....C.....G.....A.....A.....  
 NPQper11b .A.....CG....C...A.....A.....T.T....C.....G.....A.....A.....  
 NPQper12a .A.....CG....C...A.....A.....T.T....C.....A.....T.....A.....  
 NPQper12b .A.....CG....C.C.A.....A.....T.T....C.....A.....A.....A.....  
 NPQper13a .A.....CG....C...A.....A.....T.T....C.....A.....T.....A.....  
 NPQper13b .A.....CG....C...A.....A.....T.T....C.....A.....T.C.....A.....  
 NPQper14a .A.....CG....C...A.....A.....T.T....C.....A.....A.....A.....  
 NPQper14b .A.....CG....C...A.....A.....T.T....C.....A.....T.T.....A.....  
 NPQper15a .A.....CG....C...A.....A.....T.T....C.....A.....T.....A.....  
 NPQper15b .A.....CG....C...A.....A.....T.TT....C.....C.C.T...A.....  
 NPQper16a .A.....CG....C...A.....A.....T.T....C.....A.....T.....A.....  
 NPQper16b .A.....CGT...C.TA...T.....T.T....C.....A.A...C.C.T...T...A.....  
 NPQper17h .A.....CG....C...A.....A.....T.T....C.....A.....T.....A.....  
 NPQper18h .A.....CG....C...A.....A.....T.T....C.....A.....T.....A.....  
 OLlper01a .A.....CG....C...A.....A.....T.T....C.....A.....T.....A.....  
 OLlper01b .A.....CG....C.C.A.....A.....T.T....C...T...G...C.T...A.....  
 OLlper02a .A.....CG....C...A.....A.....T.T....C.....A.A...C.C.T...A.....  
 OLlper02b .A.....CG....C...A.....A.....T.T....C.....A.....A.....A.....  
 OLlper03h .A.....CG....C...A.....A.....T.T....C.....A.....T.....A.....  
 OLlper04h .A.....CG....C.C.A.....A.....T.T....C.....G...C.T...A.....  
 OLlper05a .A.....CG....C.C.A.....A.....T.T....C.....G...C.T...A.....  
 OLlper05b .A.....CGT...C.TA.....A.....T.T....C.....G...C.T...A.....  
 OLlper06h .A.....CG....C...A.....A.....T.T....C.....C.....T.....A.....  
 OLlper07a .A.....CG....C...A.....A.....T.T....C.....A.....T.....A.....  
 OLlper07b .A.....CG....C...A.....A.....T.T....C.....A.....T.....A.....  
 OLlper08a .A.....CG....C...A.....A.....T.T....C.....A.....T.....A.....  
 OLlper08b .A.....CG....C...A.....A.....T.T....C.....A...C...T.....A.....  
 OLlper10a .A.....CG....C...A.....A.....T.T....C.....A.....T.....A.....  
 OLlper10b .A.....CG....C...A.....A.....T.T....C.....A.....T.....A.....  
 OLlper11a .A.....CG....C...A.....A.....T.T....C.....A.....T.....A.....  
 OLlper11b .A.....CGT...C.TA.....A.....T.T....C.....G...C.T...A.....  
 OLlper12a .A.....CGT...C.TA.....A.....T.T....C.....A...C.C.T.C...A.....  
 OLlper12b .A.....CG....C.TA.....A.....T.T....C.....A...T...T...A.....  
 PallS01A .A.....CG....A.....A.....T....C.....T.....A.....  
 PallS01B .A.....CG...A...A...C.....T....C.....A.....T.....A.....  
 PallS02 .C.....CGT...A.....A.....G.....T.....A.....  
 PallS03A .A.....CGT...A.....A.....T....C.....A...T.....A.T.....  
 PallS03B .A.....CG....A.....A.....T....T...A.....T.....A.T.....  
 PallS04 TA.....CGT...C...A...T.....G.....T.....A.....C.....  
 PallS05 .A.....CGT...A.....A.....T....C.....A...T.....A.T.....  
 PallS06A .A.....CGT...A.....A.....T....CT.....T.....T.....A.....  
 PallS06B .A.....CG....A.....A.....T....C.....A.....T.....A.....  
 PallS07 .A.....CG....A.....A.....T....C.....T.....T.....A.....  
 PallS08A TA.....CG...A.....A.....C.....A...C.....A.....A.....  
 PallS08B .A.....CGT...A...A.....T....C.....A.....T.C.....A...G...  
 PallS09 .A.....CGTC...A.....A.....T....C.....T.....A.....  
 PallS10A .A.....CG....A.....A.....T....C.....T.....A.....  
 PallS10B .A.....CG....A.....A.....T.....A.....T.....A.....  
 PallS11A .A.....CG....A.....A.....T....C.....A.....CT.....A...C...  
 PallS11B .A.....CGT...A...A...G.....T....C.....A.....CT.....A.....  
 PallS13 .AT.....CGT...A.....A.....C.....T.....T.....A.....  
 Pal2S01 .A.....CG....C.TA.....A.....T.T....C.....T.....T.....A.....  
 Pal2S02 .A.....CG....C...A.....A.....T.T....C.....G.....A.....A.....  
 Pal2S03A .A.....CG....C...A.....A.....T.T....C.....T.....A.....  
 Pal2S03B .A.....CG....C...A.....A.....T.T....C.....A.....T.....A.....  
 Pal2S04A .A.....CG....C...A.....A.....T.T....C.....A...C...T.....A.....  
 Pal2S04B .A.....CGT...C...A.....A.....T.T....C.....A.....T.....A.....  
 Pal2S05A .A.....CG....C...A.....A.....TT....C.....T.....A.....  
 Pal2S05B .A.....CG....C...A.....A.....TT....C.....T.....A...A...T...  
 Pal2S06 .A.....CG....C...A.....A.....T.T....C.....T.....A.....A.....  
 Pal2S07 .A.....CG....C...A...T.....A.....T.T....C.....C.....A.....

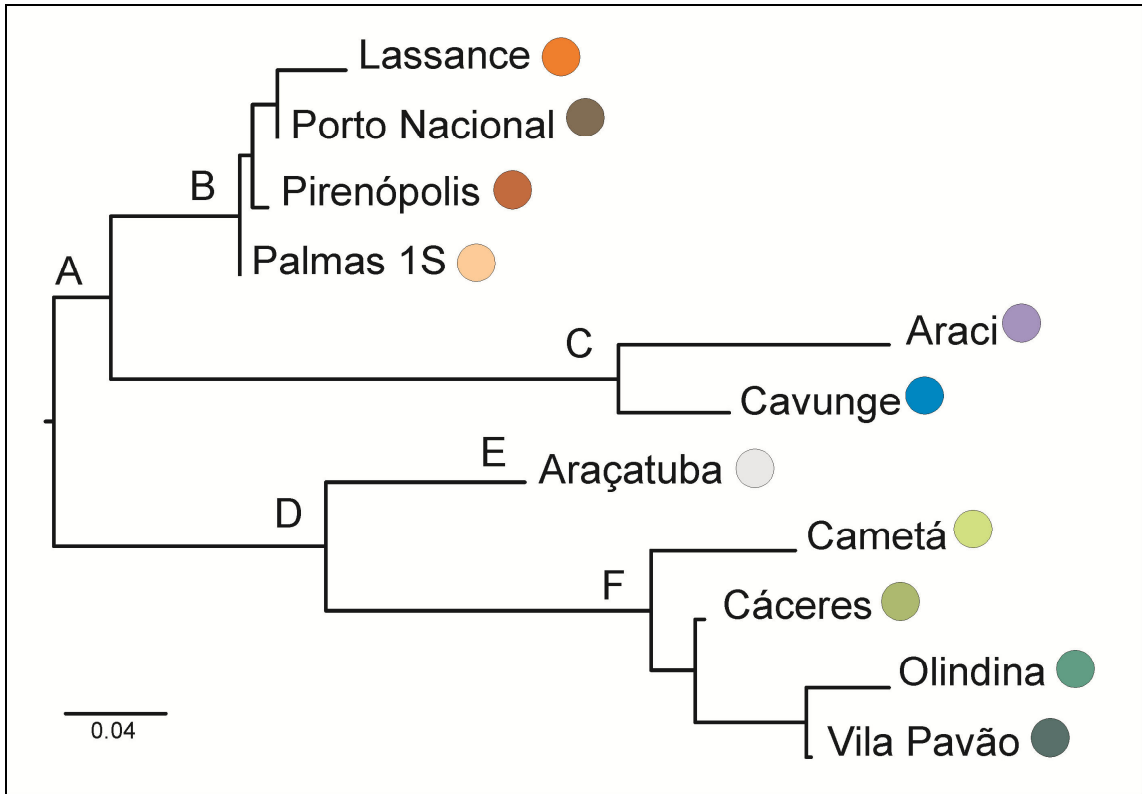
Pal2S08 .A.....CGT...C...A.....T.T.....C.....T.....A..A...  
 Pal2S10A .A.....CG...C.C.A.....T.T.....C.....C.C.T.....A...  
 Pal2S10B .A.....CG...C...A.....A.....T.T.....C.....T.....A...  
 Pal2S11A .A.....CG...C...A.....T.T.....C.....A...C...T.....A...  
 Pal2S11B .A.....CG...C...A...T.....C.....TT.....C.....T.....A...  
 Pal2S12A .A.....CGT...C...A.A.....T.T.....C.....T.....T.....A...  
 Pal2S12B .A.....CG...C...A.....T.T.....C.....C.C.T.....A..A...  
 Pan03 .A.....CG...C...A.....T.T.....C.....G.....T.....A...  
 Pan04 .A.....CG...C...A.....T.T.....C.....G.....T.....A...  
 Pan06 .A.T...CGT...C.TA.....T.T.....C.....A.....T.....A..A...  
 Pan07 .A.....CG...C...A.....T.T.....C.....A.....T.....A..A...  
 Pan08 .A.....CG...C...A.....T.T.....C.....A.....T.....A..A...  
 Pan09 .A.....CG...C...A.....T.T.....C.....A.....T.....A...  
 Panl0 .A.....CG...C...A.....A.....T.T.....C.....T.....A...  
 Panl1 .A.....CG...C...A.....T.T.....C.....G.....T.....A...  
 Panl2 .A.....CG...C...A.....T.T.....C.....A.....T.....A..A...  
 Panl3 .A.....CG...C...A...T.....C.....TT.....C.....T.....TA...  
 Panl4 .A.....CG...C.C...A.....A.....T.T.....C.....A.....T.....A..A...  
 Panl5 .A.....CG...C...A.....T.T.....C.....C.T.....A..A...  
 Panl6 .A.....CG...C...A.....T.TT...C.....T.....T.....TA...  
 Panl7 .A.....CGT...C.TA.....T.T.....A..A.....T.T.....A...  
 Panl8 .A.....CG...C...A.....T.T.....C.....G.....T.....A...  
 Panl9 .A.....CG...C...A.....T.T.....C.....G.....T.....A...  
 Pan20 .A.....CG...C...A.....T.T.....C.....A.....T.....A..A...  
 Pan21 .A.....CG...C.C.A.....T.T.....C.....G.....T.....TA...  
 Pan22 .A.....CGT...C.TA.....T.T.....C.....A.....T.....A..A...  
 Pans01 .A.....CGT...C...A.....T.T.....C.....A.....T.....A...  
 Pans02A .A.....CG...C...A.....T.T.....C.....A.....T.T.....A...  
 Pans02B .A.....CG.C...C...A.....T.T.....C.....A.....T.T.....A...  
 Pans03 .A.....CG...C...A.....T.T.....C.....A.....T.....A..A...  
 Pans04A .A.....CG...C...A.....T.T.....C.....A.....T.....A..A...  
 Pans04B .A.....CGT...C...A.....T.T.....C.....A.....T.....A..A...  
 Pans05A .A.....CG...C.TA.....T.T.....C.....A.....T.....A..A...  
 Pans05B .A.....CG.C...C...A.....T.T.....C.....A.....T.....A...  
 PAss07 .A.....CG...C...A.....T.T...C...C...T.....A...  
 PAss01 .A.....CGT...C.TA.T.T.....T.T.....C...A..A...C.C.T...T...A..A...  
 PAss02 .A.....CGT...C.TA.....T.T.....C.....A.....T...T...A...  
 PAss03 .A.....CGT...C...A.....T.T.....C.....C...T.....A..A...  
 PAss04 .A.....CG...C...A.....T.T.....C.....A...C.C.T.....A...  
 PAss05A .A.....CG...C...A.....T.T.....C.....A.....A..A...  
 PAss05B .A.....CG...C...A.....T.T.....C.....A.....T.....A..A...  
 PAss06A .A.....CG...C...A...T.....T.T.....C.....C...T.....A...  
 PAss06B .A.....CGT...C...A.....T.T.....C.....T.....A...  
 PIRper01a .A.....CG...A...A...T.....T.....C.....A.....A...  
 PIRper01b .A.....CG...A...A...T.....T.....C.....A.....A...C...  
 PIRper02h .A.....CG...A...A.....T.....C.....G.....C.....A...  
 PIRper03b .A.....CG.....T.....G.....A.....A...  
 PIRper04a .A..C..CG...C...A.....T.....C.....A.....A...  
 PIRper04b .A.....CG...C...A.....T.....C.....A.....A...  
 PIRper05a TA.....CG.....A.....T.....T.....C.....T.....A...  
 PIRper05b .A.....CG...C...A.....T.....C.....A...A.....T.....A...C...  
 PIRper06a .A.....CG...C...A.....TT...C.....A.....A...  
 PIRper06b .A.....CG.....T.....G.....A.....A...  
 PIRper07a .A.....CGT.A...A.....T.....C.....A.....T.CT...A...  
 PIRper07b .A.....CG...A...A.....T.....C.....A.....T.....A...  
 PIRper08a .A.....CGT.A...A.....T.....T.....G.....T.....A...C...  
 PIRper08b .A.....CG...C...A.....T.....C.....A.....T.....A...  
 PIRper09a TA.....CG...A.....TT...C.....A.....T.....A...  
 PIRper09b .A.....CG...C...A.....TT...C.....A.....A...  
 PIRper10a TA.....CGT.A...A.....TT...C.....A.....A...  
 PIRper10b .A.....CG...A...A.....T.....C.....A.....A...  
 PIRper11a .AT...CGT.A...A.....T.....C...A...A...T.....A...C...  
 PIRper11b .A.....CG...C...A.....T.....C.....A.....A.....T.....A...  
 PIRper12a .A.....CGT.A...A.....T.....C.....G...T.....A...  
 PIRper12b .A.....CG...C...A.....T.....C.....A.....A...  
 PIRper13a TA.....CG...A.....TT...C.....A...A...T.....A...  
 PIRper13b .A.....CGT.A...A.....T.....T.....G...T.....A...C...  
 PNAper01a TA.....CG...A.....A.....A.....T.....A...  
 PNAper01b .A.....CG...C...A.....T.....C.....A.....A...  
 PNAper02a .A.....CG...C...A.....T.....G.....A.....A...  
 PNAper02b .A.....CG...C...A.....T.....C.....C.....A...  
 PNAper03h .A.....CG...C...A.....T.....C.....T.....A...  
 PNAper04a .A.....CG...C...A.....T.....C.....T.....A...  
 PNAper04b .A.....CG...A...A...C.....T.....C.....A.....T.....A...  
 PNAper05a .A.....CG...C...A.....TT...C.....A.....A...  
 PNAper05b .A.....CG...C...A.....T.....C.....CT...A...C...  
 PNAper06h .AT...CG...A...A.....T.....C.....A.....A...C...  
 PNAper07a .A.....CGT.A...A.....T.....C.....A.....T.CT...A...  
 PNAper07b .A.....CG...C...A.....T.....T.....T.....A...  
 PNAper08a .A.....CG...A.....C.....G.....A...

```

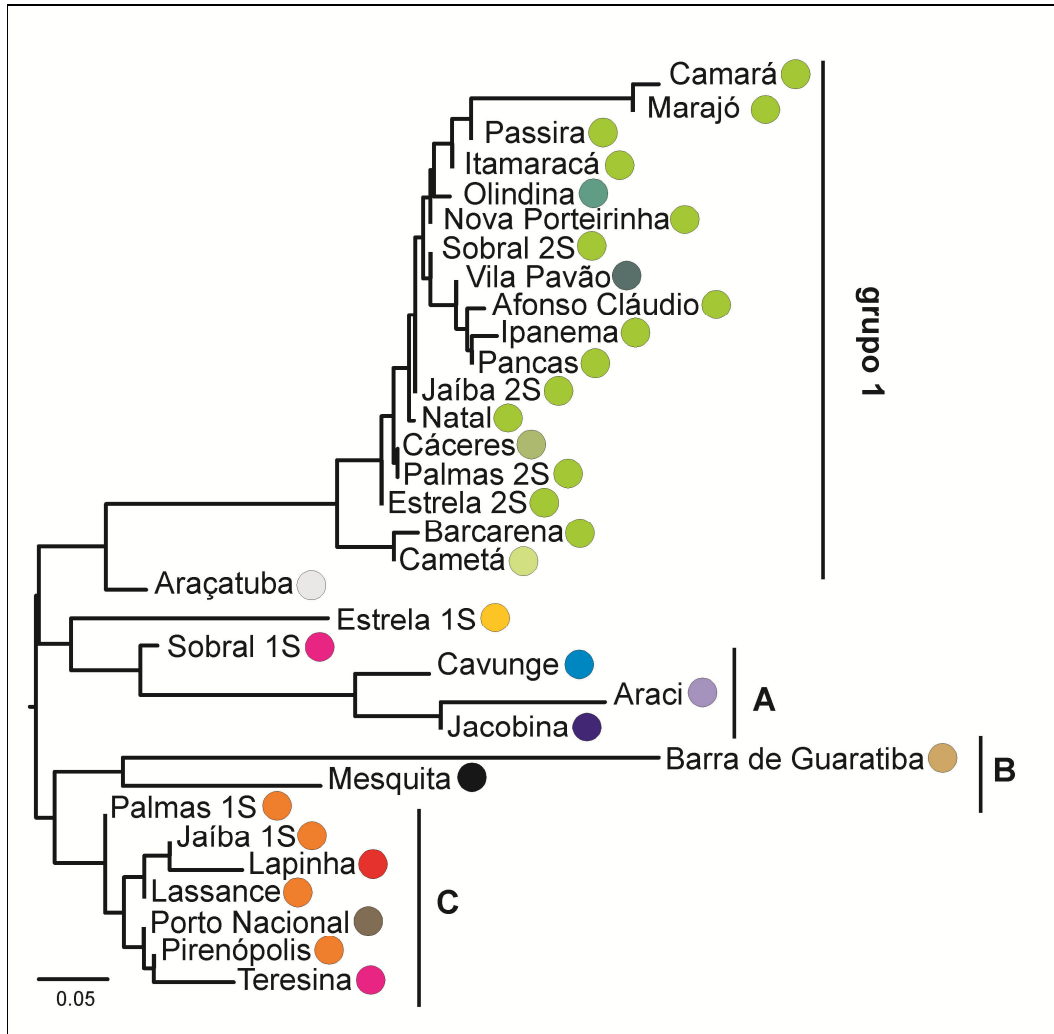
PNAper08b .A.....OGT...C...A.....C.....T.....A.....
PNAper09a .A.....OGT.....A.....C.....A.....
PNAper09b .A.....CG.....A...A.....T.....C.....A.....
PNAper10a TA.....CG.....A.....C.....C.....A.....
PNAper10b .A.....CG.....A.....TT.....C.....A.....
PNAper12a .A.....CG...C...A.....A.....C.....A.....
PNAper12b .A.....CG...G...A.....C.....A.....
PNAper14a TA.....CG..A.....TT.....C.....A...T.....A.....
PNAper14b .A.....CG.....A.....C.....A.....
PNAper15a .A.....CG..A...A.....T.....A.....T.....A.....
PNAper15b TA.....CG.....A.....C.....T.....T.....A.....
PNAper16h TA.....C...C.....T.A.T.....C.....A.....
PNAper17a .A.....OG.....T.....G.....A.....A.....C
PNAper17b .A.....OG.....A.....T.....C.....T.....A.....
PNAper18h TA.....CG..A.....TT.....C.....A...T.....A.....
TerlS01 .A.....CG.....A.....T.....A.....
TerlS02 .A.....CG..A...A.....T.....C.T.....A.....C
TerlS03 .A.....OGT.A...A.....T.....C.....A.....
TerlS04 .A.....CG.....A.....T.....C.....A.....
TerlS05 .A.....CG.....A.....T.....T.....A.....
TerlS06 .A.....CG.....A.....TT.....C.....A.....
TerlS07 .A.....OGT.....A.....G.....A.....
TerlS08 .A.....CG.....A.....T.....A.....
TerlS09 .A.....OG.....A.....T.....C.....G...T.....A.....C
TerlS10 .A.....OGT.....A.....G.....C.....A.....
TerlS11 .A.....OG.....A.....T.....C.....T.....A.....
TerlS12 .A.....CG.....A.....TT.....C.....A.....
TerlSs01A .A.....CG.....A.....TT.....C.....A.....
TerlSs01B .A.....OGT.A...A.....T.....C.A.....A.....
TerlSs02 .A.....CG.....A.....TT.....C.....A.....
TerlSs03 .A.....CG..A...A.....TT.....C.....A.....
TerlSs06 .A.....CG.....A.....TT.....C.....A.....
TerlSs07 .A.....CG..A...A.....TT.....C.....A.....
VPAper01a .A.....CG...C...A.....A.....T.T.....C.....T.....A.....
VPAper01b .A.....CG...C...A...T.....C.....TT.....C.....A.....
VPAper02h .A.....CG...C...A.....T.T.....C.....A.....T.....A...A...
VPAper03a .A.....CG...C...A.....T.T.....C.....G...T.....A.....
VPAper03b .A..C...CG...C...TA.....TT.....C.....C.....T.....A.....
VPAper04h .A.....CG...C...A.....T.T.....C.....A.....T.....A...A...
VPAper05h .A.....CG...C...A.....T.T.....C.....A.....T.....A...A...
VPAper06a .A.....CG...C...A.....A.....T.T.....C.....A.....
VPAper06b .A.....CG...C.C...A.....A.....T.T.....C.....A.....T.....A...A...
VPAper08h .A.....CG...C...A.....T.T.....C.....A.....T.....A...A...
VPAper09h .A.....OGT...C...TA.....T.T.....C.....A.....T.....A...A...
VPAper10a .A.....CG.C.C...A.....T.T.....C.....A.....T.....A...
VPAper10b .A..C...CG...C...TA.....T.T.....C.....A.....T.T.....A...
VPAper11h .A.....CG...C...A...T.....C.....TT.....C.....A.....
VPAper12h .A.....OGT...C...A.....T.T.....C.....A.....T.....A...
VPAper13a .A.....CG...C.C...A.....A.....T.T.....C.....A.....T.....A...A...
VPAper13b .A.....CG...C...A.....A.....T.T.....C.....A.....T.C.....A...A...

```

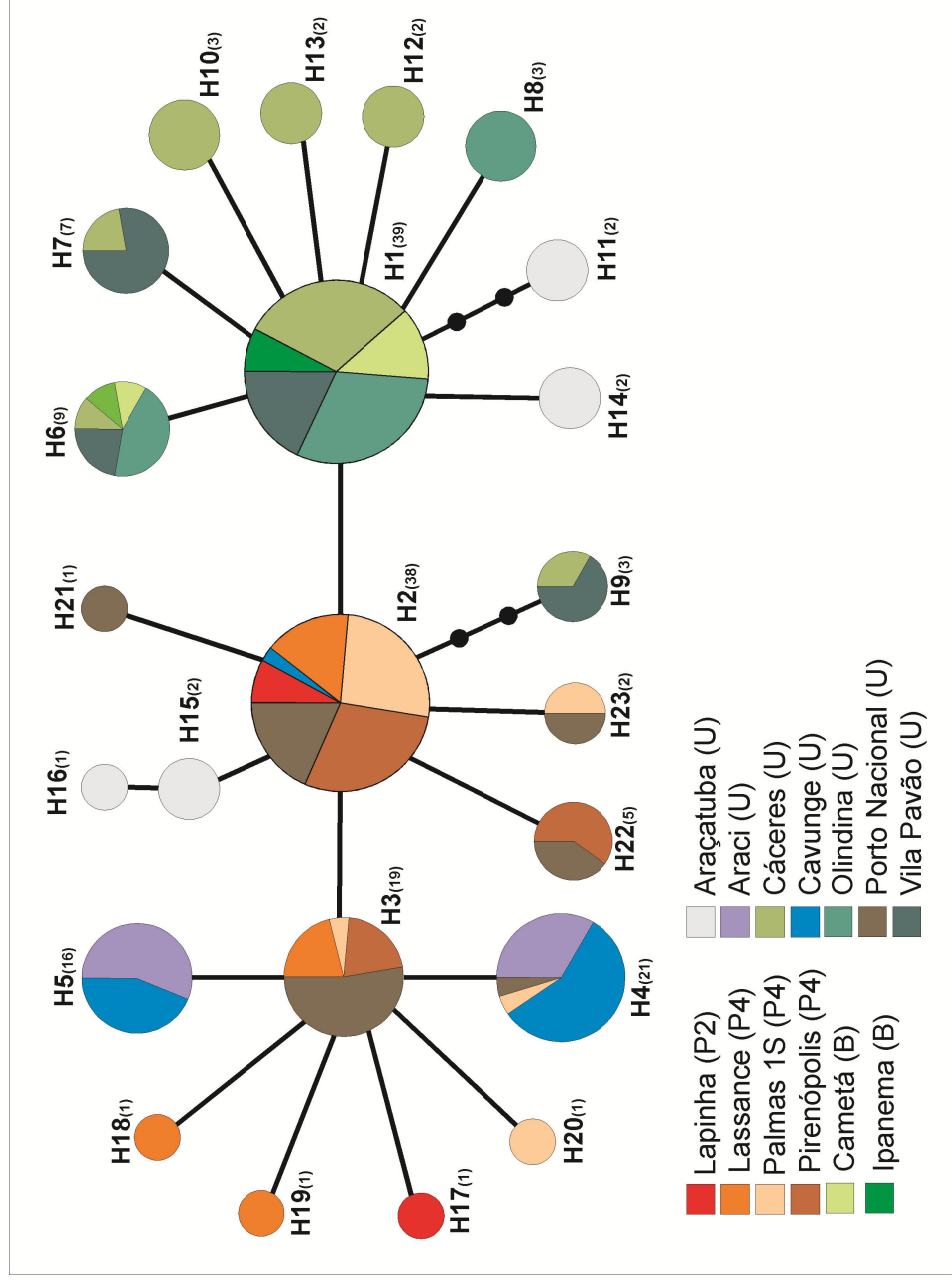
**Figura 6.2.3** Alinhamento dos sítios variáveis nas sequências do fragmento do gene *period* de 266 pb para 33 populações brasileiras de *Lu. longipalpis*. Os pontos indicam nucleotídeos iguais à primeira sequência alinhada. No cabeçalho mostramos as posições dos sítios e os sítios que apresentaram somente mutações sinônimas (S) e os que apresentaram mutações não-sinônimas (N). O nome de cada população foi abreviado como a seguir: 1S = Sobral 1 pinta (1S); 2S = Sobral 2 pintas (2S); AfC= Afonso Cláudio; ART = Araçatuba; ACI = Araci; BARC = Barcarena; BG = Barra de Guaratiba; CAC = Cáceres; CMR = Camará; CMT = Cametá; CVG = Cavunge; Est1S = Estrela 1S; Est2S = Estrela 2S; IPA = Ipanema; ITM = Itamaracá; Jac = Jacobina; Jai1S = Jaíba 1S; Jai2S = Jaíba 2S; LAP = Lapinha; LAS = Lassance; Mar = Marajó; Mes = Mesquita; Nat = Natal; NPO = Nova Porteirinha; OLI = Olindina; Pal1S = Palmas 1S; Pal 2S = Palmas 2S; Pan = Pancas; PAS = Passira; PIR = Pirenópolis; PNA = Porto Nacional; Ter1S = Teresina 1S; e VPA = Vila Pavão.



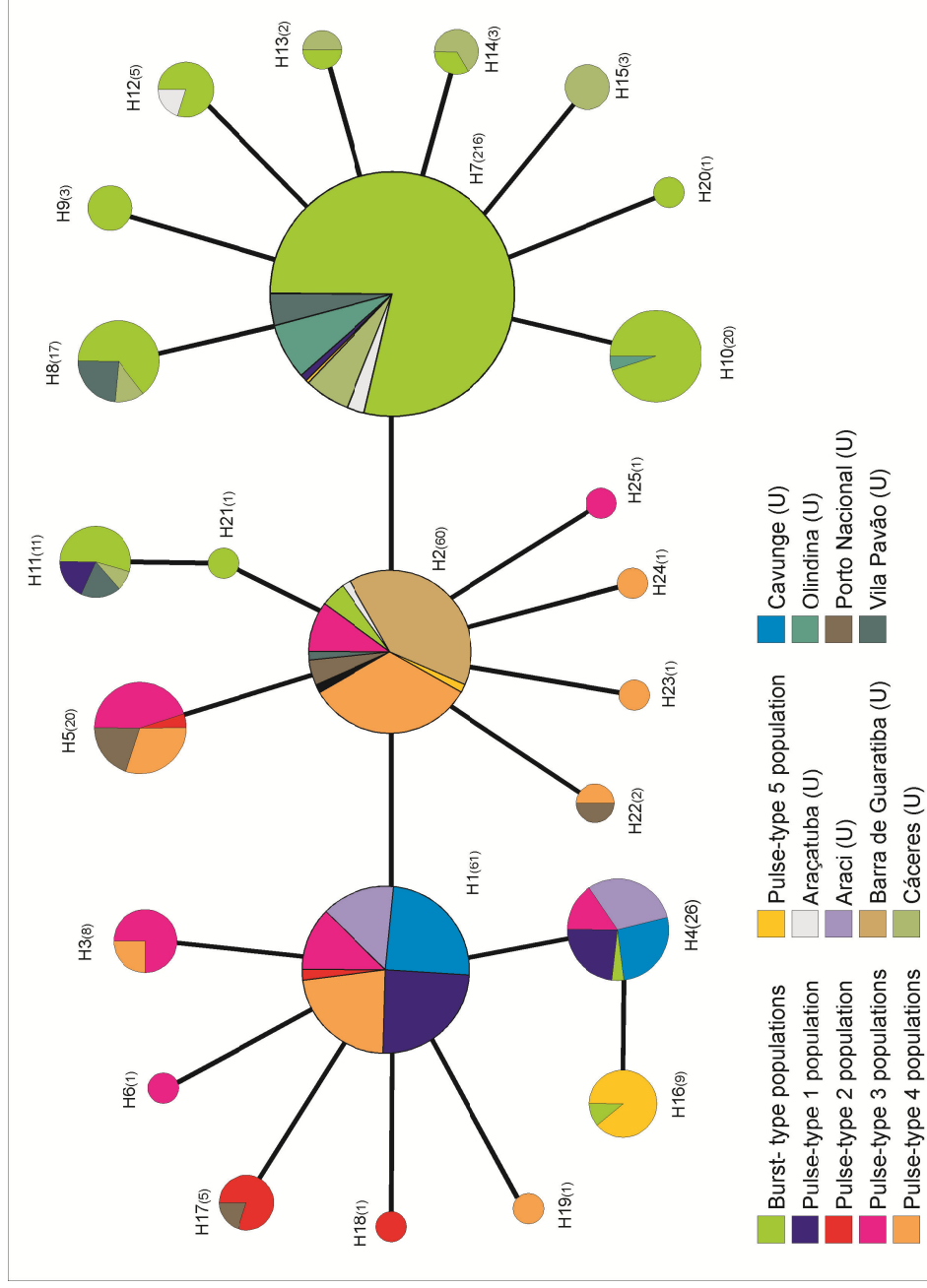
**Figura 6.2.4.** Árvore de agrupamento de vizinhos utilizando os valores de  $F_{ST}$  da matriz da Tabela 6.2.2 obtidos a partir do fragmento de 446 do gene *period* para as onze novas populações brasileiras de *Lu. longipalpis* analisadas .



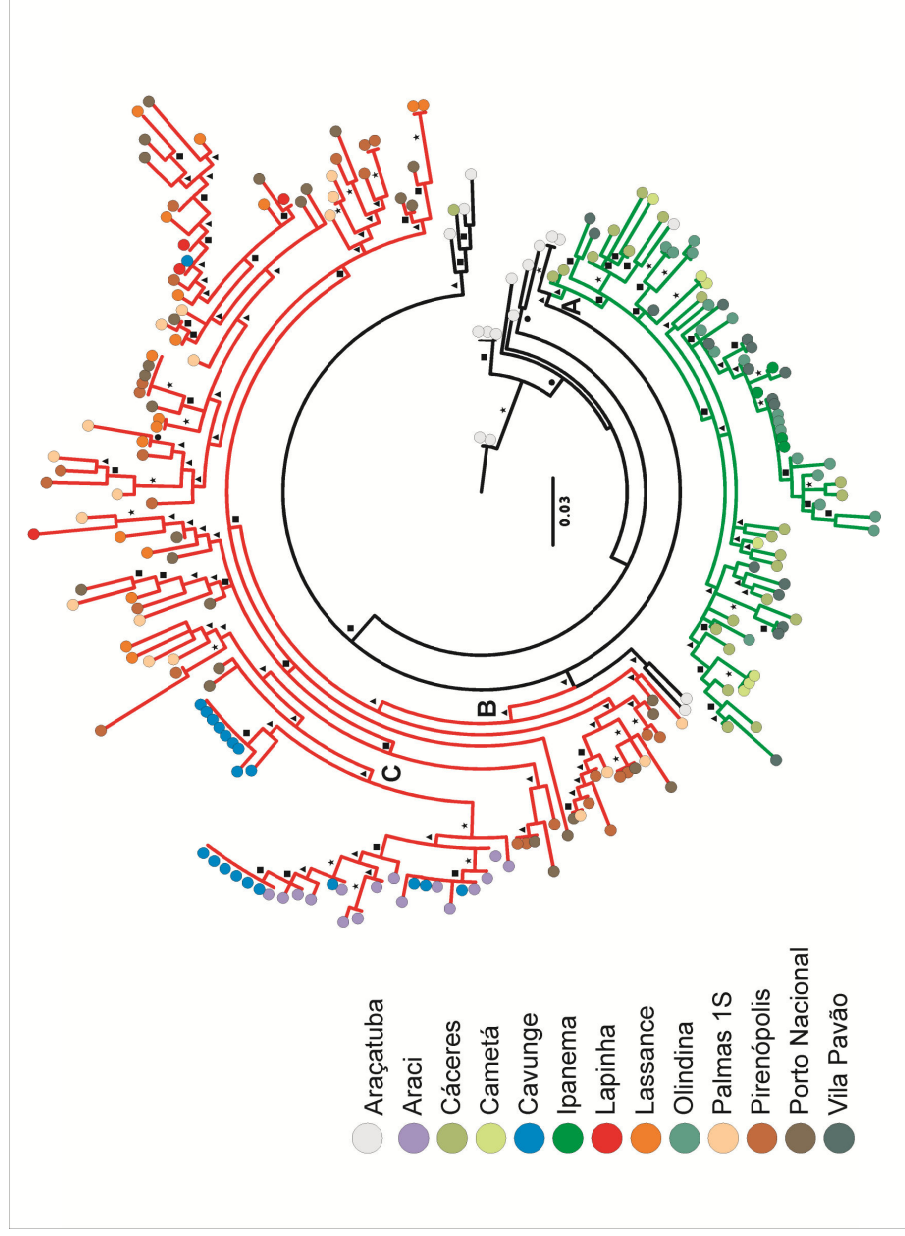
**Figura 6.2.5.** Árvore de agrupamento de vizinhos utilizando os valores de  $F_{ST}$  da matriz da Tabela 6.2.4 obtidos a partir do fragmento de 266 do gene *period* para 33 populações brasileiras de *Lu. longipalpis*.



**Figura 6.2.6** Rede de haplótipos obtida pelo programa TCS 1.21 utilizando 95% de confiança estatística a partir de um bloco não-recombinante de 58 pb para as onze novas populações brasileiras de *Lu. longipalpis*. Cada população é representada por uma cor, cada círculo representa um único haplótipo (Tabela 6.2.6) e o número de seqüências representada em cada círculo é mostrado entre parênteses.



**Figura 6.2.7** Rede de haplótipos obtida pelo programa TCS 1.21 utilizando 95% de confiança estatística a partir de um bloco não-recombinante de 66 pb para 33 populações brasileiras de *Lu. longipalpis*. Cada círculo representa um único haplótipo (Tabela 6.2.7) e o número de seqüências representada em cada círculo é mostrado entre parênteses.



**Figura 6.2.8.** Árvore das onze novas populações brasileiras de *Lu. longipalpis* analisadas, construída utilizando o fragmento inteiro de 446 pb do gene *period* e o critério de otimização de máxima verossimilhança no programa PhyML 3.0. Os ramos verdes indicam populações pertencentes ou potencialmente pertencentes à espécie com som de cópula do tipo *burst* e os ramos em vermelhos indicam populações pertencentes ou potencialmente pertencentes às espécies com som de cópula do tipo pulsado. Símbolos representam valores de suporte dos ramos: círculos 50% < suporte < 80%; triângulos 70% < suporte < 80%; quadrados: 80% < suporte < 90%; e asteriscos suporte > 90%.



**Tabela 6.2.1.** Populações brasileiras de *Lutzomyia longipalpis* analisadas para o gene *period* indicando para cada uma o tipo de som de cópula dos machos (1S = 1 pinta; 2S = 2 pintas; P1 = pulsado 1; P2 = pulsado 2; P3 = pulsado 3; P4 = pulsado 4; P5 = pulsado 5).

População	Estado	Analisadas por:
<u>Populações que apresentam som de cópula do tipo <i>burst</i></u>		
Afonso Cláudio	Espírito Santo	Bauzer <i>et al.</i> (em preparação)
Barcarena	Pará	Bauzer <i>et al.</i> (em preparação)
Camará	Pará	Bauzer <i>et al.</i> (em preparação)
Cametá	Pará	este trabalho
Estrela 2S	Alagoas	Araki <i>et al.</i> 2009
Ipanema	Minas Gerais	Bauzer <i>et al.</i> (em preparação)
Itamaracá	Pernambuco	Bauzer <i>et al.</i> (em preparação)
Jaíba 2S	Minas Gerais	Araki <i>et al.</i> 2009
Marajó	Pará	Souza <i>et al.</i> 2004
Natal	Rio Grande do Norte	Bauzer <i>et al.</i> 2002a
Nova Porteirinha	Minas Gerais	Bauzer <i>et al.</i> (em preparação)
Palmas 2S	Tocantins	Bauzer <i>et al.</i> (em preparação)
Pancas	Espírito Santo	Araki <i>et al.</i> 2009
Passira	Pernambuco	Bauzer <i>et al.</i> (em preparação)
Sobral 2S	Ceará	Bauzer <i>et al.</i> 2002b
<u>População com som de cópula do tipo misto</u>		
Mesquita	Rio de Janeiro	Araki <i>et al.</i> 2009
<u>Populações com som de cópula do tipo pulsado</u>		
Estrela 1S (P5)	Alagoas	Araki <i>et al.</i> 2009
Jacobina (P1)	Bahia	Bauzer <i>et al.</i> 2002a
Jaíba 1S (P4)	Minas Gerais	Araki <i>et al.</i> 2009
Lapinha (P2)	Minas Gerais	Bauzer <i>et al.</i> 2002a
Lassance (P4)	Minas Gerais	este trabalho
Palmas 1S (P4)	Tocantins	este trabalho
Pirenópolis (P4)	Goiás	este trabalho
Sobral 1S (P3)	Ceará	Bauzer <i>et al.</i> 2002b
Teresina 1S (P3)	Piauí	Araki <i>et al.</i> 2009
<u>Populações em que o som de cópula não foi gravado</u>		
Araçatuba 2S	São Paulo	este trabalho
Araci	Bahia	este trabalho
Barra de Guaratiba	Rio de Janeiro	Araki <i>et al.</i> 2009
Cáceres	Mato Grosso	este trabalho
Cavunge	Bahia	este trabalho
Olindina	Bahia	este trabalho
Porto Nacional	Tocantins	este trabalho
Vila Pavão	Espírito Santo	este trabalho

**Tabela 6.2.2.** Sumário de polimorfismos de um fragmento de 466 pb do gene *period* para onze populações brasileira de *Lu. longipalpis*.

População	$n_i$	$n_s$	$n_h$	S	$\pi$	$\theta$	$D_T$	$F_s$
<b>Araçatuba</b>	10	15	12	37	0.0254 (0.01294)	0.0255 (0.00999)	-0.09544	-0.12085
<b>Araci</b>	10	16	15	18	0.0125 (0.00614)	0.0122 (0.00507)	0.10442	-0.01380
<b>Cáceres</b>	14	23	23	37	0.0184 (0.01110)	0.0225 (0.00808)	-0.69325	-0.58376
<b>Cametá</b>	5	7	4	19	0.0199 (0.00972)	0.0174 (0.00854)	0.58953	0.61226
<b>Cavunge</b>	12	20	7	21	0.0136 (0.00660)	0.0133 (0.00522)	0.09617	-0.75736
<b>Lassance</b>	11	17	15	36	0.0237 (0.01200)	0.0239 (0.00913)	-0.03468	0.02641
<b>Olindina</b>	11	19	15	27	0.0165 (0.00864)	0.0173 (0.00666)	-0.17587	-0.36314
<b>Palmas 1S</b>	12	18	18	45	0.0261 (0.01468)	0.0293 (0.01089)	-0.44604	-0.76728
<b>Pirenópolis</b>	13	25	21	42	0.0255 (0.01227)	0.0249 (0.00873)	0.08820	0.34738
<b>Porto Nacional</b>	16	28	27	41	0.0228 (0.01156)	0.0236 (0.00812)	-0.13179	-0.44885
<b>Vila Pavão</b>	12	17	14	29	0.0168 (0.00967)	0.0192 (0.00750)	-0.52828	-0.45278

$n_i$ , número de indivíduos;  $n_s$ , número de sequências das amostras (see Material e Métodos para detalhes);  $n_h$ , número de haplótipos; S, número de sítios polimórficos;  $\pi$ , número médio de diferenças par-a-par;  $\theta$ , parâmetro neutro baseado no número de sítios segregantes. Variâncias dos valores de  $\pi$  e  $\theta$  são mostrados em parênteses;  $D_T$ , D de Tajima;  $F_s$ ,  $F_s$  de Fu; Todos os testes de  $D_T$  e  $F_s$  foram não-significativos ( $p > 0.10$ ).

**Tabela 6.2.3.** Valores de  $F_{ST}$  para onze populações brasileiras do complexo *Lutzomyia longipalpis* usando um fragmento de 446 pb do gene *period*.

	ART	ACI	CAC	CMT	CVG	LAS	OLI	P1S	PIR	PNA
Araci (ACI)	0.4973***									
Cáceres (CAC)	0.2208***	0.6064***								
Cametá (CMT)	0.2484 <sup>ns</sup>	0.6165 <sup>ns</sup>	0.0798 <sup>ns</sup>							
Cavunge (CVG)	0.4616**	0.1523*	0.5503***	0.5608*						
Lassance (LAS)	0.3254**	0.3968**	0.3900***	0.4306 <sup>ns</sup>	0.3046***					
Olindina (OLI)	0.3012***	0.6627***	0.0804*	0.1515 <sup>ns</sup>	0.6121***	0.4530***				
Palmas 1S (P1S)	0.2242***	0.3860**	0.2953***	0.3472 <sup>ns</sup>	0.3102***	0.0337 <sup>ns</sup>	0.3751***			
Pirenópolis (PIR)	0.2618***	0.3941***	0.3311***	0.3705*	0.3236***	0.0470*	0.4069***	0.0000 <sup>ns</sup>		
Porto Nacional (PNA)	0.2743***	0.3629***	0.3523***	0.3943**	0.2686***	0.0168 <sup>ns</sup>	0.4352***	0.0037 <sup>ns</sup>	0.0026 <sup>ns</sup>	
Vila Pavão (VPA)	0.2668***	0.6456**	0.0523*	0.1128 <sup>ns</sup>	0.5905***	0.4273**	0.0355 <sup>ns</sup>	0.3420***	0.3762***	0.4030***

A significância dos valores de  $F_{ST}$  foi avaliada por meio de 1000 permutações randômicas (\* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ , ns (não-significante) =  $p > 0.05$ )

**Tabela 6.2.4.** Valores de  $F_{ST}$  para 33 populações brasileiras do complexo *Lutzomyia longipalpis* usando um fragmento de 266 pb do gene *period.*

Songs	Burst-type												
	AFC	BAR	CMR	CMT	E2S	IPA	ITM	J2S	MAR	NAT	NPO	P2S	PAN
<b>AFC</b>	0.1610**												
<b>BAR</b>	0.1662**	0.1863*											
<b>CMR</b>	0.1209*	0.0000 <sup>ns</sup>	0.1978*										
<b>CMT</b>	0.0576**	0.0838**	0.1724***	0.0655 <sup>ns</sup>									
<b>E2S</b>	0.0390 <sup>ns</sup>	0.2302***	0.1801**	0.0466*									
<b>IPA</b>	0.0638*	0.1296**	0.1354*	0.0274 <sup>ns</sup>	0.0669*								
<b>ITM</b>	0.0380 <sup>ns</sup>	0.0924*	0.1688***	0.0562 <sup>ns</sup>	0.0000 <sup>ns</sup>	0.0433 <sup>ns</sup>							
<b>J2S</b>	0.0930 <sup>ns</sup>	0.2202*	0.0015 <sup>ns</sup>	0.1778 <sup>ns</sup>	0.1644**	0.1802**	0.0012 <sup>ns</sup>	0.1241 <sup>ns</sup>					
<b>MAR</b>	0.0804**	0.1196***	0.2020***	0.1024*	0.0031 <sup>ns</sup>	0.0665**	0.0353 <sup>ns</sup>	0.0000 <sup>ns</sup>	0.1795***				
<b>NAT</b>	0.0413*	0.1096**	0.1713***	0.0648 <sup>ns</sup>	0.0124 <sup>ns</sup>	0.0456*	0.0001 <sup>ns</sup>	0.0000 <sup>ns</sup>	0.1202*	0.0000 <sup>ns</sup>			
<b>NPO</b>	0.1036***	0.0799*	0.1682**	0.0668 <sup>ns</sup>	0.0000 <sup>ns</sup>	0.0780*	0.0273 <sup>ns</sup>	0.0057 <sup>ns</sup>	0.1720*	0.0114 <sup>ns</sup>	0.0241 <sup>ns</sup>		
<b>P2S</b>	0.0062 <sup>ns</sup>	0.1724***	0.1728**	0.1414**	0.0409*	0.0138 <sup>ns</sup>	0.0469 <sup>ns</sup>	0.0291 <sup>ns</sup>	0.1422*	0.0407**	0.0289 <sup>ns</sup>	0.0625*	
<b>PAN</b>	0.0514 <sup>ns</sup>	0.1285*	0.1392*	0.0745 <sup>ns</sup>	0.0280 <sup>ns</sup>	0.0754*	0.0000 <sup>ns</sup>	0.0000 <sup>ns</sup>	0.0556 <sup>ns</sup>	0.0397 <sup>ns</sup>	0.0000 <sup>ns</sup>	0.0215 <sup>ns</sup>	0.0567 <sup>ns</sup>
<b>PAS</b>	0.0177 <sup>ns</sup>	0.1274***	0.1818***	0.0876*	0.0111 <sup>ns</sup>	0.0390*	0.0028 <sup>ns</sup>	0.0000 <sup>ns</sup>	0.1160**	0.0000 <sup>ns</sup>	0.0000 <sup>ns</sup>	0.0363*	0.0193 <sup>ns</sup>
<b>S2S</b>	0.4961***	0.4837***	0.5455***	0.4503**	0.3996***	0.5776***	0.4372***	0.4620***	0.5461*	0.4854***	0.4660***	0.4321***	0.5134***
<b>MES</b>	0.5190***	0.4932***	0.5680***	0.4682***	0.4280***	0.5594***	0.4784***	0.4882***	0.5437***	0.5097***	0.4921***	0.4701***	0.5288***
<b>E1S</b>	0.3821***	0.3936***	0.4414***	0.3712***	0.3145***	0.4471***	0.3531***	0.3723***	0.4119***	0.3930***	0.3702***	0.3623***	0.4044***
<b>JAC</b>	0.5386***	0.5116***	0.5850***	0.4837***	0.4522***	0.5857***	0.4896***	0.5104***	0.5549***	0.5240***	0.5102***	0.4867***	0.5484***
<b>LAP</b>	0.4455***	0.4517***	0.5227***	0.4198***	0.3864***	0.5151***	0.4206***	0.4404***	0.4843***	0.4638***	0.4349***	0.4252	0.4706***
<b>LAS</b>	0.3671***	0.3920***	0.4396***	0.3740***	0.2788***	0.4111***	0.3375***	0.3522***	0.4105***	0.3522***	0.3423***	0.3349***	0.3656***
<b>P1S</b>	0.3365***	0.3288***	0.3761***	0.3171***	0.2540***	0.3923***	0.2968***	0.3176***	0.3644***	0.3335***	0.3232***	0.2916***	0.3494***
<b>PIR</b>	0.3827***	0.3617***	0.4425***	0.3424***	0.2956***	0.4405***	0.3424***	0.3596***	0.4213***	0.3755***	0.3622***	0.3305***	0.3955***
<b>S1S</b>	0.4251***	0.3777***	0.4741***	0.3572***	0.3226***	0.4736***	0.3795***	0.3908***	0.4636***	0.4055***	0.3937***	0.3627***	0.4357***
<b>TER</b>	0.4702***	0.4219***	0.5325***	0.3891***	0.3705***	0.5380***	0.4126***	0.4351***	0.5043***	0.4596***	0.4380***	0.4011***	0.4874***
<b>ART</b>	0.3019***	0.2281***	0.3402***	0.2138***	0.2029***	0.3511***	0.2542***	0.2600***	0.3458***	0.2795***	0.2749***	0.2318***	0.3046***
<b>CAC</b>	0.1204***	0.1016***	0.1913***	0.0736*	0.0188 <sup>ns</sup>	0.1171***	0.0084 <sup>ns</sup>	0.0000 <sup>ns</sup>	0.1674**	0.0126 <sup>ns</sup>	0.0178 <sup>ns</sup>	0.0000 <sup>ns</sup>	0.0815***
<b>OLI</b>	0.0630*	0.1834***	0.2269***	0.1150*	0.0394*	0.0325 <sup>ns</sup>	0.0000 <sup>ns</sup>	0.0119 <sup>ns</sup>	0.1687*	0.0415 <sup>ns</sup>	0.0050 <sup>ns</sup>	0.0497 <sup>ns</sup>	0.0290 <sup>ns</sup>
<b>VPA</b>	0.0138 <sup>ns</sup>	0.1300**	0.1634**	0.1062*	0.0223 <sup>ns</sup>	0.0133 <sup>ns</sup>	0.0546 <sup>ns</sup>	0.0000 <sup>ns</sup>	0.1276**	0.0163 <sup>ns</sup>	0.0069 <sup>ns</sup>	0.0213 <sup>ns</sup>	0.0015 <sup>ns</sup>
<b>Mixed</b>	0.7318***	0.7253***	0.7678***	0.6790***	0.6931***	0.8361***	0.6716***	0.7177***	0.7100***	0.7483***	0.7152***	0.7028***	0.7876***
<b>Putative songs</b>	0.7025***	0.6939***	0.7525***	0.6583***	0.6338***	0.7616***	0.6560***	0.6830***	0.7081***	0.7013***	0.6833***	0.6749***	0.7224***
<b>Pulse</b>	0.5831***	0.5583***	0.6395***	0.5267***	0.5023***	0.6421***	0.5392***	0.5609***	0.6070***	0.8788***	0.5617***	0.5407***	0.6010***
<b>Unrecorded</b>	0.3998***	0.3678***	0.4630***	0.3484***	0.2974***	0.4525***	0.3528***	0.3639***	0.4470***	0.3770***	0.3682***	0.3309***	0.4061***

Tabela 6.2.4. (continuação)

Songs		Pulse-type [-----]										
		Burst-type	Mixed-type	E1S	J1S	JAC	LAP	LAS	P1S	PIR	S1S	TER
		PAS	MES									
[-----Burst-type-----]		AFC										
		BAR										
		CMR										
		CMT										
		E2S										
		IPA										
		ITM										
		J2S										
		MAR										
		NAT										
		NPO										
		P2S										
		PAN										
		PAS										
		S2S	0.0000 <sup>ns</sup>									
Mixed-type		MES	0.4679***	0.4637***								
[-----Pulse-type-----]		E1S	0.4832***	0.4946***	0.4420***							
		J1S	0.3752***	0.3650***	0.1990**	0.3396***						
		JAC	0.5107***	0.5143***	0.4546***	0.4000***	0.3649***					
		LAP	0.4425***	0.4338***	0.2316*	0.4029***	0.0427 <sup>ns</sup>					
		LAS	0.3583***	0.3293***	0.1818***	0.3502***	0.0027 <sup>ns</sup>	0.0650**				
		P1S	0.3157***	0.3117***	0.1426**	0.3231***	0.0141 <sup>ns</sup>	0.1196***	0.0000 <sup>ns</sup>			
		PIR	0.3642***	0.3560***	0.1535*	0.3401***	0.0360*	0.0813***	0.0096 <sup>ns</sup>	0.0063 <sup>ns</sup>		
		S1S	0.4037***	0.3952***	0.1640*	0.2709***	0.0481*	0.1236***	0.0757***	0.0575**	0.0702***	
		TER	0.4405***	0.4380***	0.1503*	0.3782***	0.0951***	0.1719***	0.1054***	0.0664*	0.0470*	0.0660**
Burst		ART	0.2591***	0.2717***	0.2270**	0.3195***	0.1981***	0.2685***	0.1955***	0.1401***	0.1775***	0.1670***
		CAC	0.0016 <sup>ns</sup>	0.0276 <sup>ns</sup>	0.4225***	0.4656***	0.3549***	0.4665***	0.3247***	0.2930***	0.3336***	0.3963***
		OLI	0.0058 <sup>ns</sup>	0.0164 <sup>ns</sup>	0.5112***	0.5247***	0.4148***	0.5448***	0.3789***	0.3650***	0.4057***	0.4897***
		VPA	0.0577*	0.0090 <sup>ns</sup>	0.4494***	0.4806***	0.3571***	0.4980***	0.4164***	0.3063***	0.3443***	0.4182***
Mixed		BAG	0.7187***	0.7296***	0.5333**	0.6115***	0.5272***	0.6452***	0.5291***	0.4956***	0.5141***	0.5802***
Putative songs		ACI	0.6802***	0.6853***	0.6667**	0.5092***	0.5135***	0.5561***	0.5131***	0.4975***	0.5197***	0.5830***
		CVG	0.5632***	0.5643***	0.5064**	0.4286***	0.3684***	0.3855***	0.3660***	0.3586***	0.3789***	0.4337***
		PNA	0.3786***	0.3642***	0.1231*	0.3266***	0.0364*	0.0954***	0.0116 <sup>ns</sup>	0.0142 <sup>ns</sup>	0.0059 <sup>ns</sup>	0.0477*

Tabela 6.2.4. (continuação)

		ART	CAC	OLI	VPA	BAG	ACI	CVG
Songs	AFC							
	BAR							
	CMR							
	CMT							
	E2S							
	IPA							
	ITM							
	J2S							
	MAR							
	NAT							
	NPO							
	P2S							
	PAN							
	PAS							
	S2S							
	MES							
	E1S							
	J1S							
	JAC							
	LAP							
LAS								
P1S								
PIR								
S1S								
TER								
ART		0.2182***						
CAC		0.0508*						
OLI		0.3138***						
VPA		0.2687***		0.0542*				
BAG		0.6870***		0.7623***	0.6978***			
ACI		0.4463***		0.7132***	0.6750***	0.8118***		
CVG		0.3448***		0.5962***	0.5483***	0.7000***	0.2335***	
PNA		0.1557***		0.4136***	0.3494***	0.5120***	0.4869***	0.3198***
Burst								
Mixed								
Pulse								

A significância dos valores de FST foi avaliada por meio de 1000 permutações randômicas (\* = p<0.05, \*\* = p<0.01, \*\*\* = p<0.001, ns (não-significante) = p > 0.05)

**Tabela 6.2.5.** Número de sítios compartilhados (matriz superior a direita) e de sítios fixos (matriz inferior a esquerda) entre as onze novas populações brasileiras do complexo *Lutzomyia longipalpis* usando um fragmento de 446 do gene *period*.

Fixos	Compartilhados											
	ART	ACI	CAC	CMT	CVG	LAS	OLI	PIS	PIR	PNA	VPA	
Araçatuba (ART)												
Araci (ACI)	2											
Cáceres (CAC)	0	3										
Cametá (CMT)	0	7	0									
Cavunge (CVG)	2	0	2	4								
Lassance (LAS)	1	2	2	3	0							
Olindina (OLI)	0	5	0	0	2	2						
Palmas 1S (PIS)	0	2	0	1	0	0	1					
Pirenópolis (PIR)	0	2	0	1	0	0	1	0				
Porto Nacional (PNA)	0	1	0	1	0	0	1	0	0			
Vila Pavão (VPA)	0	6	0	0	3	2	0	0	0	0		

**Tabela 6.2.6.** Número de sítios exclusivos na população X (matriz superior a direita) e Y (matriz inferior a esquerda) entre as onze novas populações brasileiras do complexo *Lutzomyia longipalpis* usando um fragmento de 446 do gene *period*.

Sítios exclusivos	ART	ACI	CAC	CMT	CVG	LAS	OLI	P1S	PIR	PNA	VPA
Araçatuba (ART)		32	26	31	27	30	30	27	28	28	27
Araci (ACI)	11		14	16	5	12	14	9	8	8	15
Cáceres (CAC)	24	33		21	28	26	18	25	26	25	16
Cametá (CMT)	12	18	4		15	12	6	14	12	14	5
Cavunge (CVG)	9	8	12	16		9	15	7	6	5	15
Lassance (LAS)	27	30	25	28	24		24	9	9	10	27
Olindina (OLI)	18	23	8	13	21	15		16	14	16	12
Palmas 1S (P1S)	33	36	33	39	31	18	34		14	13	36
Pirenópolis (PIR)	31	32	31	34	27	15	29	11		9	32
Porto Nacional (PNA)	32	33	31	37	27	17	32	11	10		34
Vila Pavão (VPA)	18	27	9	15	24	21	15	21	20	21	





**Tabela 6.2.8.** Distribuição dos 25 haplótipos entre as 33 populações brasileiras analisadas, sítios segregantes para o fragmento não-recombinante de 66 pb e número de seqüências de cada haplótipo representado em cada população.

Haplótipo	Sítios segregantes	Número de seqüências representadas em cada população															Som misto
		[-----Som burst-----]	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
	1111112223334444556	AFC	BAR	CMR	CMT	E2S	IPA	ITM	J2S	MAR	NAT	NPO	P2S	PAN	PAS	S2S	MES
	123456891457904602891234251																
H1	GGCCTCAGGGACTCACCACCTTCCTAGT																
H2	.....T.....								2							1	1
H3	.....G..																
H4	.A.....					1											
H5	.....TT.....																
H6	.....T...C																
H7	.....T.T.....	11	6	11	3	20	18	7	8	3	13	17	11	23	6	13	
H8	.....A.....	1					1		2		1	1	1	2		2	
H9	.....T.T...T.....									2							1
H10	.....T.T...A.....	1	6		4	3		1	1	1		1					1
H11	.....C.....	1				1	1	1				1	1				1
H12	.....T.T.C.....					2			1								1
H13	.....T.T.....									1							
H14	A.....																
H15	.....T.T.....																
H16	.A...GC.....																
H17	.....A.....																
H18	.....G.....																
H19	.....T.....																
H20	.....T.T..C.....												1				
H21	.....C.....																
H22	.....C.....																
H23	.....C.....																
H24	.....T.....																
H25	.....T.....A...																

AFC: Afonso Cláudio, BAR: Barcarena, CMR: Cameté, E2S: Estrela 2S, IPA: Ipanema, ITM: Itamaracá, J2S: Jaíba 2S, MAR: Marajó, NAT: Natal, NPO: Nova Porteirinha, P2S: Palmas, PAS: Pancas, PAS: Passira, S2S: Sobral 2S, MES: Mesquita.

**Tabela 6.2.8. (Continuação)**

Haplótipo	Sítios segregantes	Populações não gravadas																	
		Possíveis sons							Misto [---Som pulsado---]										
		E1S	J1S	JAC	LAP	LAS	P1S	PIR	S1S	TER	ART	CAC	OLI	VPA	BAG	ACI	CVG	PNA	T
H1	1111122233334444556	1	4	12	1	4	1	3	5	1	1								61
H2	123456891457904602891234251	1	3			4	8	5	3	3	1			1	24			3	60
H3	GGCCTCACGGGACTCACCACCTTCCTAGT	1	1				1		4	2									8
H4	.....T.....G..			6					4							8	7		26
H5	.A.....TT.....				1	1		5	2	7								4	20
H6	.....T.....C								1										1
H7	.....T.....	1	2								5	13	16	9					216
H8	.....A.....											2		4				17	
H9	.....T.....T.....																	3	
H10	.....T.....A.																	20	
H11	..T.....C.....		2							1		1		2				11	
H12	.....T.....C.....									1								5	
H13	.....T.....T.....											1						2	
H14	A.....T.....T.....											2						3	
H15	..T.....T.....T.....											3						3	
H16	.A..GC.....T.....	8																9	
H17	.....A.....				4												1	5	
H18	.....G.....				1													1	
H19	.....T.....					1												1	
H20	.....T.....C.....																	1	
H21	.....C.....T.....																	1	
H22	..C.....T.....						1										1	2	
H23	.....C.....						1											1	
H24	.....T.....T.....							1										1	
H25	.....T.....A...																	1	

E1S: Estrela 1S, J1S: Jaíba 1S, JAC: Jacobina, LAP: Lapinha, LAS: Lassance, P1S: Palmas 1S, PIR: Pirenópolis, S1S: Sobral 1S, TER: Teresina, ART: Araçatuba, CAC: Cáceres, OLI: Olindina, VPA: Vila Pavão, BAG: Barra de Guaratiba, ACI: Araci, CVG: Cavunge, PNA: Porto Nacional, T: Total.

## 7. DISCUSSÃO

### 7.1 Sistemática morfológica e levantamentos de fauna de flebotomíneos

Os estudos sobre levantamento de fauna de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) são importantes para entender aspectos relacionados à ecologia desses insetos, incluindo aqueles relacionados à ecoepidemiologia de doenças causadas por parasitos por eles transmitidos, como as leishmanioses. (Killick-Kendrick 1990, Lainson & Rangel 2005, Ready 2013, 2014). Essa importância reside principalmente no fato de que os levantamentos de fauna são os mais acurados métodos de determinar a distribuição desses vetores que, por sua vez, é correlacionada com a distribuição da doença e é útil para confecção de estratégias de controle das e combate às leishmanioses (Camargo-Neves *et al.* 2002). Inclusive, a concordância entre a distribuição de uma espécie de flebotomíneo e da distribuição da doença no homem é usada para dar suporte a outras evidências em favor do papel de determinada espécie de flebotomíneo como vetor de determinada espécie de *Leishmania* (Killick-Kendrick 1990). Em última instância, contudo, a confiança tanto dos dados de levantamento de fauna como dos de distribuição das espécies de flebotomíneos é dependente de uma correta identificação das espécies em questão (Shimabukuro *et al.* 2010).

Neste estudo, realizamos um levantamento da fauna de flebotomíneos do Monumento Natural dos Pontões Capixabas – MNPC, situado no Corredor Central da Mata Atlântica, uma área endêmica para leishmanioses visceral e tegumentar e utilizamos caracteres morfológicos para identificar as espécies de flebotomíneos coletadas (Ferreira *et al.* 2013).

Epidemiologicamente, reforçamos a hipótese de transmissão peridomiciliar de *Le. infantum* na região do Corredor Central da Mata Atlântica com a participação de *Lu. longipalpis* como o principal vetor, e com *Migonemyia migonei* (França 1920) parecendo não ter um papel importante como vetor (Ferreira *et al.* 2013, Pinto *et al.* 2012a). Tomamos como base a distribuição dos potenciais vetores de *Leishmania* spp. na área estudada, cuja abundância foi maior no peridomicílio,

Ecologicamente, mostramos que a diversidade de flebotomíneos, com uma variedade de espécies, foi alta em relação a outras áreas ao longo do bioma Mata Atlântica (Marcondes *et al.* 2001, Andrade *et al.* 2005, Cortez *et al.* 2007, Virgens *et*

al. 2008, Galati *et al.* 2010a,b,c, Pinto *et al.* 2010a,b, Pinto *et al.* 2012a,b, Guimarães *et al.* 2012). Isso salienta a necessidade de conservação da região, uma vez que a Mata Atlântica é um dos maiores “hotspot” de biodiversidade do mundo (Orme *et al.* 2005).

Os resultados também foram interessantes do ponto de vista taxonômico. Sabemos que duas espécies do gênero *Pressatia* ocorrem na Mata Atlântica (Galati 2003): *Pressatia choti* (Floch & Abonnenc 1941) e *Pressatia equatorialis* (Mangabeira 1942). Mesmo apesar de terem sido encontrados machos apenas de *Pr. choti* no MNPC, identificamos as fêmeas como *Pressatia* spp. devido ao fato de que *Pr. equatorialis* tem sido registrada para outras áreas de conservação do estado do Espírito Santo (Pinto *et al.* 2010c, 2012b, Virgens *et al.* no prelo). Inclusive, para a Floresta Nacional dos Goytacazes, uma área de conservação na porção norte do estado do Espírito Santo, *Pr. choti* e *Pr. equatorialis* são encontradas em simpatria (Virgens *et al.* no prelo). Já para o gênero *Evandromyia*, as fêmeas de três espécies não podem ser diferenciadas morfológicamente [*Evandromyia callipyga* (Martins & Silva 1965), *Evandromyia costalimai* (Mangabeira 1942) e *Evandromyia tupynambai* (Mangabeira 1942)] (Galati 2003). Como machos de *Ev. callipyga* e *Ev. tupynambai* foram encontrados para o MNPC, identificamos as fêmeas dessas espécies como *Evandromyia* spp. Para o gênero *Brumptomyia*, também identificamos as fêmeas somente para o nível genérico, mesmo com uma diferenciação morfológica tendo sido proposta para fêmeas de cinco espécies do gênero que ocorrem no estado de São Paulo, incluindo as de *Brumptomyia nitzulescui* (Costa Lima 1932) e *Brumptomyia avellari* (Costa Lima 1932) (Shimabukuro *et al.* 2011). Essa identificação somente ao nível genérico foi justificada pelo fato de que a diferenciação morfológica das fêmeas de espécies desse gênero é muito sutil. Por exemplo, de acordo com a chave proposta para diferenciação das fêmeas de *Brumptomyia* registradas para o estado de São Paulo, deve ser observada para *Br. nitzulescui* uma sinuosidade curta dos ductos individuais. Além de sutil, essa diferença depende de uma boa montagem e conservação da lâmina contendo o espécime. A diferenciação somente ao nível genérico também foi justificada pelo fato de que *Brumptomyia figueiredoi* Mangabeira & Sherlock 1961, espécie também coletada no MNPC, não ocorre no estado de São Paulo (Shimabukuro *et al.* 2011). Assim, não é possível afirmar que a diferenciação morfológica entre as espécies que ocorrem neste estado sejam suficientes para diferenciar outras espécies não avaliadas e que ocorrem em outros estados. Portanto, o encontro de espécies como

essas pertencentes aos gêneros *Pressatia*, *Evandromyia* e *Brumptomyia*, cujas fêmeas não são distinguíveis morfológicamente, salientou a necessidade do uso de novas ferramentas de identificação, como as que empregam biologia molecular, para auxiliar na discriminação entre essas espécies.

Interessantemente, no levantamento para o MNPC também foi encontrada para o gênero *Sciopemyia* Barretto 1962 dois grupos de fêmeas muito similares, mas com pequenas e conspícuas diferenças morfológicas. Mas todos os machos coletados foram identificados como pertencentes à espécie *Sc. microps*. As do primeiro grupo apresentaram características morfológicas como cibário com dentes bem desenvolvidos e ductos individuais pouco mais delgados que as espermatecas que permitiram incluí-las na espécie *Sciopemyia microps* (Mangabeira 1942). Diferentemente, as do outro grupo apresentam cibário com dentes menos desenvolvidos e ductos individuais mais largos que os das do primeiro grupo e foram identificadas como *Sciopemyia affinis microps*. O termo *affinis* é taxonomicamente utilizado para uma espécie que é parecida, contudo não idêntica a espécie no binômio que é mencionado (Bengtson 1988). O gênero *Sciopemyia* é composto de oito espécies e suas fêmeas são bastante similares (Martins *et al.* 1975, Young & Arias 1984, Andrade-Filho *et al.* 2003b, Bejarano *et al.* 2006). Apesar de similares, *Sc. microps* pode ser diferenciada de *Sciopemyia sordellii* (Shannon & Del Ponte 1927), outra espécie do gênero *Sciopemyia* registrada para o estado do Espírito Santo e para a Mata Atlântica (Pinto *et al.* 2010b, Galati 2003), pela ausência de papila no flagelômero III e pelo comprimento dos ductos individuais em *Sc. microps* ser mais de oito vezes o comprimento do corpo e em *Sc. sordellii* ser menos de 3,5 vezes o comprimento do corpo (Bejarano *et al.* 2006, Shimabukuro *et al.* 2011). Assim, foi descartada a possibilidade de erro de identificação e as fêmeas de *Sc. aff. microps* se tratarem de fêmeas de *Sc. sordelli*. Por outro lado, as fêmeas de *Sciopemyia servulolimai* (Damasceno & Causey), a outra representante do gênero com ocorrência para a Mata Atlântica, apresentam ductos individuais mais curtos e mais calibrosos em relação aos de *Sc. microps*. Todavia, não foi possível averiguar o comprimento desses ductos para os espécimes identificados como *Sc. aff. microps* e, assim, não descartamos que possam ser espécimes de *Sc. servulolimai*. Essa espécie tem sido registrada principalmente para a região Amazônica (Galati 2003), mas as fêmeas foram descritas para regiões de Mata Atlântica do estado do Ceará, nordeste do Brasil (Andrade-Filho *et al.* 2003b). Assim, esse seria o registro mais ao

sul do continente para a espécie e o primeiro registro de ocorrência para a região sudeste do Brasil.

Os novos registros de ocorrência de espécies de flebotomíneos são importantes epidemiologicamente, taxonomicamente, evolutivamente e ecologicamente (Pinto *et al.* 2008, 2009, Santos *et al.* 2009, 2012, Rodrigues *et al.* 2013). Epidemiologicamente, esses registros são importantes porque o encontro de vetores antes da ocorrência da doença permite conduzir estratégias de prevenção da ocorrência da doença com base na eliminação desses vetores. Ainda, por exemplo, o encontro de *Lu. longipalpis*, vetor de *Le. infantum*, permite antecipar estratégias como monitoramento da infecção na população de cães, reservatórios do parasito, e evitar a ocorrência da doença em humanos (Santos *et al.* 2012, Rodrigues *et al.* 2013). Taxonomicamente, é importante para evitar identificações errôneas principalmente para espécies muito semelhantes, como *Ny. neivai* e *Ny. intermedia*, que merecem mais atenção durante o processo de identificação (Santos *et al.* 2009). Evolutivamente, pode auxiliar na compreensão de eventos históricos que influenciaram a especiação e modelaram a distribuição desses insetos (Pinto *et al.* 2009). Ecologicamente, são importantes para determinar as preferências das espécies por tipo de clima, relevo e temperatura, por exemplo. Isso pode ser usado para construir modelos e distribuição potencial e, conseqüentemente, de vigilância epidemiológica em áreas potenciais de ocorrência desses vetores (Peterson & Shaw 2003).

Durante um breve inventário de flebotomíneos em uma localidade do município de Bom Jesus de Itabapoana, *Brumptomyia ortizi* Martins, Silva & Falcão, 1971 foi registrada pela primeira vez para o estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil. Além disso, do total de espécies coletadas, 80% representaram novos registros de ocorrência para o município e para a região noroeste do estado do Rio de Janeiro (Carvalho *et al.* 2014, Rezende *et al.* 2009). Ainda, as análises ecológicas de diversidade e de riqueza de espécies encontraram valores muito semelhantes aos encontrados por estudos que empregaram muito mais tempo de amostragem em outras localidades, incluindo áreas de conservação, do estado do Rio de Janeiro (Souza *et al.*, 2001; Rezende *et al.*, 2009; Brazil *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.*, 2013). Para o município de Saquarema foram registradas nove espécies (Brazil *et al.* 2011). Para a reserva biológica de Poço das Antas, município de Silva Jardim, foram registradas oito espécies e para a reserva natural da Fazenda Bom Retiro, município de Casimiro de Abreu, foram registradas dez espécies (Souza *et al.* 2001). Para o

Parque Estadual da Serra da Tiririca, município de Niterói, foram registradas 12 espécies (Rodrigues *et al.* 2012). Por fim, em um trabalho anterior para outra localidade do município de Bom Jesus do Itabapoana foram registradas oito espécies (Rezende *et al.* 2009). Isso corroborou o proposto sobre a utilidade de breves inventários para o conhecimento da biodiversidade de flebotomíneos em áreas pouco amostradas (Pinto *et al.* 2012b).

Esse primeiro registro de *Br. ortizi*, além de levantar questões sobre conhecimento da biodiversidade relacionadas à necessidade de levantamentos em áreas pouco amostradas, também levantou questões relacionadas ao papel da taxonomia de flebotomíneos sobre esse conhecimento. Como a identificação dos espécimes foi estritamente baseada em caracteres morfológicos as fêmeas do gênero *Brumptomyia* e de algumas espécies do gênero *Evandromyia* não puderam ser identificadas ao nível específico devido à similaridade entre elas. Essa similaridade morfológica entre as fêmeas de *Brumptomyia* tem impedido, por exemplo, a descrição formal das fêmeas de algumas espécies como as de *Br. ortizi*.

A similaridade morfológica entre as fêmeas também tem sido uma barreira para descrição de fêmeas de outros gêneros (Galati 2003, Ladeia-Andrade *et al.* 2014). Para o gênero *Trichophoromyia* Barretto 1962, por exemplo, 19 espécies apresentam fêmeas não descritas e dentre as 22 que apresentam fêmeas descritas apenas quatro [*Trichophoromyia reburra* (Fairchild & Hertig 1961), *Trichophoromyia cellulana* (Young & Duncan 1979), *Trichophoromyia omagua* (Martins, Llanos & Silva 1976) e *Trichophoromyia ubiquitousalis* (Mangabeira 1942)] podem ser diferenciadas morfológicamente (Ladeia-Andrade *et al.* 2014). Para *Trichophoromyia uniniensis* Ladeia-Andrade *et al.* 2014, os autores discutiram que a semelhança com outras fêmeas do gênero impossibilitaram a descrição da fêmea dessa espécie (Ladeia-Andrade *et al.* 2014). Essa similaridade morfológica intragenérica de fêmeas também tem influenciado às análises de diversidade, como o índice de diversidade de Shannon e o índice de equitabilidade, uma vez que estes requerem identificação individual ao nível específico (Pinto *et al.* 2010b,c, 2012a,b, Hammer *et al.* 2001). O índice de Shannon, por exemplo, leva em consideração a riqueza específica (número de espécies) e a razão entre número de indivíduos por espécie e o número de indivíduos totais (Hammer *et al.* 2001). Assim, a exclusão das fêmeas identificadas somente ao nível genérico das análises pode ter subestimado a diversidade de flebotomíneos encontrada para diferentes áreas. Todavia, isso não invalida as comparações de diversidade feitas entre diferentes áreas, já que as



fêmeas desses gêneros foram excluídas das análises em todas elas (Pinto *et al.* 2010b,c, 2012a,b, Virgens *et al.*, no prelo). Mesmo assim, métodos de identificação capazes de discriminar as fêmeas morfológicamente similares devem ser estimulados. Um método proposto para esse fim, conhecido como código de barras de DNA, é o de amplificação e análise de um fragmento do gene mitocondrial *citocromo c oxidase subunidade I*.

## **7.2 Sistemática molecular de flebotomíneos neotropicais: os códigos de barras de DNA**

O código de barras de DNA parece ser uma eficiente ferramenta para discriminar entre a maior parte das espécies de flebotomíneos neotropicais analisadas até então, assim como para descobrir diversidade críptica para determinados táxons (Azpúrua *et al.* 2010, Gutiérrez *et al.* 2014). Utilizando 576 espécimes coletados para 19 localidades de cinco estados brasileiros também demonstramos a eficiência do código de barras de DNA em discriminar entre espécies, em apontar a existência de espécies crípticas e em associar machos com suas respectivas fêmeas ainda não descritas.

O código de barras de DNA foi eficiente em discriminar 85% (40/47) do total de espécies analisadas. Essa percentagem foi menor do que a encontrada para flebotomíneos da Índia (Kumar *et al.* 2012) e para flebotomíneos da Colômbia (Gutiérrez *et al.* 2014) cujas percentagens de espécies discriminadas foi muito próxima de 100%. Essa diferença pode estar relacionada à amostragem, como número de indivíduos analisados por espécies, de espécies analisadas e de localidades em que foram coletados.

Para a Índia foram analisados indivíduos de diferentes localidades para cada espécie, no entanto foram analisadas somente cinco espécies. Para a Colômbia, diferentemente, foram analisadas 36 espécies, mas somente dez delas foram amostradas para mais de uma localidade. O uso de poucas espécies pode elevar a percentagem de discriminação entre espécies, pois diminui a probabilidade de espécies muito próximas evolutivamente serem avaliadas. Da mesma forma, a análise de indivíduos da mesma localidade observa uma menor variação intraespecífica e, com isso, a percentagem de discriminação entre espécies aumenta (Bergsten *et al.* 2012).

Neste estudo avaliamos um grande número de espécies para a região Neotropical e, para a maioria das espécies, um grande número de espécimes coletados em diferentes localidades. Isso pareceu reduzir a percentagem de discriminação entre as espécies. Também encontramos evidências de que, dependendo das espécies avaliadas, a distância geográfica entre as localidades e a presença de espécies evolutivamente próximas podem reduzir a discriminação entre as espécies. Por exemplo, espécimes de *Lu. longipalpis* coletados na localidade de Cáceres, estado do Mato Grosso foram agrupados com espécimes de *Lu. cruzi* coletados na mesma localidade ao invés de agruparem com espécimes de *Lu. longipalpis* coletados na localidade Pancas, estado do Espírito Santo. Mesmo *Lu. longipalpis* sendo um complexo de espécies e *Lu. cruzi* (os machos apresentam diferenças morfológicas em relação aos espécimes identificados como *Lu. longipalpis*) seja uma das espécies que o compõe, o esperado era que os espécimes de *Lu. longipalpis* fossem mais semelhantes geneticamente entre si em relação aos espécimes de *Lu. cruzi* e, portanto, as duas espécies deveriam agrupar separadamente (Vigoder *et al.* 2010, Lins *et al.* 2012). Isso ocorreu possivelmente devido a existência de introgressão entre essas espécies nessas áreas de simpatria, como a localidade de Cáceres. Introgressão é o fluxo gênico de uma espécie para o conjunto gênico de outra por retrocruzamentos de um híbrido interespecífico com uma de suas espécies parentais (Ridley 2004). Esse fenômeno é relativamente comum entre espécies muito próximas evolutivamente, como as do complexo *Lu. longipalpis*, e pode ocorrer mais facilmente no DNA mitocondrial em relação ao DNA nuclear (Powell 1983; Bachtrog *et al.* 2006, Lins *et al.* 2012; Araki & Ferreira *et al.* 2013). Isso justifica o que encontramos com o gene COI, um marcador mitocondrial.

Introgressão também pode explicar a baixa divergência genética encontrada entre *Ny. intermedia* e *Ny. whitmani*. A evidência de introgressão entre essas duas espécies foi apresentada utilizando tanto marcadores mitocondriais (Marcondes *et al.* 1997) como marcadores nucleares (Mazzoni *et al.* 2006, 2008). Para os mitocondriais, a análise do citocromo b mostrou que fêmeas morfológicamente identificadas como *Ny. intermedia* da localidade de Viana, estado do Espírito Santo apresentaram haplótipos de *Ny. whitmani* (Marcondes *et al.* 1997). Já para os nucleares, a análise do gene *period* mostrou baixo nível de divergência genética, grande similaridade entre sequências e a presença de haplótipos compartilhados entre essas duas espécies do gênero *Nyssomyia*, em uma área de simpatria na localidade de Posse, estado do Rio de Janeiro (Mazzoni *et al.* 2006, 2008). Mesmo

com a dificuldade em discernir entre introgressão e retenção de polimorfismo ancestral, a hipótese de introgressão tem sido preferida baseada nos dados que apontaram que *Ny. intermedia* e *Ny. whitmani* podem estar trocando genes (Mazzoni *et al.* 2008). Assim, esse fluxo gênico justifica a baixa divergência genética que encontramos entre essas duas espécies. Apesar da baixa divergência genética que encontramos entre *Ny. intermedia* e *Ny. whitmani*, nenhum haplótipo foi compartilhado entre eles. Isso somado aos altos valores de suporte de bootstrap para os ramos de cada espécie possibilitou inferir que o COI discriminou entre essas espécies para a área geográfica amostrada.

Diferentemente, a discriminação entre *Evandromyia carmelinoi* (Ryan *et al.* 1986) e *Evandromyia lenti* (Mangabeira, 1938) não foi possível. Essas espécies apresentaram baixíssima divergência genética e os valores de suporte de bootstrap foram igualmente baixos para os ramos de cada espécie. Essas duas espécies são muito similares morfológicamente e, se realmente representam dois táxons diferentes, a única explicação para essa baixa divergência interespecífica é a presença de forte introgressão entre elas na localidade de Cáceres, onde ocorrem em simpatria (Alves *et al.* 2012). Mesmo assim, uma revisão morfológica e o uso de novos marcadores moleculares para as espécies desse grupo utilizando mais espécimes coletados ao longo de sua distribuição geográfica são requeridos para validação do status taxonômico destas espécies.

O uso do COI também corroborou o encontrado por uma revisão morfológica do grupo shannoni. Essa revisão, com base nos caracteres morfológicos analisados, propôs o ressurgimento de duas espécies [*Psathyromyia bigeniculata* (Floch & Abonnenc) e *Psathyromyia limai* (Fonseca)] da sinonímia de *Psathyromyia shannoni* (Dyar). Também propôs que *Psathyromyia pestanai* (Barretto & Coutinho) é um sinônimo júnior de *Pa. limai* (Sábio *et al.* 2014). Como todos os espécimes que analisamos foram coletados e identificados anteriormente a publicação dessa revisão, todos os espécimes foram identificados com *Pa. shannoni*. Contudo, a análise do gene COI mostrou dois grupos distintos com grande divergência genética entre eles. Então, com base na publicação da revisão do grupo shannoni, as lâminas contendo os indivíduos montados foram revisadas e foi possível averiguar que um dos grupos identificados como *Pa. shannoni* era composto de fato por indivíduos de *Pa. bigeniculata* e o outro por indivíduos de *Pa. limai*.

Concomitantemente, o uso do gene COI para a identificação das espécies de flebotomíneos também foi hábil em associar fêmeas aos seus respectivos machos

para os gêneros *Brumptomyia*, *Evandromyia* e *Pressatia*, os quais incluem fêmeas indistinguíveis morfológicamente. Com base nos caracteres morfológicos dos machos identificamos três espécies do gênero *Brumptomyia* [*Brumptomyia cunhai* (Mangabeira, 1942); *Brumptomyia ortizi* Martins, Silva & Falcão, 1971; *Brumptomyia nitzulescui* (Costa Lima, 1932)] e todas as fêmeas foram identificadas como *Brumptomyia* spp. Os espécimes de *Br. cunhai* analisados foram coletados no Monumento Natural dos Pontões Capixabas, município de Pancas, estado do Espírito Santo e fêmeas dessa localidade não foram analisadas (Ferreira *et al.* 2013). Todavia, essa espécie não foi incluída na publicação sobre o levantamento da fauna de flebotomíneos da região porque foi identificada erroneamente como *Br. nitzulescui*. Essa identificação foi corrigida por uma revisão das identificações após uma análise prévia do gene COI ter evidenciado a presença de duas espécies para *Br. nitzulescui*. Assim, a revisão apontou que os indivíduos identificados como *Br. nitzulescui* para a localidade de Pancas eram de fato indivíduos de *Br. cunhai*. Isso salientou a utilidade do código de barras de DNA em tornar mais confiável a identificação de flebotomíneos.

*Brumptomyia cunhai* apresentou 46 diferenças fixas em relação a *Br. ortizi* e *Br. nitzulescui*, incluindo sete diferenças que podem ser utilizadas como sítios diagnósticos entre essas três espécies uma vez que cada espécie teve um nucleotídeo diferente na posição. Além dos sete sítios diagnósticos, *Br. ortizi* apresentou 26 diferenças fixas em relação a *Br. cunhai* e *Br. nitzulescui*. Cinco das dez fêmeas identificadas como *Brumptomyia* sp. foram agrupadas com os machos de *Br. ortizi* compartilhando seus sítios fixos em relação as outras duas espécies de *Brumptomyia*. Além da similaridade entre as sequências do gene COI, esses espécimes foram coletados na mesma localidade reforçando a hipótese de que pertencem ao mesmo táxon. Isso é muito interessante porque as fêmeas de *Br. ortizi* ainda não foram descritas (Galati 2003). Assim, o código de barras de DNA pode ser útil para auxiliar na descrição das fêmeas de *Br. ortizi*. Fêmeas de *Br. nitzulescui* podem ser morfológicamente distintas de cinco outras espécies de *Brumptomyia* (Shimabukuro *et al.* 2011), mas quando encontradas simpatricamente com outras espécies do gênero essa diferenciação é difícil de ser feita. Nossa análise do gene COI agrupou cinco fêmeas de *Brumptomyia* com machos de *Br. nitzulescui*. Esse grupo apresentou um grande número de diferenças fixas e, conseqüentemente, alta divergência em relação às outras espécies de *Brumptomyia*. Como mostramos para *Br. ortizi*, essa diferenciação salienta a utilidade da ferramenta do código de barras

de DNA para a identificação de flebotomíneos e seu potencial para associação entre machos e fêmeas mesmo para espécies em que ambos os sexos não apresentam descrição morfológica formal.

O código de barras de DNA também indicou a associação entre machos e fêmeas do gênero *Evandromyia*. *Evandromyia tupynambai* foi descrita para ambos os sexos, mas quando encontrada em simpatria com *Evandromyia callipyga* ou *Evandromyia costalimai* as fêmeas não podem ser distinguidas morfológicamente. Não analisamos machos de *Ev. callipyga* ou *Ev. costalimai*, mas encontramos evidências de que o código de barras de DNA pode discriminar entre essas espécies porque as fêmeas identificadas como *Evandromyia* spp. foram agrupadas em dois grupos diferentes com alta divergência genética e presença de sítios fixos entre elas (Figura 5.3, capítulo 3). O primeiro grupo foi composto por machos de *Ev. tupynambai* mais oito fêmeas, e o segundo composto somente por três fêmeas. As fêmeas do segundo grupo pertencem a *Ev. callipyga* ou *Ev. costalimai* devido as similaridades morfológicas com as fêmeas do primeiro grupo. Contudo, não podemos afirmar a qual das duas espécies pertencem, pois não analisamos o código de barras de DNA para os machos. A alta diferenciação genética entre os dois grupos de fêmeas permitiu afirmar que o código de barras de DNA foi útil para associar machos e fêmeas para cada uma dessas espécies. Finalmente, providenciamos um perfil de código de barras de DNA para fêmeas do gênero *Pressatia* que pertencem à espécie *Pressatia choti* (Floch & Abonnenc, 1941) de acordo com as análises (Figura 5.3), o que também foi corroborado pela evidência de ausência de outra espécie de *Pressatia* na região em que foram coletadas (Ferreira *et al.* 2013).

Portanto, exceto em casos de espécies proximalmente relacionadas que sofrem introgressão, o código de barra de DNA permitiu a identificação entre espécies de flebotomíneos do Brasil e a descoberta de diversidade críptica para algumas espécies. Também permitiu detectar identificações errôneas e realizar a associação entre machos e fêmeas entre espécies que são morfológicamente similares. Por fim, o código de barras de DNA salientou a importância de utilizar diferentes abordagens para a identificação de espécies de flebotomíneos para alcançar resultados acurados e confiáveis.

### 1.3 Sistemática molecular de flebotomíneos neotropicais: o complexo *Lutzomyia longipalpis*

Até poucos anos atrás, a existência de um complexo de espécies de *Lu. longipalpis* no Brasil era controversa (Bauzer *et al.* 2007). Essa controvérsia se baseava principalmente no fato de que os estudos utilizando marcadores mitocondriais não apontavam a presença desse complexo de espécies para populações brasileiras (Arrivilaga *et al.* 2002, 2003), enquanto os estudos utilizando marcadores nucleares apontavam a presença do complexo (Bauzer *et al.* 2002a,b; Bottecchia *et al.* 2004). Somente recentemente a presença desse complexo no Brasil foi sedimentada por meio de abordagem integrativa utilizando sons do macho durante a cópula, feromônios sexuais e genes nucleares (Araki *et al.* 2009, Lins *et al.* 2012, Araki & Ferreira *et al.* 2013).

Nossos resultados também levantaram essa controvérsia ao passo que demonstraram a insuficiência do fragmento do gene mitocondrial COI utilizado para discriminar entre *Lu. longipalpis* e espécies evolutivamente muito próximas como *Lutzomyia cruzi* e *Lutzomyia alencari* (Figura 5.4). Diferentemente, o gene nuclear *paralitic* foi suficiente para discriminar entre *Lu. longipalpis* e duas espécies evolutivamente próximas: *Lu. cruzi* e *Lu. pseudolongipalpis* (Lins *et al.* 2012). Contudo, esse estudo envolvendo o gene *paralitic* não analisou espécimes de *Lu. longipalpis* que ocorressem simpatricamente com os de *Lu. cruzi* analisados. Dessa forma, o gene COI poderia ser também suficiente para discriminar entre essas espécies se o estudo fosse realizado somente com as espécies que ocorrem alopatricamente (Figura 5.3). Uma vez que *Lu. cruzi* pode ser considerada uma espécie do complexo *Lu. longipalpis* (Vigoder *et al.* 2010), surge o questionamento se genes nucleares seriam suficientes para discriminar entre essas duas espécies quando em simpatria. A evidência em favor da hipótese de que estes seriam suficientes é que fragmentos dos genes nucleares *period* e *paralitic* já foram utilizados para discriminar entre espécies de *Lu. longipalpis* com som do tipo pulsado e do tipo *burst* em áreas de simpatria (Bauzer *et al.* 2002b, Lins *et al.* 2012, Araki & Ferreira *et al.* 2013). O fator mais aceito para explicar a falha de marcadores tanto mitocondriais quanto nucleares em discriminar entre espécies evolutivamente muito próximas é a existência de introgressão (Araki *et al.* 2009; Lins *et al.* 2012). Uma vez que introgressão tende a ocorrer mais facilmente em marcadores

mitocondriais do que nos nucleares (Powell 1983; Bachtrog *et al.* 2006), como o gene *period*, estes tem sido preferidos para os estudos do complexo *Lu. longipalpis*.

Estudos anteriores utilizando o gene *period*, sons de cópula e feromônios sexuais mostraram que as populações de *Lu. longipalpis* podem ser separadas em dois grupos principais: o primeiro grupo homogêneo composto por uma espécie do complexo que se caracteriza por produzir o som do tipo *burst* e cembreno-1, e o segundo grupo mais heterogêneo composto por um número de espécies incipientes com diferentes níveis de divergência, com diferentes combinações de som do tipo pulsado (P1-P5) e diferentes tipos de feromônios sexuais (9-metil-germacreno-B, himacaleno e cembreno-2) (Araki *et al.* 2009).

No presente estudo, em um primeiro momento, sequenciamos um fragmento de 266 pb do gene *period* para oito novas populações de *Lu. longipalpis* cujo som de cópula gravado foi do tipo *burst*. Isso para investigar a distribuição geográfica através de quatro biomas brasileiros e caracterizar a relação evolutiva entre elas e as populações com som de cópula do tipo *burst* previamente publicadas. Além disso, também realizamos análises filogeográficas dessa espécie do complexo.

A distribuição geográfica dessas novas populações ao longo da faixa costeira do Brasil, exceto pela população de Palmas, estado de Tocantins, é similar a proposta por Araki e colaboradores (2009) para a espécie do complexo *Lu. longipalpis* que apresenta som de cópula do tipo *burst* e feromônio sexual do tipo cembreno-1. Mesmo não apresentando dados sobre o tipo de feromônio sexual de cada população, para três delas (Nova Porteirinha, Passira and Itamaracá) os machos apresentam feromônio sexual do tipo cembreno-1 (R. P. Brazil, *dados não publicados*). Além disso, encontramos reduzida distância genética entre essas populações (Tabela 6.1.2), corroborando também os dados obtidos proposto por Araki e colaboradores (2009). Dessa forma, nossos dados sustentaram os dados obtidos previamente (Araki *et al.* 2009) para as populações com som de *burst*, as quais são mais homogêneas e pertencem a uma única espécie do complexo.

Filogeograficamente foi possível afirmar que o padrão geral dos clados detectado para essas populações foi possivelmente devido a fatores históricos. No entanto, não foi possível discriminar entre expansão contínua, colonização a longa distância e fragmentação no passado porque ainda não era conhecido se populações dessa espécie do complexo ocorriam em áreas separando essas populações analisadas. Se ocorressem, colonização a longa distância e/ou

fragmentação no passado seriam os padrões associados com a distribuição dessas espécies.

Ainda filogeograficamente, consideramos que a ocorrência do haplótipo H\_01 em todos os biomas não necessariamente indica grande fluxo gênico entre eles, já que retenção de polimorfismo ancestral pode ser uma possibilidade para explicar sua incidência geral. Além disso, o padrão de distribuição dos haplótipos, nesse estudo, indicou que a Floresta Amazônica pode estar agindo como uma barreira, não permitindo a passagem de haplótipos restritos ao bioma para outros biomas do Brasil. A Floresta Amazônica também pode agir como barreira contra haplótipos de alta frequência compartilhado pelos outros biomas que não ocorrem na região Amazônica. Todavia essa barreira não é absolutamente eficiente em isolar as populações já que Amazônia e Cerrado compartilharam o haplótipo raro H\_06. Da mesma forma a ocorrência de alguns haplótipos comuns como H\_05 e H\_16 entre Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica não necessariamente indicam grande fluxo gênico e, novamente, retenção de polimorfismo ancestral pode ser a possível explicação para o padrão de distribuição desses haplótipos. A análise dos haplótipos restritos não ajudou em esclarecer esse fato, pois eles ocorreram em baixa frequência na Mata Atlântica e Caatinga. Ainda, mutações mais recentes podem não ter se espalhado para outras regiões, pois não houve tempo suficiente para isso. Interessantemente, apesar da presença de haplótipos restritos, as populações pertencentes à Caatinga e à Mata Atlântica parecem mostrar uma maior conexão como indicado pelo compartilhamento do haplótipo H\_07, ao menos que este seja um haplótipo que foi extinto nas regiões Amazônica e de Cerrado.

Por fim, a distribuição das populações com som de cópula do tipo *burst* e seus padrões genéticos vão ao encontro de uma possível dispersão mais intensa em regiões áridas, uma vez que populações pertencentes aos biomas mais secos como a Caatinga e o Cerrado apresentaram maior fluxo gênico entre elas. Embora sendo considerado um bioma úmido, as populações da Mata Atlântica analisadas neste estudo apresentaram intenso fluxo gênico quando comparações par-a-par foram realizadas com populações dos biomas secos.

Complementarmente, analisamos um fragmento de 446 pb do gene *period* para onze populações de *Lu. longipalpis* ainda não estudadas. Vários sítios parcimoniosamente informativos foram observados neste fragmento. Estes são úteis para reconstruções filogenéticas, principalmente quando não existem sítios fixos



entre as espécies como ocorre entre as populações de *Lu. longipalpis* com som do tipo *burst* e as com som do tipo pulsado.

Araki *et al.* (2009) discutiram os problemas dos estudos com espécies incipientes como as do complexo *Lu. longipalpis* no Brasil. Esses autores salientaram a importância do som de cópula na especiação desses insetos e apontaram uma relação entre sons de cópula e espécies dentro do complexo. Assim, cada tipo de som de cópula pertenceria a uma espécie diferente. Neste sentido, observamos as relações entre as populações com som de cópula gravado e não gravado para indicar a qual grupo de espécie as populações não gravadas pertenceriam.

As análises dos valores de  $F_{ST}$  das onze populações adicionadas ao estudo foram as primeiras evidências sobre quais populações pertenceriam a cada grupo de espécie: *burst* ou pulsado. Dessa forma, foi possível inferir quanto ao som de cópula para as populações sem som de cópula gravado. Por exemplo, as análises sugeriram que as populações sem som de cópula gravado de Cáceres, de Olindina e de Vila Pavão pertenceriam à espécie com som de cópula do tipo *burst*, já que agruparam com a população de Cametá, cujo som gravado foi do tipo *burst*. Essa evidência foi corroborada pelas análises de  $F_{ST}$  para todas as 33 populações analisadas, visto que as três populações mencionadas foram agrupadas com todas as populações apresentando som de cópula do tipo *burst* gravadas anteriormente. Tal evidência ainda foi reforçada pela ausência de sítios fixos entre essas três populações e a população de Cametá, pelo grande número de sítios compartilhados entre elas (Tabela 6.2.5) e também pelo pequeno número de sítios exclusivos entre elas (Tabela 6.2.6). A rede de haplótipos obtida para as onze novas populações (Figura 6.2.6) salientou a homogeneidade das populações com som de cópula do tipo *burst* com som gravado (Ipanema e Cametá), assim como aquelas sem dados sobre o tipo de som (Cáceres, Olindina e Vila Pavão). A árvore de máxima verossimilhança também salientou essa homogeneidade entre as sequências dessas populações que, exceto por uma sequência de Cáceres, foram todas agrupadas no mesmo clado (Figura 6.2.8). A primeira evidência de homogeneidade genética entre as populações com som de cópula do tipo *burst* foi observada entre as populações de Natal e Sobral 2S, as quais também compartilharam o feromônio cembreno-1 (Bauzer *et al.* 2002a, Souza *et al.* 2002, Souza *et al.* 2004). Em concordância com essa primeira evidência, os estudos seguintes sobre o complexo *Lu. longipalpis* observaram claramente esse padrão entre várias populações

brasileiras com esse tipo de som de cópula (Araki *et al.* 2009, Lins *et al.* 2012, Araki *et al.* 2013). A homogeneidade das populações com som do tipo *burst* somada à concordância entre todas as análises em relação a proximidade entre as populações de Cáceres, Olindina e Vila Pavão e populações com som de cópula gravados do tipo *burst* permitem com segurança incluir essas três populações como partes da espécie com som de cópula *burst*, mesmo sem informações sobre feromônios ou sons de cópula gravados.

Foi sugerido anteriormente que a espécie com som de cópula do tipo *burst* apresentava uma distribuição principalmente para regiões da costa atlântica do Brasil. Todavia essa distribuição parece mais ampla, já que as populações das localidades de Palmas, estado do Tocantins e de Cáceres, estado de Mato Grosso, estão localizadas na região central do Brasil.

A população de Araçatuba foi também mais proximamente relacionada às populações com som de cópula do tipo *burst*, mas com substancial diferenciação genética entre elas (Figuras 6.2.4-5 e Figura 6.2.8). Como discutido acima, estudos anteriores mostraram que o grupo de populações com som de cópula do tipo *burst* são muito homogêneas (Araki *et al.* 2009, Lins *et al.* 2012) e, assim, duas possibilidades poderiam explicar essa proximidade da população de Araçatuba com as das populações com som do tipo *burst*. Uma explicação seria que a população de Araçatuba pertenceria a uma segunda espécie do complexo com som do tipo *burst* ou com um tipo de som *burst* diferente do registrado até o momento. Um tipo de som do tipo *burst* ligeiramente diferente já foi registrado para a população de Campo Grande, estado de Mato Grosso do Sul e também apresentou substancial diferenciação genética em relação às populações com som de *burst* (Araki 2009). Outra explicação para a proximidade, mas com alta diferenciação em relação às populações *burst*, é a presença de forte introgressão com uma população com som de cópula do tipo pulsado. Somente analisamos espécimes da população de Araçatuba com um padrão fenotípico de duas pintas abdominais, contudo os indivíduos com padrão fenotípico de uma pinta ocorrem e são mais abundantes na região (R. P Brazil, *comunicação pessoal*). Existe forte evidência de que a população de Araçatuba com o padrão de uma pinta abdominal pertença a uma das espécies do grupo pulsado, uma vez que o feromônio sexual dos machos foi caracterizado como sendo (S)-9-metil-germacreno-B (Casanova *et al.* 2006) e, até o momento, todas as populações pertencentes à espécie com som de cópula do tipo *burst* apresentaram feromônio sexual do tipo cembreno-1. Assim, possivelmente

introgressão entre essas duas populações simpátricas é mais comum no sentido da população com uma pinta abdominal para a população com duas pintas abdominais e isso acarretaria maior diferenciação entre a população de Araçatuba com duas pintas abdominais (possivelmente apresenta som de cópula do tipo *burst*) e as populações com som do tipo *burst*. Fica evidente então que a gravação do som de cópula da população de Araçatuba é a única forma de demonstrar quais das duas explicações seriam as corretas ou se ainda existe uma terceira explicação para essa diferenciação.

As análises dos valores de  $F_{ST}$  das onze novas populações brasileiras de *Lu. longipalpis* estudadas também forneceram evidências sobre quais populações não-gravadas pertenceriam ao grupo de espécies com som de cópula do tipo pulsado (Tabela 6.2.3, Figura 6.2.4). Na Figura 6.2.4, o Grupo A refere-se às populações possivelmente com som de cópula do tipo pulsado por duas razões: 1) foi o grupo mais heterogêneo geneticamente, e 2) as três populações analisadas com som de cópula do tipo pulsado gravados (Lassance, Palmas 1S e Pirenópolis) pertenceram a um grupo menor (Grupo B) dentro do Grupo A. Juntamente com essas três populações, a população de Porto Nacional também compôs o Grupo B. Seu agrupamento com o Grupo B foi uma boa evidência que a população de Porto Nacional pertença ao grupo de populações com som de cópula do tipo pulsado. Essa evidência foi corroborada pela análise dos valores de  $F_{ST}$  de todas as 33 populações (Figura 6.2.5), pelas redes de haplótipos (Figuras 6.2.6-7) e pela árvore de máxima verossimilhança (Figura 6.2.8). Infelizmente, as análises não apresentaram resolução suficiente dentro do grupo de populações com som de cópula do tipo pulsado e, por isso, não foi possível inferir qual tipo de som pulsado é produzido pelos machos da população de Porto Nacional. As análises dos valores de  $F_{ST}$ , por exemplo, agruparam a população de Porto Nacional com as populações que produzem som de cópula pulsado do tipo 4 (Grupo C, Figura 6.2.5). Todavia, essas mesmas análises também agruparam separadamente as populações que apresentam som de cópula do tipo 3 (Sobral 1S e Teresina) reiterando a falta de resolução dentro do grupo pulsado. As redes de haplótipos mostraram que as sequências da população de Porto Nacional pertenceram aos clados das populações com som de cópula pulsado do tipo 4, mas estes clados também foram compostos por sequências de populações que produzem som de cópula pulsado do tipo 2 e 3 (Figuras 6.2.6-7). Mesmo usando somente quatro sequências de uma população que produz som de cópula pulsado do tipo 2 (Lapinha), foi possível

observar a falta de diferenciação genética entre as sequências das espécies que compõem o grupo com som do tipo pulsado, exceto pelas populações de Araci, Cavunge e Jacobina que compuseram o Clado C (Figura 6.2.8). Essa falta de diferenciação genética entre as espécies que produzem som de cópula do tipo pulsado também foi reportada por estudos anteriores utilizando redes de haplótipos (Araki *et al.* 2009, Lins *et al.* 2012).

As populações de Cavunge e Araci compuseram um grupo menor que apresentou mais diferenciação genética dentro do grupo de populações que apresentam sons de cópula do tipo pulsado e levantaram a hipótese de pertencerem à mesma espécie, junto com a população de Jacobina, estado da Bahia. A primeira evidência foi que pela análise dos valores de  $F_{ST}$  essas populações foram agrupadas juntas e apresentaram altos valores de  $F_{ST}$  em relação às outras nove populações analisadas (Figura 6.2.4). A rede de haplótipos (Figura 6.2.6) também deu suporte a essa hipótese com a maioria das sequências dessas sendo agrupadas juntas. No mesmo sentido, sequências dessas populações foram agrupadas no mesmo clado da árvore de máxima verossimilhança (Figura 6.2.8). Apesar dessas duas populações não apresentarem sons de cópula gravados, o feromônio sexual caracterizado para a população de Cavunge foi o 3-metil- $\alpha$ -himacaleno (R. P. Brazil, *comunicação pessoal*), como já descrito para Jacobina, que apresenta som de cópula pulsado do tipo 1.

## 8. CONCLUSÕES

- O uso de caracteres morfológicos para a identificação de espécies de flebotomíneos é útil nos estudos de levantamento de fauna e para o conhecimento da biodiversidade de flebotomíneos, todavia é insuficiente para discriminar entre espécies muito próximas evolutivamente e cujas fêmeas são muito similares morfológicamente.
- O uso do código de barras de DNA, analisando um fragmento do gene COI, é uma ferramenta útil que permite a discriminação de espécies de flebotomíneos, corroborando identificações morfológicas, e auxiliando na diferenciação das espécies em que os caracteres morfológicos são insuficientes. Com essa ferramenta, fêmeas muito semelhantes de alguns gêneros (por exemplo, *Brumptomyia*, *Evandromyia* e *Pressatia*) podem ser associadas aos seus respectivos machos, complexo de espécies crípticas podem ser descobertos e erros de identificação morfológica podem ser solucionados. O uso do código de barras de DNA também é relevante para dar suporte aos resultados de revisões morfológicas e também para indicar grupos em que estas revisões são necessárias, como para o gênero *Sciopemyia*.
- A abordagem de códigos de barra de DNA não são úteis para discriminação entre espécies do complexo *Lutzomyia longipalpis* e espécies muito proximamente relacionadas a este complexo, possivelmente devido à presença de forte introgressão entre elas. Nesse caso, as análises de fluxo gênico e das relações evolutivas entre as populações do complexo *Lutzomyia longipalpis* utilizando fragmentos do gene *period* podem indicar a qual grupo de espécie pertence cada população, relacionando com o tipo de som de cópula (*burst* ou pulsado), mesmo que este não tenha sido gravado. No entanto, as análises do gene *period* não são capazes de discriminar entre populações do grupo de espécies com sons de cópula do tipo pulsado, exceto pelas populações com som pulsado do tipo 1.
- O uso concomitante de caracteres morfológicos e moleculares salienta a utilidade da taxonomia integrativa para alcançar resultados acurados para identificação de flebotomíneos neotropicais.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexander CP (1929) A revision of the American two-winged flies of the Psychodid sub-family Bruchomyiinae. *Proceedings of the United States National Museum*, **75**, 1-9.
- Alves GB, Oshiro ET, Leite MC, Melão AV, Ribeiro LM, Mateus NLF, Brazil RP, Andrade-Filho JD, Oliveira AG (2012) Phlebotomine sandflies fauna (Diptera: Brazil) (Diptera: Psychodidae) at rural settlements in the municipality of Cáceres, State of Mato Grosso, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **45**, 437-443.
- Andrade MS, Valença HF, Silva AL, Almeida FA, Almeida EL, Brito MEF, Brandão-Filho SP (2005) Sand fly fauna in a military training area endemic for American tegumentary leishmaniasis in the Atlantic Rain Forest region of Pernambuco, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, **21**, 1761-1767.
- Andrade AJ, Dantas-Torres F (2010) Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) of the state of Minas Gerais, Brazil. *Neotropical Entomology* **39**, 115-123.
- Andrade-Filho JD, Carvalho GML, Saraiva L, Falcão AL (2004) Bilateral anomaly in the style of *Micropygomyia schreiberi* (Martins, Falcão & Silva) (Diptera, Psychodidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, **48**, 583-585.
- Andrade-Filho JD, Galati EAB, Brazil RP (2009) Review of American fossil Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) with a description of two new species. *Journal of Medical Entomology*, **46**, 969-979.
- Andrade-Filho JD, Galati EAB, de Sousa RN, Falcão AL (2003b) Description of the female of *Sciopemyia servulolimai* (Damasceno & Causey) (Diptera: Psychodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **98**, 503-505.
- Andrade-Filho JD, Galati EAB, Falcão AL (2003a) Redescription of *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **98**, 1059-1065.
- Ansorge, J (1994) Tanyderidae and Psychodidae (Insecta: Diptera) from the lower Jurassic of Northeastern Germany. *Palaontologische Zeitschrift*, **68**, 199-210.
- Araki AS (2009) Diferenciação molecular no gene *period* e análise *multilocus* da introgressão em *Lutzomyia longipalpis* s.l. (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) (Tese de Doutorado). FIOCRUZ. 100 p.

- Araki AS, Ferreira GEM, Mazzoni CJ, Souza NA, Machado RC, Bruno RV, Peixoto AA (2013) Multilocus analysis of divergence and introgression in sympatric and allopatric sibling species of the *Lutzomyia longipalpis* complex in Brazil. *PLoS Neglected Tropical Disease*, **7**, e2495.
- Araki AS, Vigoder FM, Bauzer LG, Ferreira GE, Souza NA, Araújo IB, Hamilton JGC, Brazil RP, Peixoto AA (2009) Molecular and behavioral differentiation among Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **3**, e365.
- Aransay AM, Scoulica E, Tselentis Y, Ready PD (2000) Phylogenetic relationships of phlebotomine sandflies inferred from small subunit nuclear ribosomal DNA. *Insect Molecular Biology*, **9**, 157-168.
- Arias JR, Miles MA, Naiff RD, Povoá MM, Freitas RA, Biancardi CB, Castellón EG (1985) Flagellate infections of Brazilian sand flies (Diptera: Psychodidae): isolation in vitro and biochemical identification of *Endotrypanum* and *Leishmania*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **34**, 1098-1108.
- Arrivillaga J, Mutebi JP, Pinango H, Norris D, Alexander B, Feliciangeli MD, Lanzaro GC (2003) The taxonomic status of genetically divergent populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) based on the distribution of mitochondrial and isozyme variation. *Journal of Medical Entomology*, **40**, 615-627.
- Arrivillaga JC, Norris DE, Feliciangeli MD, Lanzaro GC (2002) Phylogeography of the Neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* inferred from mitochondrial DNA sequences. *Infection, Genetics and Evolution*, **2**, 83-95.
- Artemiev MM (1991) A classification of the subfamily Phlebotominae. (1st. International Symposium of Phlebotomine Sandflies). *Parassitologia*, **33**, 69-77.
- Avisé JC (2000) Phylogeography: the history and formation of species. In: *Harvard University Press Cambridge*, MA: Harvard University Press.
- Azevedo ACR, Rangel EF, Queiroz RG (1990b) *Lutzomyia migonei* (França, 1920) naturally infected with peripylarian flagellates in Baturité, a focus of cutaneous leishmaniasis in Ceará state, Brazil. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, **85**, 479.
- Azevedo ACR, Rangel EF, Costa EM, David J, Vasconcelos AW, Lopes UG (1990a) Natural infection of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) by *Leishmania* of the *braziliensis* complex in Baturité, Ceará state, Northeast Brazil. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, **85**, 251.

- Azpurua J, De La Cruz D, Valderama A, Windsor D (2010) *Lutzomyia* sand fly diversity and rates of infection by *Wolbachia* and an exotic *Leishmania* species on Barro Colorado Island, Panama. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **4**, e627.
- Bachtrog D, Thornton K, Clark A, Andolfatto P (2006) Extensive introgression of mitochondrial DNA relative to nuclear genes in the *Drosophila yakuba* species group. *Evolution*, **60**, 292–302.
- Barreto MP (1943) Contribuição para o conhecimento dos flebótomos do estado de São Paulo. IX. Anomalias observadas na terminália do macho de *P. alphabeticus* Fonseca 1936 e de algumas outras espécies (Diptera, Psychodidae). *Revista de Medicina Cirúrgica do Brasil*, **51**, 703-710.
- Barreto, MP, Coutinho JO (1940) Processos de captura, dissecação e montagem de flebótomos. *Anais da Faculdade de Medicina de São Paulo*, **16**, 173–187.
- Barrett RDH, Hebert PDN (2005) Identifying spiders through DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology*, **83**, 481-491.
- Barretto MP (1962) Novos subgêneros de *Lutzomyia* França, 1924 (Psychodidae, Subfamília Phlebotominae). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, **4**, 91-100.
- Barretto MP, Coutinho JO (1940) Contribuição ao conhecimento dos *Flebotomus* de São Paulo. II – Descrição do macho de *Phlebotomus limai* Fonseca, 1935 e de duas novas espécies: *Phlebotomus ayrozai* e *P. amarali* (Diptera, Psychodidae). *Arquivos da Faculdade de Higiene e Saúde Pública*, **6**, 34-35.
- Barros GC, Sessa PA, Mattos EA, Carias VRD, Mayrink W, Alencar JTA, Falqueto A, Jesus A (1985) Foco de leishmaniose tegumentar nos municípios de Viana e Cariacica, estado do Espírito Santo, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, **19**: 146–153.
- Baum M, Ribeiro MCV, Lorosa ES, Damasio GAC, Castro EA (2013) Eclectic feeding behavior of *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) in the transmission area of American cutaneous leishmaniasis, State of Paraná, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **46**, 560-565.
- Bauzer LG, Gesto JS, Souza NA, Ward RD, Hamilton JG, *et al.* (2002b) Molecular divergence in the *period* gene between two putative sympatric species of *Lutzomyia longipalpis* complex. *Molecular Biology and Evolution*, **19**, 1624-1627.



- Bauzer LG, Souza NA, Maingon RD, Peixoto AA (2007) *Lutzomyia longipalpis* in Brazil: a complex or a single species? A mini-review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **102**, 1-12.
- Bauzer LG, Souza NA, Ward RD, Kyriacou CP, Peixoto AA (2002a) The *period* gene and genetic differentiation between three Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis*. *Insect Molecular Biology*, **11**, 315-323.
- Beati L, Cáceres AG, Lee JA, Munstermann LE (2004) Systematic relationships among *Lutzomyia* sand flies (Diptera: Psychodidae) of Peru and Colombia based on the analysis of 12S and 28S ribosomal DNA sequences. *International Journal of Parasitology*, **34**, 225-234.
- Bejarano EE, Duque P, Velez ID (2006) Redescrición de la hembra de *Lutzomyia vattierae* (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) de la serranía de La Macarena, Colombia. *Biomédica*, **26**, 556-561.
- Belen A, Alten B (2011) Seasonal dynamics and altitudinal distributions of sand fly (Diptera: Psychodidae) populations in a cutaneous leishmaniasis endemic area of the Cukurova region of Turkey. *Journal of Vector Ecology*, **36**, 87-94.
- Bengtson P (1988) Open nomenclature. *Palaentology*, **31**, 223-227.
- Bensasson D, Zhang D, Hartl DL, Hewitt GM (2001) Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. *Trends in Ecology & Evolution*, **16**, 314-321.
- Bergsten J, Bilton DT, Fujisawa T, Elliott M, Monaghan M, Balke M, Hendrich L, Geijer J, Herrmann J, Foster GN, Ribera I, Nilsson AN, Barraclough TG, Vogler AP (2012) The effect of geographical scale of sampling on DNA barcoding. *Systematic Biology*, **61**, 851-869.
- Blagoderov V, Grimaldi DA, Fraser NC (2007) How time flies for flies: diverse Diptera from the Triassic of Virginia and early radiation of the order. *American Museum Novitates*, **3572**, 39 p.
- Bock CE, Jones ZF, Bock JH (2007) Relationships between species richness, evenness, and abundance in a southwestern savanna. *Ecology*, **88**, 1322-1327.
- Bottecchia M, Oliveira SG, Bauzer LG, Souza NA, Ward RD, Garner KJ, Kyriacou CP, Peixoto AA (2004) Genetic divergence in the cacophony IVS6 intron among five Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis*. *Journal of Molecular Evolution*, **58**, 754-761.
- Brazil RP, Pontes MC, Passos WL, Rodrigues AA, Brazil BG (2011) The sand fly fauna (Psychodidae: Phlebotominae) in the region of Saquarema, state of Rio

- de Janeiro, Brazil, an endemic area of cutaneous leishmaniasis transmission. *Journal of Vector Ecology*, **36** (Supplement 1): 95-98.
- Camargo-Neves VLF, Gomes AC, Antunes JLF (2002) Correlação da presença de espécies de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) com registros de casos de leishmaniose tegumentar americana no Estado de São Paulo, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira Medicina Tropical*, **35**, 299-306.
- Carnaval AC, Moritz C (2008) Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic Forest. *Journal of Biogeography*, **35**, 1187-1201.
- Carnaval, AC, Hickerson MJ, Haddad CFB, Rodrigues MT, Moritz C (2009) Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest Hotspot. *Science*, **323**, 785–789.
- Carvalho MR, Valença HF, Silva FJ, Pita-Pereira D, Pereira TA, Britto C, Brazil RP, Brandão-Filho SP (2010) Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (França, 1920) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. *Acta Tropica*, **116**, 108-110.
- Carvalho BM, Dias CMG, Rangel EF (2014) Phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae) from Rio de Janeiro State, Brazil: Species distribution and potential vectors of leishmaniasis. *Revista Brasileira de Entomologia*, **58**, 77-87.
- Casanova C, Andrighetti MTM, Sampaio SMP, Marcoris MLG, Colla-Jacques FE, Prado AP (2013) Larval breeding sites of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in Visceral leishmaniasis endemic urban areas in Southeastern Brazil. *PLoS Neglected Tropical Disease*, **7**, e2443.
- Casanova C, Hamilton JGC, Trigo JR, Costa AI (2006) Identification of sex pheromones of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) populations from the state of São Paulo, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **101**, 113–115.
- Cazorla D (2009) Multivariate morphometric differentiation between females of two cryptic species of *Lutzomyia* subgenus *Helcocyrtomyia* (Diptera: Psychodidae). *Revista Colombiana de Entomología*, **35**, 197-201.
- Clare EL, Lim BK, Engstrom MD, Eger JL, Hebert PDN (2007) DNA barcoding of Neotropical bats: species identification and discovery within Guyana. *Molecular Ecology Notes*, **7**, 184-190.

- Clement M, Posada D, Crandall KA (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, **9**, 1657-1659.
- Coquillett DW (1907) Discovery of Blood-sucking Psychodidae in America. *Entomological news, and proceedings of the Entomological Section of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, **18**, 101-102.
- Cortez AM, Silva VPM, Queiroz PVS, Andrade HTA, Loiola MIB, Ximenes MFFM (2007) Vertical stratification and development aspects of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in an area of Atlantic Forest tree species in a metropolitan region in northeastern Brazil. *Journal of Vector Ecology*, **32**, 336–341.
- Costa LP (2003) The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. *Journal of Biogeography*, **30**, 71–86.
- Costa LP, Leite YLR, Fonseca GAB, Fonseca MT (2000) Biogeography of South American forest mammals: endemism and diversity in the Atlantic Forest. *Biotropica*, **32**, 872-881.
- Coutinho JO, Barreto MP (1940) Contribuição para o conhecimento dos flebótomos do estado de São Paulo. III. Descrição do macho de *Phlebotomus alphabeticus* Fonseca, 1936 e de *Phlebotomus pascalei* n. sp. (Diptera: Psychodidae). *Annais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo*, **16**, 193-206.
- Coyne JA, Orr HA (2004) Speciation. In: *Sinauer Associates, Inc* Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc.
- Crease TJ (1999) The complete sequence for the mitochondrial genome of *Daphnia pulex* (Cladocera: Crustacea). *Gene*, **233**, 89-99.
- Cupolillo E, Brahim LR, Toaldo CB, Oliveira-Neto MP, Brito MEF, Falqueto A, Naiff MF, Grimaldi Jr G (2003) Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic áreas in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, **41**, 3126–3132.
- Curler GR, Moulton JN (2012) Phylogeny of psychodid subfamilies (Diptera: Psychodidae) inferred from nuclear DNA sequences with a review of morphological evidence for relationships. *Systematic Entomology*, **37**, 603-616.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, **9**, 772.

- Deane LM (1956) Leishmaniose Visceral no Brasil. Estudos sobre Reservatórios e Transmissores no Estado do Ceará. Rio de Janeiro: Serviço Nacional de Educação Sanitária.
- Deane LM, Deane MP (1962) Visceral leishmaniasis in Brazil: Geographical distribution and transmission. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, **4**, 198–212.
- Depaquit J, Perrotey S, Lecointre G, Tillier A, Tillier S, Ferté H, Kaltenbach M, Léger N (1998) Molecular systematics of Phlebotominae: a pilot study. Paraphyly of the genus *Phlebotomus*. *Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série III, Sciences de la vie*, **321**, 849-855.
- Duckhouse DA (1973) Family Psychodidae. In A catalogue of the Diptera of the Americas South of the United States (N. Papavero, ed.). Museu de Zoologia; Universidade de São Paulo, São Paulo, 1-29.
- Dujardin JP, Le Pont F, Martinez E (1999) Quantitative phenetics and taxonomy of some Phlebotomine taxa. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **94**, 735-741.
- Dujardin JP, Torrez EM, Pont F, Hervas D, Sossa D (1997) Isozymic and metric variation in the *Lutzomyia longipalpis* complex. *Medical and Veterinary Entomology*, **1**, 391-400.
- Dupanloup I, Schneider S, Excoffier L (2002) A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, **11**, 2571-2581.
- Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, **32**, 1792-1797.
- Ersts PJ (2014) Geographic Distance Matrix Generator (version 1.2.3). American Museum of Natural History, Center for Biodiversity and Conservation. Available from [http://biodiversityinformatics.amnh.org/open\\_source/gdmg](http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/gdmg). Accessed on 22 august 2014.
- Excoffier L (2004) Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion: lessons from the infinite-island model. *Molecular Ecology*, **13**, 853-864.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, **1**, 47-50.
- Fairchild GB (1955) The relationships and classification of the Phlebotominae (Diptera, Psychodidae). *Annals of the Entomological Society of America*, **48**, 182-196.

- Falqueto A, Ferreira AL (2013) Reservatórios extra-humanos do complexo Leishmânia e dinâmica de transmissão da infecção ao homem. In: Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. 2ed (J.R. Coura, ed.). Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 786-797.
- Falqueto A (1995) Especificidade alimentar de flebotomíneos em duas áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar no Estado do Espírito Santo, Doctoral Thesis, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
- Falqueto A, Ferreira AL, Santos CB, Porrozzi R, Costa MV, Teva A, Cupolillo E, Campos-Neto A, Grimaldi Jr G (2009) Crosssectional and longitudinal epidemiologic surveys of human and canine *Leishmania infantum* visceral infections in an endemic rural area of southeast Brazil (Pancas, Espírito Santo). *American Journal of Tropical Medicine Hygiene*, **80**, 559–565.
- Feitoza LR (1986) Carta agroclimática do Espírito Santo. Governo do estado do Espírito Santo. Secretaria de Estado da Agricultura & Empresa Capixaba de Pesquisa Agropecuária EMCAPA.
- Feliciangeli MD (2004) Natural breeding places of phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinary Entomology*, **18**, 71-80.
- Ferreira AL, Falqueto A, Grimaldi G, Peixoto AA, Pinto IS (2013) Ecological and Epidemiological Aspects of the Sand Fly (Diptera, Psychodidae) Fauna of the National Monument of Pontões Capixabas, State of Espírito Santo, Southeastern Brazil. *Journal of Medical Entomology*, **50**, 1215-1223.
- Ferreira AL, Sessa PA, Varejão JBM, Falqueto A (2001) Distribution of sand flies (Diptera: Psychodidae) at different altitudes in an endemic region of American cutaneous leishmaniasis in the state of Espírito Santo, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **96**, 1061-1067.
- Figueira EAG, Silva G, Chagas ECS, Shimabukuro PHF (2013) Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) from Lábrea, state of Amazonas, Brazil, with a description of *Evandromyia (Aldamyia) apurinan* Shimabukuro, Figueira & Silva, sp. nov. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **108**, 280-287.
- Filatov DA (2002) ProSeq: A software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence data sets. *Molecular Ecology Notes*, **2**, 621-624.
- Floch H, Abonnenc E (1941) Phlébotomes de La Guyane Française (II). *Institut Pasteur de la Guyane et du territoire de l'Inini*, **28**, 1-16.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R., Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse

- metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, **3**, 294–299.
- França C (1920) Observations sur le genre *Phlebotomus*. II. Phlébotomes du Nouveau Monde (*Phlebotomus* du Brésil et du Paraguay). *Bulletin Société Potugaise des Sciences Naturelles*, **8**, 215-36.
- França C (1924) Notes parasitologiques. IV. Phlebotomes. *Journal de Sciencias Matematicas, Fisicas e Naturais*, **3**, 22-25.
- França C, Parrot L (1920) Introducion à l'étude systématique des Diptères du genre *Phlebotomus*. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, **13**, 695-708.
- França C, Parrot L (1921) Essai de classification des Phlébotomes. *Archives des Instituts Pasteur de L'Afrique du Nord*, **1**, 279-284.
- Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, **147**, 915-925.
- Fu YX, Li WH (1993) Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, **133**, 693-709.
- Galati EAB (1995) Phylogenetic systematics of the Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) with emphasis on American groups. *Boletín de La Dirección de Malariologia y Saneamiento Ambiental*, **35**, 133-142.
- Galati EAB (2003) Morfologia e Taxonomia. In: Flebotomíneos do Brasil. E.F. Rangel and R. Lainson (eds.) p. 23-176. Fiocruz, Rio de Janeiro, iii + 367.
- Galati EAB (2003a) Morfologia, terminologia de adultos e identificação dos táxons da América. In Flebotomíneos do Brasil (E.F. Rangel & R. Lainson, org.). Fiocruz, Rio de Janeiro, p.53-175.
- Galati EAB (2003b) Classificação de Phlebotominae. In: Flebotomíneos do Brasil (E.F. Rangel & R. Lainson, org.). Fiocruz, Rio de Janeiro, p.23-51.
- Galati EAB (2014) Phlebotominae (Diptera, Psychodidae). Classificação, morfologia, terminologia e identificação de Adultos. Apostila da Disciplina HEP 5752 - Bioecologia e Identificação de Phlebotominae 2014, Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo. <[www.fsp.usp.br/~egalati](http://www.fsp.usp.br/~egalati)>. Accessed on 22 august 2014.
- Galati EAB, Marassá AM, Fonseca MB, Gonçalves-Andrade RM, Consales CA, Bueno EFM (2010c) Phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in the Speleological Province of the Ribeira Valley: 3. Serra district - area of hostels for tourists who visit the Parque Estadual do Alto Ribeira (PETAR), state of São Paulo, Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*, **54**, 665–676.

- Galati EAB, Marassá AM, Gonçalves-Andrade RM, Bueno EFM, Paiva BR, Malafronte RS (2010d) *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva) and *Nyssomyia neivai* (Pinto) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in a sympatric area: seasonal and nocturnal hourly rhythm in black and white modified Shannon traps. *Revista Brasileira de Entomologia*, **54**, 677-686.
- Galati EAB, Marassá AM, Gonçalves-Andrade RM, Consales CA, Bueno EMF. (2010a) Phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in the Ribeira Valley Speleological Province 1. Parque Estadual Intervales, state of São Paulo, Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*, **54**, 311-321.
- Galati EAB, Marassá AM, Gonçalves-Andrade RM, Consales CA, Bueno EFM. (2010b) Phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in the Speleological Province of the Ribeira Valley: 2. Parque Estadual do Alto Ribeira (PETAR), São Paulo State, Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*, **54**, 477-487.
- Galati EAB, Marassá AM, Gonçalves-Andrade RM, Consales CA, Bueno EMF (2010) Phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in the Ribeira Valley Speleological Province 1. Parque Estadual Intervales, state of São Paulo, Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*, **54**, 311–321.
- Galati EAB, Marassá AM, Gonçalves-Andrade RM, Consales CA, Bueno EFM (2010) Phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in the Speleological Province of the Ribeira Valley: 2. Parque Estadual do Alto Ribeira (PETAR), São Paulo State, Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*, **54**, 477–487.
- Galati EAB, Santos DR, Silva AM (2007) *Brumptomyia angelae*, a new species of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) of the Atlantic forest of the state of Paraná, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **102**(6), 701-705.
- Galati EAB, Andrade-Filho JD, Falcão AL (2002) *Micropygomyia ferreirana* (Barretto, Martins & Pellegrino) as senior synonym of *Micropygomyia borgmeieri* (Martins, Falcão & Silva) and denunciation of a error of identification related to this taxon. *Entomología y Vectores*, **9** (Supplement 1), 156-157. [Abstract]
- Gil LHS, Basano SA, Souza AA, Silva MGS, Barata I, Ishikawa EA, Camargo LMA, Shaw JJ (2003) Recent observations on the sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna of the State of Rondônia, Western Amazônia, Brazil: the importance of *Psychodopygus davisi* as a vector of zoonotic cutaneous leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **98**, 751-755.

- Gorczyca M, Hall JC (1987) The INSECTAVOX, an integrated device for recording and amplifying courtship songs of *Drosophila*. *Drosophila Information Service*, **66**, 157-160.
- Guernaoui S, Boumezzough A, Laamrani A (2006) Altitudinal structuring of sand flies (Diptera: Psychodidae) in the High-Atlas mountains (Morocco) and its relation to the risk of leishmaniasis transmission. *Acta Tropica*, **97**, 246-351.
- Guerra JAO, Barbosa MGV, Paes MG, Sousa RT, Silva PG, Silva MJ, Macião AR, Carvalho RS, Coelho LIARC, Ferreira LCL (2011) Mucosal Leishmaniasis – Clinical and Epidemiological Aspects of 234 Cases Treated in a Tertiary Reference Center in the Brazilian Amazon. *Journal of Community Medicine & Health Education*, **1**, 1–4.
- Guimarães VCFV, Costa PL, Silva FJ, Silva KT, Silva KG, Araújo AIF, Rodrigues EHG, BrandãoFilho SP (2012) Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in São Vicente Férrer, a sympatric area to cutaneous and visceral leishmaniasis in the state of Pernambuco, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **45**, 66–70.
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O (2010) New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, **59**, 307-321.
- Gutiérrez MAC, Vivero RJ, Vélez ID, Porter CH, Uribe S (2014) DNA Barcoding for the identification of sand fly species (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in Colombia. *Plos One*, **9**, e85496.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**, 95-98.
- Hamilton JG, Brazil RP, Maingon R (2004) A fourth chemotype of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from Jaibas, Minas Gerais State, Brazil. *Journal of Medical Entomology*, **41**, 1021-1026.
- Hamilton JG, Maingon RD, Alexander B, Ward RD, Brazil RP (2005) Analysis of the sex pheromone extract of individual male *Lutzomyia longipalpis* sandflies from six regions in Brazil. *Medical and Veterinary Entomology*, **19**, 480-488.
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: Palaeontological Statistics software package for education and data analysis. *Palaentologia Electronica*, **4**, 1–9.
- Harpending HC (1994) Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology*, **66**, 591-600.



- Harper JL, Hawksworth DL (1994) Biodiversity: measurement and estimation. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, **345**, 5–12.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR (2003a) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **270**, 313–321.
- Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W (2004) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the Neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* , **101**, 14812–14817.
- Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR (2003b) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **270**, S96–S99.
- Hennig W (1972) Insektenfossilien aus der unteren Kreide. IV. Psychodidae (Phlebotominae), mit einer kritischen Übersicht über das phylogenetische System der Familie und die bisher beschriebenen Fossilien (Diptera). *Stuttgarter Beiträge zur Naturkunde*, **241**, 1-67.
- Hodgkinson VH, Birungi J, Quintana M, Dietze R, Munstermann LE (2003) Mitochondrial cytochrome b variation in populations of the visceral leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* across eastern Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **69**, 386-392.
- Hudson RR, Slatkin M, Maddison WP (1992) Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics*, **132**, 583-589.
- IBGE - Brazilian Institute of Geography and Statistics: Available: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>. Acessado em 06 julho 2014.
- IPEMA - Instituto de Pesquisas da Mata Atlântica. 2005. Conservação da Mata Atlântica no estado do Espírito Santo: cobertura florestal, unidades de conservação e fauna ameaçada. Vitória: Programa Centros para a Conservação da Biodiversidade /Conservação Internacional do Brasil/Instituto de Pesquisas da Mata Atlântica. Vitória, Espírito Santo, Brazil.
- Jowett T (1998) Preparation of nucleic acids. In: *Drosophila: A practical approach*, Roberts DB (Ed.), IRL Press, Oxford, pp. 347–371.
- Justiniano SCB, Chagas AC, Pessoa FAC, Queiroz RG (2004) Comparative biology of two populations of *Lutzomyia umbratilis* (Diptera: Psychodidae) of central

- Amazonia, Brazil, under laboratory conditions. *Brazilian Journal of Biology*, **64**, 227–235.
- Kerr KCR, Stoeckle MY, Dove CJ, Weigt LA, Francis CM, Hebert PDN (2007) Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. *Molecular Ecology Notes*, **7**, 535-543.
- Kertész K (1903) Katalog der Paläarktischen Dipteren. I. Orthorrhapha Nematocera. Budapest.
- Killick-Kendrick R (1990) Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Medical and Veterinary Entomology*, **4**, 1- 24.
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, **16**, 111–120.
- Kumar NP, Srinivasan R, Jambulingam P (2012) DNA barcoding for identification of sand flies (Diptera: Psychodidae) in India. *Molecular Ecology Resources*, **12**, 414–420.
- Ladeia-Andrade S, Fé NF, Sanguinette CC, Andrade-Filho JD (2014) Description of *Trichophoromyia uniniensis*, a new phlebotomine species (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of Amazonas State, Brazil. *Parasites & Vectors*, **7**, 400.
- Lainson R, Rangel EF (2005) *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **100**, 811-827.
- Lainson R, Shaw JJ, Ward RD, Fraiha H (1973). Leishmaniasis in Brazil, IX. Considerations on the *Leishmania braziliensis* complex, importance of sandflies of the genus *Psychodopygus* (Mangabeira) in the transmission of *L. braziliensis braziliensis* in north Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **67**, 184–196.
- Lainson R, Shaw JJ (1998) New World leishmaniasis The Neotropical *Leishmania* species, pp. 241–266. In L. Collier, A. Baeows, M. Sussman (eds.), Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Parasitology. Arnold, London.
- Lanzaro GC, Alexander B, Mutebi JP, Montoya-Lerma J, Warburg A (1998) Genetic variation among natural and laboratory colony populations of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae) from Colombia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **93**, 65-69.

- Lanzaro GC, Ostrovska K, Herrero MV, Lawyer PG, Warburg A (1993) *Lutzomyia longipalpis* is a species complex: genetic divergence and interspecific hybrid sterility among three populations. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **48**, 839-847.
- Lawler JJ, White D, Sifneos JC, Master LL (2003) Rare Species and the Use of Indicator Groups for Conservation Planning. *Conservation Biology*, **17**, 875–882.
- Lewis DJ, Young DG, Fairchild GB, Minter DM (1977) Proposal for a stable classification of the Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). *Systematic Entomology*, **2**, 319–332.
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, **25**, 1451-1452.
- Lins RMMA, Oliveira SG, Souza NA, de Queiroz RG, Justiniano SCB, Ward RD, Kyriacou CP, Peixoto AA (2002) Molecular evolution of the cacophony IVS6 region in sandflies. *Insect Molecular Biology*, **11**, 117–122.
- Lins RMMA, Souza NA, Brazil RP, Maingon RDC, Peixoto AA (2012) Fixed differences in the *paralytic* gene define two lineages within the *Lutzomyia longipalpis* complex producing different types of courtship songs. *PLoS ONE*, **7**, e44323
- Luz E, Membrive N, Castro EA, Dereure J, Pratlong J, Dedet A, Pandey A, Thomaz-Soccol V (2000) *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as vector of *Leishmania (V). braziliensis* in Paraná State, southern Brazil. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **94**, 623–631.
- Mangabeira O (1969) Sobre a sistemática e biologia dos flebótomos do Ceará. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*, **21**, 3-26.
- Marcondes CB (2007) A proposal of generic and subgeneric abbreviations for Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the world. *Entomological News*, **118**, 351-356.
- Marcondes CB, Day JC, Ready PD (1997) Introgression between *Lutzomyia intermedia* and both *Lu. neivai* and *Lu. whitmani*, and their roles as vectors of *Leishmania braziliensis*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene*, **91**, 725-726.
- Marcondes CB, Santos-Neto LG, Lozovei AL (2001) Ecology of Phlebotomine sandflies (Diptera, Psychodidae) in Brazilian Atlantic Forest. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **34**, 255-260.

- Marcondes CB, Lozovei AL, Vilela JH (1998) Distribuição geográfica de flebotomíneos do complexo *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera, Psychodidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **31**, 51-58.
- Marcondes CB (2007) A proposal of generic and subgeneric abbreviations for Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the world. *Entomological News*, **118**, 351-356.
- Marcondes CB, Santos-Neto LG, Lozovei AL (2001) Ecology of Phlebotomine sandflies (Diptera, Psychodidae) in Brazilian Atlantic Forest. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **34**, 255–260.
- Martins AV, Falcão AL, Silva JE (1975) Estudo sobre os flebótomos do estado de Minas Gerais. X – Descrição das fêmeas de *Lutzomyia microps* (Mangabeira, 1942) e *Lutzomyia firmatoi* (Barretto, Martins & Pelegriano, 1965) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Revista Brasileira de Biologia*, **35**, 259-263.
- Martins AV, Silva JE (1965) *Barretomyia* subg. n., novo subgênero de *Lutzomyia* França, 1924 (Diptera, Psychodidae), com a descrição de uma espécie nova. *Ciência Cultura*, **17**, 235-236.
- Martins AV, Williams P, Falcão AL (1978) *American Sand Flies*. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, 195 p.
- Martins AV, Silva JE, Falcão AL (1971) Nova espécie de flebótomo do Estado do Paraná, Brasil. *Brumptomyia ortizi* sp. n. (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Boletim do Museu de História Natural da Universidade Federal de Minas Gerais*, **9**, 71-77.
- Martins LM, Rebêlo JMM, Santos MCFV, Costa JML, Silva AR, Ferreira LA (2004) Ecoepidemiologia da leishmaniose tegumentar no Município de Buriticupu, Amazônia do Maranhão, Brasil, 1996 a 1998. *Cadernos de Saúde Pública*, **20**, 735–743.
- Mazzoni CJ, Araki AS, Ferreira GEM, Azevedo RVDM, Barbujani G, Peixoto AA (2008) Multilocus analysis of introgression between two sand fly vectors of leishmaniasis. *BMC Evolutionary Biology* 2008, **8**, 141.
- Mazzoni CJ, Gomes CA, Souza NA, de Queiroz RG, Justiniano SC, Ward RD, Kyriacou CP, Peixoto AA (2002) Molecular evolution of the *period* gene in sandflies. *Journal of Molecular Evolution*, **55**, 553-562.
- Mazzoni CJ, Souza NA, Andrade-Coelho C, Kyriacou CP, Peixoto AA (2006) Molecular polymorphism, differentiation and introgression in the *period* gene

- between *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia whitmani*. *BMC Evolutionary Biology*, **6**, 85.
- Missawa NA, Veloso MA, Maciel GB, Michalsky EM, Dias ES (2011) Evidence of transmission of visceral leishmaniasis by *Lutzomyia cruzi* in the municipality of Jaciara, State of Mato Grosso, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **44**, 76-78.
- Mittermeier RA, Myers N, Thomsen JB, Fonseca GAB da, Olivieri S (1998) Biodiversity Hotspots and Major Tropical Wilderness Areas: Approaches to Setting Conservation Priorities. *Conservation Biology*, **12**(3): 516-520.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, **403**, 853–858.
- Munstermann LE, Morrison AC, Ferro C, Pardo RH, Torres M (1998) Genetic structure of local populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in central Colombia. *Journal of Medical Entomology*, **35**, 82-89.
- Mukhopadhyay J, Ghosh K, Rangel EF, Munstermann LE (1998) Genetic variability in biochemical characters of Brazilian Field populations of the *Leishmania* vector, *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **59**, 893-901.
- Mutebi JP, Rowton E, Herrero MV, Ponce C, Belli A, Valle S, Lanzaro GC (1998) Genetic variability among populations of the sand fly, *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from Central America. *Journal of Medical Entomology*, **35**, 169-174.
- Nei M, Kumar S (2000) *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Nekola JC, White PS (1999) The distance decay of similarity in biogeography and ecology. *Journal of Biogeography*, **26**, 867-878.
- Oliveira AG, Galati EAB, Fernandes CE, Dorval MEC, Brazil RP (2012) Ecological aspects of phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in endemic area of Visceral leishmaniasis, Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Journal of Medical Entomology*, **49**, 43-50.
- Oliveira AI, Paula PH (2011) Perfil Epidemiológico dos Casos de Leishmaniose no Município de Itaperuna – RJ: De Janeiro de 2006 a Outubro de 2009. *Acta Biomedica Brasiliensia*, **2**, 1-11.
- Orme CDL, Davies RG, Burgess M, Eigenbrod F, Pickup N, Olson VA, Webster AJ, Ding TS, Rasmussen PC, Ridgely RS, Stattersfield AJ, Bennett PM, Blackburn

- TM, Gaston KJ, Owens IPF (2005) Global hotspots of species richness are not congruent with endemism or threat. *Nature*, **436**, 1016–1019.
- Pape T, Blagoderov V, Mostovski MB (2011) Order DIPTERA Linnaeus 1758. *Animal Biodiversity: An Outline of Higher-Level Classification and Survey of Taxonomic Richness* (ed. by Z.Q. Zhang), 1–237. *Zootaxa*, **3148**, 222–229.
- Peel MC, Finlayson BL, McMahon TA (2007) Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. *Hydrology and Earth System Sciences*, **11**, 1633–1644.
- Peters W, Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick R (1987) *The Leishmaniases in Biology and Medicine: Biology and Epidemiology*, V. 1, Academic Press, Oxford.
- Peterson AT, Shaw J (2003) *Lutzomyia* vectors for cutaneous leishmaniasis in southern Brazil: ecological niche models, predicted geographic distribution, and climate change effects. *International Journal of Parasitology*, **33**, 919–931.
- Pinto IS, Ferreira AL, Valim V, Carvalho FS, Silva GM, Falcão AL, Dietze R, Falqueto A (2012a) Sand fly vectors (Diptera, Psychodidae) of American visceral leishmaniasis areas in the Atlantic Forest, State of Espírito Santo, Brazil. *Journal of Vector Ecology*, **37**, 90-96.
- Pinto IS, Filho JD, Santos CB, Falqueto A, Leite YL (2010a) Phylogenetic relationships among species of *Lutzomyia*, subgenus *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*, **47**, 16–21.
- Pinto IS, Pires JG, Santos CB, Virgens TM, Leite GR, Ferreira AL, Falqueto A (2008) First record of *Nyssomyia yuilli yuilli* (Young & Porter) and *Trichopygomyia longispina* (Mangabeira) (Diptera: Psychodidae) in the state of Espírito Santo, Brazil. *Biota Neotropica*, **8**, 221-223.
- Pinto IS, Santos CB, Ferreira AL, Falqueto A (2009) Primeiro registro de *Evandromyia (Aldamyia) sericea* (Floch & Abonnenc) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) para a região Sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*, **53**, 487-489.
- Pinto IS, Santos CB, Ferreira AL, Falqueto A (2010b) Variations in the gonostyle of *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae). *Neotropical Entomology*, **39**, 732-735.
- Pinto IS, Santos CB, Ferreira AL, Falqueto A (2010c) American visceral leishmaniasis dissociated from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae) in the State of Espírito Santo, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, **26**, 365-372.

- Pinto IS, Santos CB, Ferreira AL, Falqueto A (2010d) Richness and diversity of sand flies (Diptera, Psychodidae) in an Atlantic rainforest reserve in southeastern Brazil. *Journal of Vector Ecology*, **35**, 325-332.
- Pinto IS, Tonini JFR, Ferreira AL, Falqueto A (2012b) A brief inventory of sand flies (Diptera, Psychodidae) from the National Forest of the Rio Preto, state of the Espírito Santo, southeastern Brazil. *Biota Neotropica*, **12**, 323-326.
- Pinto IS, Loss ACC, Falqueto A, Leite YLR (2009) Pequenos mamíferos não voadores em fragmentos de Mata Atlântica e áreas agrícolas em Viana, Espírito Santo, Brasil. *Biota Neotropica*, **9**, 355-360.
- Pinto, IS, Ferreira AL, Valim V, Carvalho FS, Silva GM, Falcão AL, Dietze R, Falqueto A (2012a) Sand fly vectors (Diptera, Psychodidae) of American visceral leishmaniasis areas in the Atlantic Forest, State of Espírito Santo, Brazil. *J Vect. Ecol.* 37: 90-96.
- Pita-Pereira D, Alves CR, Souza MB, Brazil RP, Bertho AL, Barbosa AF, Britto C (2005) Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridization assay. *Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene*, **99**, 905-913.
- Pita-Pereira D, Cardoso MAB, Alves CR, Brazil RP, Britto C (2008) Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using PCR multiplex assay. *Acta Tropica*, **107**, 66-69.
- Pita-Pereira D, Souza GD, Zwetsch A, Alves CR, Britto C, Rangel EF (2009) First report of *Lutzomyia (Nyssomyia) neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) naturally infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a periurban area of south Brazil using a multiplex polymerase chain reaction assay. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **80**, 593-595.
- Posada D, Crandall KA, Templeton AR (2000) GeoDis: a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Molecular Ecology*, **9**, 487-488.
- Powell J (1983) Interspecific cytoplasmic gene flow in the absence of nuclear gene flow: evidence from *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **80**, 492-495.

- Pugedo H, Barata RA, França-Silva JC, Silva JC, Dias ES (2005) HP: um modelo aprimorado de armadilha luminosa de sucção para a captura de pequenos insetos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **38**, 70-72.
- Puillandre N, Lambert A, Brouillet S, Achaz G (2012) ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*, **21**, 1864-1877.
- Rambaut A (2012) FigTree: Tree Figure Drawing Tool .Version 1.4.0 <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> (last access 23 march 2014).
- Ramos-Onsins SE, Rozas J (2002) Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution*, **19**, 2092-2100.
- Rangel EF, Lainson R (2003) Flebotomíneos do Brasil. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, 368p.
- Rangel EF, Ryan L, Lainson R, Shaw JJ (1985) Observations on the sandfly (Diptera: Psychodidae) fauna of Além Paraíba, state of Minas Gerais, Brazil, and the isolation of a parasite of the *Leishmania braziliensis* complex from *Psychodopygus hirsuta hirsuta*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **80**, 373-374.
- Rangel EF (1995) Transmission of American cutaneous leishmaniasis in peridomestic foci in Rio de Janeiro State and other similar situations compared to the classical epidemiology in Amazon region. In Proceedings from a Research Seminar on Tropical Diseases, Society and the Environment. Geneva: Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases/SAREC, **2**, 103–110.
- Ready PD, Day JC, Souza AA, Rangel EF, Davies CR (1997) Mitochondrial DNA characterization of populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) incriminated in the peri-domestic and silvatic transmission of *Leishmania* species in Brazil. *Bulletin of Entomological Research*, **87**, 187-195.
- Ready P (2013) Biology of Phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annual Review Entomology*, **58**, 227-250.
- Ready PD (2014) Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clinical Epidemiology*, **6**, 147–154.
- Rezende GR, Sessa PA, Ferreira AL, Santos CB, Leite GR, Falqueto A (2009) Efeitos da implantação da Usina Hidrelétrica de Rosal, Rio Itabapoana, Estados do Espírito Santo e Rio de Janeiro, sobre anofelinos, planorbídeos e flebotomíneos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **42**, 160-164.



- Ricklefs RE, Schluter D (1993) Species diversity in ecological communities: Historical and geographical perspectives. University of Chicago Press, Chicago.
- Ridley M (2004) Evolution. 3rd edition. Malden: Blackwell Publishing.
- Rivera J, Currie DC (2009) Identification of Nearctic black flies using DNA barcodes (Diptera: Simuliidae). *Molecular Ecology Resources*, **9**, 224–236.
- Rocha LS, Falqueto A, Santos CB, Ferreira AL, Graça GC, Grimaldi Jr G, Cupolillo E (2010) Survey of natural infection by *Leishmania* in sand fly species collected in southeastern Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **104**, 461–466.
- Rodrigues AAF, Barbosa VA, Andrade Filho JD, Brazil RP (2013) The sandfly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the Parque Estadual da Serra da Tiririca, Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **108**, 943–946.
- Rondani C (1840) Sopra una specie di insetto dittero. *Memoria prima per servire alla ditteologia italiana*. Donati, Parma.
- Ruiz-Lopez F, Wilkerson RC, Conn JE, McKeon SN, Levin DM, Quiñones ML, Pova MM, Linton YM (2012) DNA barcoding reveals both known and novel taxa in the *Albitarsis* Group (*Anopheles*: *Nyssorhynchus*) of Neotropical malaria vectors *Parasites & Vectors*, **5**, 44.
- Sábio PB, Andrade AJ, Galati EAB (2014) Assessment of the taxonomic status of some species included in the Shannoni complex, with the description of a new Species of *Psathyromyia* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Journal of Medical Entomology*, **51**, 331–341.
- Salomón OD, Quintana MG, Bezzi G, Morán ML, Betbeder E, Valdéz DV (2010) *Lutzomyia migonei* as putative vector of visceral leishmaniasis in La Banda, Argentina. *Acta Tropica*, **113**, 84–87.
- Sambrook D, Russell J (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbour: CSHL Press. 2100p.
- Sanguinette CC, Faustino JX, Meira PCS, Botelho HA, Carvalho GM, Gontijo CM, Filho JD (2013) Anomalies in the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in Brazil. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **29**, 54–58.
- Santos AMM, Cavalcanti DR, Silva JMC, Tabarelli M (2007) Biogeographical relationships among tropical forests in north-eastern Brazil. *Journal of Biogeography*, **34**, 437–446.

- Santos DR, Ferreira AC, Bisetto-Junior A (2012) The first record of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the State of Paraná, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **45**, 643-645.
- Santos DR, Santos AR, Poiani LP, Oliveira O, Silva AM, Galati EAB (2009) Ocorrência de *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae) e Fauna Associada, no Paraná. *Neotropical Entomology*, **38**, 298-301.
- Saraiva L, Lopes JS, Oliveira GBM, Batista FA, Falcão AL, Andrade-Filho JD (2006) Estudo dos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área de leishmaniose tegumentar americana nos municípios de Alto Caparaó e Caparaó, Estado de Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **39**, 56-63.
- Savani ESMM, Nunes VLB, Galati EAB, Castilho TM, Zampieri RA, FloterWinter LM (2009) The finding of *Lutzomyia almerioi* and *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania* spp. in a cutaneous and canine visceral leishmaniasis focus in Serra da Bodoquena, Brazil. *Veterinary Parasitology*, **160**, 18–24.
- Scarpassa VM, Alencar RB (2012) *Lutzomyia umbratilis*, the main vector of *Leishmania guyanensis*, represents a novel species complex? *PloS One*, **5**, e37341.
- SEAMA - Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Recursos Hídricos (2008) Atlas de Ecossistemas do Estado do Espírito Santo. UFV, Vitória, Espírito Santo, Brazil.
- Shannon RC, Del Ponte E (1927) Cuatro notas sobre especies nuevas de dipteros nematóceros, hematófagos o no, de la República Argentina. *Revista del Instituto de Bacteriología Departamento Nacional de Higiene*, **4**, 724-736.
- Shimabukuro PHF, Silva TRR, Ribeiro FOF, Baton LA, Galati EAB (2010) Geographical distribution of American cutaneous leishmaniasis and its phlebotomine vectors (Diptera: Psychodidae) in the state of São Paulo, Brazil. *Parasites & Vectors*, **3**, 121-132.
- Shimabukuro PHF, Tolezano JE, Galati EAB (2011) Chave de identificação ilustrada dos Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do estado de São Paulo, Brasil. *Papéis Avulsos de Zoologia (São Paulo)*, **51**, 399-441.
- Shimabukuro PHF, Marassá AM, Galati EAB (2007) *Brumptomyia carvalhoi* sp. nov. (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from Atlantic forest domain, São Paulo State, Brazil. *Zootaxa*, **1637**, 47-54.

- Shimabukuro PHF, Galati EAB (2011) Checklist dos Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do Estado de São Paulo, Brasil, com comentários sobre sua distribuição geográfica. *Biota Neotropica* 11(1a): [online] URL: <http://www.biotaneotropica.org.br/v11n1a/pt/abstract?inventory+bn0361101a2011>.
- Sinclair BJ, Borkent A, Wood DM (2007) The male genital tract and aedeagal components of the Diptera with a discussion of their phylogenetic significance. *Zoological Journal of the Linnean Society*, **150**, 711–742.
- Souza NA, Ward RD, Hamilton JG, Kyriacou CP, Peixoto AA (2002) Copulation songs in three siblings of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **96**, 102-103.
- Souza NA, Vigoder FM, Araki AS, Ward RD, Kyriacou CP, et al. (2004) Analysis of the copulatory courtship songs of *Lutzomyia longipalpis* in six populations from Brazil. *Journal of Medical Entomology*, **41**, 906-913.
- Souza NA, Andrade-Coêlho CA, Vilela ML, Rangel EF (2001) The Phlebotominae sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna of two Atlantic Rain Forest reserves in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **9**, 319-324.
- Souza-Rocha L, Falqueto A, Santos CB, Ferreira AL, Graça GC, Grimaldi Jr G, Cupolillo E (2010) Survey of natural infection by *Leishmania* in sand fly species collected in southeastern Brazil. *Transactions Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **104**, 461–466.
- Spiegel CN, Brazil RP, Soares MJ (2002) Ultrastructure of male sex pheromone glands in abdominal tergites of five *Lutzomyia* sandfly species (Diptera: Psychodidae). *Arthropod Structure & Development*, **30**, 219-227.
- StatSoft, Inc. (2011) STATISTICA (data analysis software system), version 10. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).
- Stirling G, Wilsey B (2001) Empirical Relationships between Species Richness, Evenness, and Proportional Diversity. *American Naturalist*, **158**, 286–299.
- Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, **123**, 585-595.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, and Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, **30**, 2725-2729.

- Templeton AR, Boerwinkle E, Sing CF (1987) A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. I. Basic theory and an analysis of alcohol dehydrogenase activity in *Drosophila*. *Genetics*, **117**, 343-351.
- Templeton AR, Crandall KA, Sing CF (1992) A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. cladogram estimation. *Genetics*, **132**, 619-633.
- Templeton AR, Sing CF (1993) A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. IV. Nested analyses with cladogram uncertainty and recombination. *Genetics*, **134**, 659-669.
- Theodor O (1948) Classification of the world species of the subfamily Phlebotominae (Diptera, Psychodidae). *Bulletin of Entomological Research*, **39**, 85-115.
- Theodor O (1965) On the classification of American Phlebotominae. *Journal of Medical Entomology*, **2**, 171-197.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, **22**, 4673-4680.
- Tolezano JE (1994) Ecoepidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis in the State of São Paulo, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **89**, 427-434.
- Tonini JFR, Carão LM, Pinto IS, Gasparini JLR, Leite YLR, Costa LP (2010) Nonvolant tetrapods from Duas Bocas Biological Reserve, state of Espírito Santo, southeastern Brazil. *Biota Neotropica*, **10**, 339-351.
- Torgerson DG, Lampo M, Velázquez Y, Woo PTK (2003) Genetic relationships among some species groups within the genus *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **69**, 484-493.
- Vieira VP, Ferreira AL, Santos CB, Leite GR, Ferreira GEM, Falqueto A (2012) Peridomestic breeding sites of Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in an endemic area of American cutaneous leishmaniasis in Southeastern Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **87**, 1089-1093.

- Vigoder FM, Araki AS, Bauzer LG, Souza NA, Brazil RP, Peixoto AA (2010) Lovesongs and period gene polymorphisms indicate *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) as a sibling species of the *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva, 1912) complex. *Infection, Genetics and Evolution*, **10**, 734-739.
- Virgens TM, Santos CB, Pinto IS, Silva KS, Leal FC, Falqueto A (2008) Phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae) in an American tegumentary leishmaniasis transmission area in northern Espírito Santo state, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, **24**, 2969-2978.
- Walker F (1851) *Insecta Britannica*. Diptera. 1. Reeve & Benham, London.
- Ward RD, Ribeiro AL, Ready PD, Murtagh A (1983) Reproductive isolation between different forms of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae), the vector of *Leishmania donovani chagasi* Cunha & Chagas and its significance to kala-azar distribution in South America. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **78**, 269-280.
- Ward RD, Ribeiro AL, Ryan L, Falcão AL, Rangel EF (1985) The distribution of two morphological forms of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **80**, 145-148.
- Ward R, Phillips A, Burnet B (1986) Genetic isolating mechanisms between different forms of the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae). *Annals dell'Istituto Superiore di Sanità*, **22**, 69-72.
- Ward RD, Phillips A, Burnet B, Marcondes CB (1988) The *Lutzomyia longipalpis* complex: reproduction and distribution. *Biosystematics of Haematophagus Insects*. Oxford: Clarendon Press. pp. 257-269.
- Watts PC, Hamilton JG, Ward RD, Noyes HA, Souza NA, Kemp SJ, Feliciangeli MD, Brazil R, Maingon RD (2005) Male sex pheromones and the phylogeographic structure of the *Lutzomyia longipalpis* species complex (Diptera: Psychodidae) from Brazil and Venezuela. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **73**, 734-743.
- WHO (World Health Organization) Expert Committee (2010) Control of the leishmaniases. Tech. Rep. Ser. 949. World Health Organization, Geneva.
- Wilsey BJ, Potvin C (2000) Biodiversity and ecosystem functioning: the importance of species evenness and identity in a Quebec old field. *Ecology*, **81**, 887-893.
- Woerner AE, Cox MP, Hammer MF (2007) Recombination-filtered genomic datasets by information maximization. *Bioinformatics*, **23**, 1851-1853.
- Wright S (1943) Isolation by distance. *Genetics*, **31**, 114-138.

- Young DG, Arias JR (1984) The microps group of *Lutzomyia* França with descriptions of two new species from South America (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **79**, 425-431.
- Young DG, Duncan MA (1994) Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Gainesville, FL: Associated Publishers. 881.
- Young DG, Fairchild GB (1974) Studies of Phlebotomine sand flies. *Annual Report*, Gainesville: Department of Entomology and Nematology, University of Florida, 152 p.