

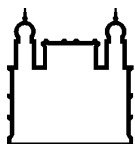
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação Biologia Computacional e Sistemas

ESTRUTURAÇÃO POPULACIONAL DE *Rhodnius neglectus*  
(HEMIPTERA: REDUVIIDAE), NO BIOMA CERRADO E EM  
ÁREAS DE TRANSIÇÃO CERRADO-CAATINGA

JESSICA CORRÊA ANTÔNIO

Rio de Janeiro  
Junho de 2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Computacional e Sistemas

*JESSICA CORRÊA ANTÔNIO*

Estruturação populacional de *Rhodnius neglectus* (Hemiptera: Reduviidae), no bioma cerrado e em áreas de transição cerrado-caatinga

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

**Orientador (es):** Prof. Dr. Fernando Araújo Monteiro  
Prof. Dr. Márcio Galvão Pavan

**RIO DE JANEIRO**

Junho de 2016

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

A635 Antônio, Jessica Corrêa

Estruturação populacional de *Rhodnius neglectus* (Hemiptera: Reduviidae), no bioma cerrado e em áreas de transição cerrado-caatinga / Jessica Corrêa Antônio. – Rio de Janeiro, 2016.

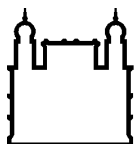
xv, 68 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Computacional e Sistemas, 2016.

Bibliografia: f. 48-59

1. *Rhodnius*. 2. *Rhodnius neglectus*. 3. Complexo de espécies. 4. Genética de populações. 5. Bioma caatinga. I. Título.

CDD 614.533



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Computacional e Sistemas**

***AUTOR: JESSICA CORRÊA ANTÔNIO***

### **ESTRUTURAÇÃO POPULACIONAL DE *RHODNIUS NEGLECTUS* (HEMIPTERA: REDUVIIDAE), NO BIOMA CERRADO E EM ÁREAS DE TRANSIÇÃO CERRADO-CAATINGA**

**ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Fernando Araújo Monteiro  
Prof. Dr. Márcio Galvão Pavan**

**Aprovada em: 08/julho/2016**

#### **EXAMINADORES:**

**Prof. Dr. Gonzalo Bello Bentacor (FIOCRUZ) – Presidente**

**Prof. Dr. Luiz Guilherme Soares da Rocha Bauzer (FIOCRUZ) – Membro Titular**

**Prof. Dr. Cristiano Valentim da Silva Lazoski (UFRJ) – Membro Titular**

**Prof. Dr. Márcio Félix (FIOCRUZ) - Suplente**

**Prof. Dr. Jacenir Reis dos Santos Mallet (FIOCRUZ) - Suplente**

Rio de Janeiro, 08 de julho de 2016

Dedico esta dissertação aos meus pais, Alonso e Glória, a minha irmã Aline e aos meus avós Marina (*in memoriam*) e Moacyr.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela Sua presença constante em minha vida, pelo auxílio nas minhas escolhas e por me confortar nas horas difíceis.

Aos meus pais, Gloria e Alonso, seres humanos excepcionais que com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida. Seus cuidados e dedicação foi que deram, em alguns momentos, a esperança que eu necessitava para seguir. A presença sempre constante de vocês significou segurança e certeza de que não estava sozinha nessa caminhada. Muito obrigada por sempre me apoiarem em todos os meus sonhos! Amo vocês!

Aos meus avós, Marina (*in memoriam*) e Moacyr, exemplos de amor e honestidade, figuras de grande importância em minha formação. Por serem meus segundos pais, pelos ensinamentos e por todo carinho que sempre recebi de vocês. Especialmente a minha vó que adoraria estar vendo sua neta se tornar Mestre depois de todo esforço nesses dois anos, obrigada por ter sido essa vó tão carinhosa e resmungona que foi, a saudade é eterna e dói como se fosse o primeiro dia! Muito obrigada por sempre estarem ao meu lado e me apoiarem! Amo vocês!

À minha irmã, Aline, que para mim é um exemplo a ser seguido de força de vontade, determinação e coragem. Muito obrigada por todo carinho, amizade, por todas as conversas e por todo incentivo a sempre seguir em frente. Ao meu cunhado, Dyogo, por sempre estar presente em todos os momentos me encorajando a seguir adiante e alçar voos mais altos. Amo vocês!

Ao meu orientador, Dr. Fernando Monteiro, pela oportunidade de trabalhar mais dois anos ao seu lado, pelos ensinamentos e por encorajar-me a seguir sempre adiante. Agradeço por toda disponibilidade, atenção e todo seu esforço na correção desta dissertação que a tornou muito mais enriquecida. Admiro você como pesquisador e orientador.

Ao meu orientador, Dr. Márcio Pavan, por todo ensinamento a mim dedicados ao longo desses anos, por mostrar-me os caminhos da pesquisa e despertar o desejo de continuar trilhando esse sonho. Nos agradecimentos de sua tese você disse que eu era seu “anjo da guarda”, na realidade não sei bem quem é o “anjo da guarda” de quem, o que sei é que você teve papel fundamental

em todas as etapas desse trabalho! Muito obrigada por todo seu esforço na correção da dissertação e por ser meu tão atencioso pai-científico. Admiro muito você e torço pelo seu sucesso sempre.

Ao Dr. Rodrigo Gurgel-Gonçalves (UnB), por colaborar com a obtenção das amostras que foram utilizadas neste trabalho e por sempre estar disposto a responder nossas dúvidas quando mais precisávamos.

Ao Dr. Luiz Guilherme Bauzer (FIOCRUZ), por aceitar ser revisor deste trabalho, com certeza você colaborou muito para o enriquecimento desta dissertação!

Aos demais integrantes da banca examinadora, Dr. Gonzalo Bello, Dr. Cristiano Lazoski, Dra. Jacenir Mallet e Dr. Márcio Félix, por terem aceitado o convite e pelas futuras sugestões para o enriquecimento do trabalho.

À Fundação Oswaldo Cruz e à coordenação de Pós-Graduação em Biologia Computacional e Sistemas do Instituto Oswaldo Cruz pela oportunidade de realizar esta dissertação. Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida durante os 24 meses de curso.

Ao Dr. Cléber Galvão (FIOCRUZ) por gentilmente ceder patas de espécimes identificados como *R. neglectus* da coleção de seu laboratório para a realização dos testes com os marcadores microssatélites.

À Plataforma PDTIS/FIOCRUZ, pela utilização do sequenciador automático e meu agradecimento em especial a Aline dos Santos Moreira, Beatriz Muller e Renata Almeida de Sá que sempre se mostraram dispostas a solucionar os problemas que surgiram no meio do caminho, por todas as conversas e me encorajar a sempre seguir em frente nos meus testes e não desanimar! Muito obrigada meninas!

À todos os membros do Laboratório de Epidemiologia e Sistemática Molecular (LESM), pela paciência, disponibilidade, por todas as conversas, incentivo e apoio em todas as horas. Muito obrigada por tornarem o laboratório mais divertido e uma segunda casa.

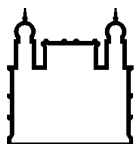
Às minhas “LESMAS” queridas, Andréia Lima, Beatriz Coronato, Carla Ribeiro, Carolina Martins, Karina Morelli, Marina Rodrigues e Paloma Martins, por todos os conselhos tanto na minha vida profissional quanto na pessoal. Ao

meu grande amigo que a Bahia me presenteou, João Paulo Correia, por todas as conversas e por me apresentar o programa Diva-Gis que proporcionou com que eu fizesse os mapas dessa dissertação.

À todos os meus outros grandes amigos que me ajudaram nos momentos difíceis, com palavras de conforto e sempre me animaram a seguir em frente, especialmente ao meu eterno amigo Edson Luiz que, infelizmente, nos deixou tão precocemente, e o que resta é a saudade e as lembranças do seu encorajamento e palavras de carinho para nunca desistirmos de nossos sonhos e sempre fazermos o que realmente nós amamos. “Do the evolution, baby!”.



“A nossa maior glória não reside no fato de nunca cairmos, mas sim em levantarmo-nos sempre depois de cada queda”. (Confúncio)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

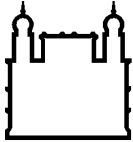
### TÍTULO DA DISSERTAÇÃO/TESE

#### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA COMPUTACIONAL E SISTEMAS

**Jessica Corrêa Antônio**

A doença de Chagas no bioma cerrado e em áreas de transição cerrado-caatinga pode ser transmitida por triatomíneos silvestres nativos e, portanto, estratégias tradicionais de controle vetorial (borrifração de inseticidas em casas infestadas por triatomíneos) são ineficazes. O desenvolvimento de novas estratégias destinadas especificadamente a vigilância e controle de vetores silvestres depende de informações básicas, como correta identificação taxonômica, delimitação da área de ocorrência da espécie e determinação de sua preferência ecológica. Estas informações podem ser obtidas através de estudos genético-populacionais dos vetores. *Rhodnius neglectus* é um triatomíneo silvestre que ocorre principalmente no bioma cerrado e é uma das espécies brasileiras de *Rhodnius* que apresenta a maior distribuição geográfica. Em um estudo prévio a partir do gene *mtcytb* foi observado que populações de *R. neglectus* do cerrado e de áreas de transição cerrado-caatinga, ao serem comparadas, apresentaram uma distância genética inesperadamente elevada, frente ao normalmente encontrado para espécies de *Rhodnius*, o que possivelmente poderia indicar que *R. neglectus* se trata de um complexo de espécies. Diante desse panorama, surgiu um questionamento se existe fluxo gênico entre o grupo de *R. neglectus* presente no cerrado e o grupo na área de transição cerrado-caatinga, ou se estas populações estariam ecologicamente isoladas, sofrendo, portanto, um possível processo de especiação. A partir da análise de oito *loci* de microssatélites de 258 espécimes de *R. neglectus* provenientes de 14 localidades amostradas no bioma cerrado e em áreas de transição cerrado-caatinga foi possível observar que as populações de *R. neglectus* provenientes destas regiões não estão geneticamente isoladas. Portanto, *R. neglectus* não representa um complexo de espécies e a área de transição cerrado-caatinga não age como uma barreira ecológica para a dispersão de suas populações. A população de Xique-Xique/Ibotirama (área de transição cerrado-caatinga) parece ter um papel fundamental na estrutura populacional de *R. neglectus* por fornecer migrantes para as demais populações. A dispersão de *R. neglectus* no bioma cerrado e áreas de transição cerrado caatinga possivelmente ocorreu da região norte do bioma cerrado em direção a região nordeste com a ocupação da área de transição cerrado-caatinga e posterior reocupação do bioma cerrado mais à oeste. As populações analisadas apresentam um grau moderado de estruturação populacional, provavelmente devido ao isolamento por barreiras naturais, tais como os rios, caso o fluxo gênico observado seja na realidade antigo. Porém, uma possível explicação para a manutenção do fluxo gênico recente entre as populações seria a dispersão passiva por aves.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO/TESE (em inglês)

### ABSTRACT

#### MASTER DISSERTATION IN COMPUTATIONAL BIOLOGY AND SYSTEMS

Jessica Corrêa Antônio

In the cerrado biome and cerrado-caatinga transitional areas, Chagas disease can be transmitted by native triatomines and, therefore, traditional vector control strategies (insecticide-based) are ineffective. The development of new strategies specifically designed for monitoring and control of sylvatic vectors depends on basic information, such as correct taxonomic identification, delimitation of species distribution and their ecological preferences. This information can be obtained through genetic population studies of vectors. *Rhodnius neglectus* is a sylvatic triatomine species that occurs mainly in the cerrado and is the *Rhodnius* species which has the largest geographical distribution in Brazil. A previous study using a 682-bp fragment of the mitochondrial cytochrome b gene highlighted that populations of cerrado and cerrado-caatinga transition areas have an unexpectedly high genetic distance, which could possibly indicate that *R. neglectus* represents a species complex. In this viewpoint, this work aimed to investigate if there is gene flow between population from cerrado and cerrado-caatinga transition area or if these populations are ecologically isolated and not conspecific. To answer this question, we analyzed 258 specimens of *R. neglectus* from 14 locations sampled in cerrado and cerrado-caatinga transition area with eight microsatellite loci. We found that *R. neglectus* does not represent a species complex. Indeed, populations from cerrado and cerrado-caatinga transition areas populations are not genetically isolated and, therefore, cerrado-caatinga transition area does not represent an ecological barrier to the dispersion of caatinga-cerrado populations. Indeed, *R. neglectus* population from Xique-Xique/Ibotirama (cerrado-caatinga transition) seems to have an important role on the population structure, since provides migrants to both Northern and Western populations from cerrado. We hypothesized that *R. neglectus* populations might have occupied the cerrado-caatinga transitional area from Northern Cerrado and posteriorly occupied western cerrado.

# INDÍCE

RESUMO	IX
ABSTRACT	X
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A doença de Chagas.....	1
1.2. O bioma cerrado e a doença de Chagas.....	2
1.3. Triatomíneos.....	3
1.3.1. Variabilidade morfológica em triatomíneos.....	4
1.4. A espécie em estudo: <i>Rhodnius neglectus</i> .....	7
1.5. Marcadores microssatélites e sua aplicação na análise da estrutura populacional de triatomíneos.....	10
2. OBJETIVOS	13
2.1. Objetivos Gerais.....	13
2.2. Objetivos Específicos.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. Descrição das amostras e extração do DNA.....	14
3.2. Análise de microssatélites.....	15
3.3. Análise dos dados.....	15
4. RESULTADOS	23
5. DISCUSSÃO	39
5.1. A escolha dos microssatélites para identificação da espécie em estudo: <i>Rhodnius neglectus</i> .....	39
5.2. Análise de estruturação das populações e filogeografia de <i>R. neglectus</i> .....	40
6. CONCLUSÕES	47
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
8. APÊNDICES	58
APÊNDICE 1: Variabilidade cromática em <i>R. nasutus</i> e <i>R. neglectus</i> .....	59
APÊNDICE 2: Variação fenotípica de <i>R. neglectus</i> proveniente de diferentes espécies de palmeiras e convergência cromática para o fenótipo típico de <i>R. nasutus</i> quando habitam a palmeira <i>Copernicia prunifera</i> .....	60
APÊNDICE 3: Árvore de consenso bayesiana de 35 sequências de <i>Rhodnius</i> e porcentagem da divergência genética entre <i>R. neglectus</i> , <i>R. nasutus</i> e <i>Rhodnius</i> spp.....	61
APÊNDICE 4: Métodos com base em sequências de ITS-2 para identificação das espécies.....	62

<b>APÊNDICE 5: Características gerais dos 19 <i>loci</i> de microssatélites.....</b>	<b>63</b>
<b>APÊNDICE 6: Reações multiplex para a amplificação das regiões microssatélites.....</b>	<b>64</b>
<b>APÊNDICE 7: Características gerais dos 12 <i>loci</i> padronizados.....</b>	<b>65</b>
<b>APÊNDICE 8: Frequência alélica encontrada em cada uma das localidades amostradas para os oito <i>loci</i> de microssatélites analisados.....</b>	<b>66</b>
<b>APÊNDICE 9: <i>Locí</i> microssatélites que apresentaram evidência de alelos nulos em cada população amostrada.....</b>	<b>67</b>
<b>APÊNDICE 10: <i>Locí</i> microssatélites com indício de desequilíbrio de ligação na comparação realizada entre os oito <i>loci</i> para cada população.....</b>	<b>68</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa dos biomas do Brasil.....	3
Figura 2. Mapa com a predição da distribuição geográfica de <i>R. neglectus</i> , <i>R. nasutus</i> e possíveis áreas de simpatria, baseado na modelagem de nicho ecológico.....	9
Figura 3. Hipóteses de dispersão testadas em uma macroescala.....	21
Figura 4. Localidades amostradas no bioma cerrado e em áreas de transição cerrado-caatinga.....	25
Figura 5. Gráfico representando o número de alelos por <i>locus</i> .....	26
Figura 6. Gráfico dos valores de verossimilhança para definição do número de agrupamentos .....	27
Figura 7. Gráfico da estruturação das 14 localidades analisadas.....	28
Figura 8. Rede de agrupamento populacional.....	35
Figura 9. Gráfico mostrando os valores de heterozigosidade observada e esperada por <i>locus</i> .....	36
Figura 10. Fluxo gênico inferido pela análise bayesiana para a hipótese com maior probabilidade de ser verdadeira.....	38
Figura 11. Espécimes adultos de <i>Rhodnius neglectus</i> e <i>Rhodnius nasutus</i> .....	40
Figura 12. Mapa de relevo e populações de <i>R. neglectus</i> amostradas no bioma cerrado e em áreas de transição cerrado-caatinga.....	42
Figura 13. Mapa de rios e populações de <i>R. neglectus</i> amostradas no bioma cerrado e em áreas de transição cerrado-caatinga.....	43
Figura 14. Origem e dispersão de <i>R. neglectus</i> no bioma cerrado e em áreas de transição cerrado-caatinga.....	44
Figura 15. Sobreposição entre os registros ocorrência de <i>R. neglectus</i> e áreas de distribuição das aves da família Furnariidae no Brasil.....	46

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Amostras de <i>R. neglectus</i> obtidas no bioma cerrado e em áreas de transição cerrado-caatinga.....	16
Tabela 2: Características gerais dos oito <i>loci</i> padronizados.....	24
Tabela 3: Número de espécimes genotipados por <i>locus</i> em cada localidade amostrada.....	25
Tabela 4: Frequência alélica encontrada em cada uma das sete populações para os oito <i>loci</i> de microssatélites analisados.....	30,31
Tabela 5: Teste chi-quadrado do equilíbrio de Hardy-Weinberg dos oito marcadores microssatélites das populações de <i>R. neglectus</i> .....	32
Tabela 6: Valores do índice modificado de Garza-Williamson.....	33
Tabela 7: Valores dos índices de $F_{ST}$ e $R_{ST}$ calculados a partir de comparações par-a-par das frequências alélicas interpopulacionais dos oito <i>loci</i> polimórficos analisados.....	34
Tabela 8: Valores dos componentes <i>degree</i> , <i>clustering</i> e <i>betweenness</i> .....	35
Tabela 9: Valores marginais dos logaritmos de verossimilhança dos modelos de dispersão de <i>R. neglectus</i> , calculados segundo o modelo harmônico e corrigidos pelo método de Bezier.....	37
Tabela 10: Valores marginais dos logaritmos de verossimilhança dos modelos de dispersão de <i>R. neglectus</i> , calculados segundo o modelo harmônico e corrigidos pelo método de Bezier.....	37

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C - graus Celsius

**DNA** – deoxyribonucleic acid ou ácido desóxi-ribonucléico

**et al.** – do latim *et alli*, que significa “e outros, e colaboradores”

**F<sub>ST</sub>** – Índice de fixação de Wright (1978)

**i.e.** - do latim *id est*, que significa “isto é”

**ITS-2** – segundo espaçador interno transcrito ribossomal

**MS/SVS** – Ministério da Saúde, Sistema de Vigilância em Saúde

**mtcytb** – gene mitocondrial citocromo b

**pb** – pares de base

**PCR** – *polymerase chain reaction* ou reação em cadeia da polimerase

**r** – índice do limite irregular

**RAPD** – *Random Amplification of Polymorphic DNA* ou polimorfismo no tamanho de fragmentos de restrição

**RNA** – *ribonucleic acid* ou ácido ribonucléico

**rRNA** – *ribosomal ribonucleic acid* ou ácido ribonucléico ribossomal

**s.l.** - *sensu lato*, que significa “senso mais amplo”

**s.s.** – *sensu stricto*, que significa “senso estrito”

**™** – *trademark* ou marca registrada

**v.** - versão



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. A doença de Chagas

A doença de Chagas, ou tripanossomíase americana, tem como agente etiológico o protozoário *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) e é transmitida principalmente pelo contato das fezes infectadas de vetores hematófagos da subfamília Triatominae com a corrente sanguínea ou mucosas dos hospedeiros (Chagas 1909). Quinze dos 18 gêneros da sub-família Triatominae contém espécies que podem transmitir o parasita aos humanos, sendo as principais presentes em *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*. Esses triatomíneos são comumente encontrados em fendas de paredes e tetos de habitações em áreas rurais e periurbanas da América Latina (Coura & Borges-Pereira 2010). O ciclo dessa enfermidade se modificou de enzoótico para antropozoonótico devido à invasão do ambiente silvestre e sua modificação pelo homem, à domesticação de animais silvestres e à construção de casas que podem ser facilmente colonizadas por vetores (Coura 2007).

Devido à inexistência de uma vacina eficaz ou tratamento aplicável em larga escala, foi proposto na “Iniciativa do Cone Sul” (1991) o controle dos bancos de sangue, através da triagem efetiva dos doadores, e sobretudo, o combate à transmissão vetorial, pela aplicação de inseticidas nas casas infestadas (Dias & Schofield 1998). Este consórcio internacional, coordenado pela Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), estimulou o combate da principal espécie vetora da doença de Chagas no Brasil, Argentina, Uruguai e Chile, o *Triatoma infestans*. Outras iniciativas surgiram posteriormente em países da região Andina e América Central (1997) a fim de combater outras espécies epidemiologicamente relevantes, como *Triatoma dimidiata*, *Rhodnius prolixus*, *Rhodnius pallescens* e *Rhodnius ecuadoriensis* (Dias *et al.* 2002).

Embora os programas de controle tenham obtido relativo sucesso, refletido na eliminação da transmissão da doença mediada por *T. infestans* em países onde a espécie não era autóctone e na diminuição em média de 94% da incidência de casos (OMS 2002), estima-se que além das 6–7 milhões de pessoas que estão infectadas por *T. cruzi* no mundo todo, que na América Latina, haja 100 milhões de pessoas vivendo em zonas endêmicas sob o risco de

infecção (OMS 2016). No Brasil existem aproximadamente 2 milhões de pessoas infectadas e 22 milhões sob o risco de contrair esta doença (OPAS 2006).

O principal problema encontrado pelos programas de controle vetorial é a reinfestação, por populações silvestres de vetores autóctones, de domicílios previamente tratados com inseticidas. Isto se deve a habilidade de certas espécies de triatomíneos silvestres em colonizar ambientes modificados pelo homem, como, por exemplo, populações de *T. infestans* que frequentemente reinfestam habitações previamente tratadas no Chaco da Bolívia, Argentina e Paraguai (Abad-Franch *et al.* 2010; Ceballos *et al.* 2011; Quisberth *et al.* 2011), assim como as populações silvestres de *R. prolixus* fazem na Venezuela e Colômbia (Fitzpatrick *et al.*; 2008; Guhl *et al.*; 2009). Outras espécies de Triatominae, como *Rhodnius nasutus*, *Rhodnius neglectus*, *Rhodnius stali*, *R. ecuadoriensis*, *R. pallescens*, *Triatoma maculata*, *T. dimidiata*, *Panstrongylus herreri* e *Panstrongylus geniculatus*, têm capacidade de colonizar ambientes artificiais em algumas regiões de suas áreas de ocorrência (Abad & Monteiro 2007).

A partir deste panorama, governantes e pesquisadores perceberam a importância de identificar corretamente os táxons envolvidos e delimitar precisamente suas áreas de ocorrência para a elaboração de novos métodos de vigilância e controle de populações de triatomíneos silvestres.

## **1.2. O bioma cerrado e a doença de Chagas**

O bioma cerrado apresenta uma área total de aproximadamente 2 milhões km<sup>2</sup> e abrange os estados brasileiros do Tocantins, Maranhão, Piauí, Bahia, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais, São Paulo, uma pequena área do Paraná, além do Distrito Federal. O clima dominante neste bioma é tropical quente sub-úmido, com duas estações definidas, uma seca e a outra chuvosa. A precipitação é variável entre 600 e 2200 mm de chuva anuais, sendo as áreas limítrofes com o bioma caatinga e amazônia as regiões que recebem os mais baixos e mais altos volumes anuais de chuva, respectivamente (IBGE 2004). Este bioma é limitado pelos biomas amazônia, caatinga, pantanal e mata atlântica, como pode ser observado na Figura 1.

Na área do bioma cerrado foram registrados 102 casos confirmados de doença de Chagas aguda de 2000 a 2013, sendo 27 casos decorrentes de

transmissão vetorial. O estado que apresentou o maior número de casos foi o Maranhão (24 casos), seguido dos estados de Tocantins e Goiás com 23 ocorrências, cada (SVS/MS 2015). Em alguns estados como o Piauí, São Paulo, Goiás e Minas Gerais já houve relatos da ocorrência de triatomíneos no interior das casas e no peridomicílio (Barreto 1979; Silveira *et al.* 2001).



**Figura 1:** Mapa dos biomas do Brasil (IBGE 2004, disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm>).

### 1.3. Triatomíneos

A subfamília Triatominae está inserida na ordem Hemiptera, família Reduviidae e agrupa insetos, denominados triatomíneos, que são hematófagos obrigatórios, onde a maioria se alimenta preferencialmente em animais endotérmicos, porém existem casos em que os triatomíneos também sugam o sangue de animais exotérmicos ou até mesmo a hemolinfa de invertebrados (Miles *et al.* 1981, Sandoval *et al.* 2004; Freitas *et al.* 2005). Esta sub-família é composta pelas tribos Triatomini, Rhodniini, Cavernicolini, Bolboderini e Alberproseniini, porém apenas as duas primeiras incluem espécies epidemiologicamente importantes, como *T. infestans*, *T. dimidiata*, *R. prolixus* (Schofield, 1994).

Das 148 espécies de triatomíneos conhecidas atualmente, 64 foram identificadas no Brasil (Jurberg *et al.* 2014). Na região centro-oeste foi relatada a ocorrência de 27 espécies de triatomíneos transmissoras do *T. cruzi*, o que representa quase metade (42,8%) de todas as espécies conhecidas no Brasil (Pereira *et al.* 2013). Nesta região, há a ocorrência de espécies de importância epidemiológica primária como *Triatoma pseudomaculata*, *Panstrongylus megistus* e de populações residuais de *T. infestans* (Pereira *et al.* 2013). Apesar de ser considerada uma espécie de importância epidemiológica secundária, *R. neglectus* também tem sido frequentemente encontrada no peridomicílio e no interior dos domicílios (Oliveira & Silva 2007, Almeida *et al.* 2008, Gurgel-Gonçalves *et al.* 2008).

### 1.3.1. Variabilidade morfológica em triatomíneos

Algumas espécies de triatomíneos apresentam semelhanças fenotípicas, porém são genotipicamente diferentes, como *R. prolixus*, *R. robustus* I, II, III, IV e V, e ainda *R. barretti* (Monteiro *et al.*, 2003; Abad-Franch *et al.*, 2013, Pavan *et al.*, 2013), *Triatoma dimidiata* (Bargues *et al.*, 2008; Herrera-Aguilar *et al.*, 2009; Monteiro *et al.*, 2013) e *R. pictipes* (Pavan, 2009). Pavan (2009) observou a partir de análises filogenéticas utilizando os marcadores ITS-2 e mtcytb que *R. pictipes* representa um complexo parafilético de quatro espécies crípticas. As três espécies novas reveladas geneticamente, apesar de possuírem semelhança morfológica com *R. pictipes* s.s., são filogeneticamente mais relacionadas a *R. stali* e *R. brethesi*. Bargues e colaboradores (2008) observaram através da análise de ITS-2 que *T. dimidiata* representa um complexo de espécies constituído por uma nova espécie denominada *T. sp. aff. dimidiata* e por três subespécies: *Triatoma dimidiata dimidiata*, *T. d. capitata* e *T. d. maculipennis*. Um ano depois, Herrera-Aguilar e colaboradores (2009) observaram também pela análise de ITS-2 a presença de híbridos de *T. d. maculipennis* e *T. sp. aff. dimidiata* (que ocorrem em simpatria). Contudo, ao realizar cruzamentos recíprocos, as fêmeas híbridas adultas morreram prematuramente, o que poderia representar uma barreira de isolamento reprodutivo pós-zigótico (Ferdy & Austerlitz, 2002; Wiwegweaw *et al.*, 2009). Monteiro e colaboradores (2013) observaram uma grande divergência genética entre sequências de DNA mitocondrial (mtcytb e ND4) entre populações de *T. dimidiata* coletados através

de sua distribuição geográfica. Foi possível notar a partir de análises bayesianas e de máxima verossimilhança a existência de cinco grupos monofiléticos, incluindo a espécie descrita *T. hegneri* proveniente da ilha de Cozumel: grupo I, que se estende do Sul do México (Chiapas) por toda extensão da América Central até a Colômbia (com espécimes do Equador que se assemelham a amostras de Nicarágua); grupo II, que inclui amostras do oeste e nordeste do México, assim como de Péten na Guatemala; grupo III, que compreende espécimes da península de Yucatán (incluindo Petén, Cozumel e espécimes domésticos de Belize); e grupo IV, que inclui amostras silvestres de Belize). Neste trabalho os autores evidenciam que o complexo *T. dimidiata s.l.* é maior que o proposto por Bargues e colaboradores (2008), e que a alta divergência genética encontrada entre as populações estudadas é incompatível com o status taxonômico de subespécies (com exceção do clado de Yucatán). Portanto, os autores propõem que a hipótese de variabilidade clinal intraespecífica sugerida no trabalho de Bargues e colaboradores (2008) deve ser rejeitada.

Por muito anos, o status taxonômico de *R. robustus* foi questionado em função de sua identificação morfológica e isoenzimática com *R. prolixus* (Harry *et al.*, 1992; 1993a; 1993b). Posteriormente, Lyman e colaboradores (1999) baseados em dois fragmentos de DNA mitocondrial (mtcytb e 16S), concluíram que *R. robustus* é uma espécie válida e diferente de *R. prolixus*. Em 2003, Monteiro e colaboradores utilizaram um fragmento do mtcytb, além da região nuclear D2 (da subunidade ribossomal 28S), para avaliar a relação filogenética entre amostras de 25 populações de *R. prolixus* e *R. robustus* provenientes de sete países latino-americanos. A conclusão obtida foi que não apenas *R. robustus*, é uma espécie válida, separada de *R. prolixus*, como também representa um complexo parafilético de pelo menos quatro espécies crípticas (*R. robustus* I, II, III, IV). Portanto, a partir desses estudos moleculares, foi possível determinar a distribuição geográfica das espécies, além de definir possíveis áreas de risco potencial para a transmissão da doença de Chagas (Pavan & Monteiro, 2007; Pavan *et al.*, 2013).

Abad-Franch e colaboradores (2013) descreveram *R. barretti* como uma nova espécie de triatomíneo em uma avaliação integrativa que incluiu o sequenciamento de um gene mitocondrial (mtcytb), análises morfométricas e análises de taxonomia morfológica tradicional. Essa espécie é de difícil distinção

fenotípica em relação as outras da “linhagem *robustus*”, com exceção dos indivíduos de *R. robustus* II, com a qual apresenta diferenças cromáticas (coloração mais clara) e de tamanho (indivíduos maiores). A morfometria revelou que a forma da cápsula cefálica de *R. barretti* é distinta daquela observada no complexo *R. robustus*. A partir da análise filogenética de um fragmento de 682-pb do gene *mtcytb* foi possível observar uma divergência genética de 7,4 – 10,7% entre os espécimes de *R. barretti* e os demais espécimes provenientes da “linhagem *robustus*”, evidenciando que *R. barretti* representa uma unidade taxonômica distinta da “linhagem *robustus*”. Cabe ressaltar que utilizando o mesmo marcador, a menor distância genética observada entre espécies boas do gênero *Rhodnius* (*R. brethesi* e *R. stali*) é de 4,3% (Monteiro & Pavan dados não publicados).

A variabilidade de fenótipos de uma mesma espécie pode ser causada em resposta a adaptação a novos ambientes como, por exemplo, insetos provenientes do hábitat silvestre são maiores em relação aos encontrados no ambiente artificial (Dujardin *et al.*, 1999; Schachter-Broide *et al.*, 2004; Abrahan *et al.*, 2008; Hernández *et al.*, 2011), além de poder estar associada ao hábito alimentar (Schachter-Broide *et al.*, 2004, Naterro *et al.*, 2013).

Há indícios que *T. infestans* coletados no peridomicílio em currais de cabras e porcos e pilhas de madeira apresentaram um tamanho menor das asas e cabeça, além de padrões distintos nas sensilas das antenas do que aqueles coletados no ambiente domiciliar e em galinheiros. Essas diferenças podem, portanto, estar relacionadas ao pior estado nutricional e maior densidade populacional nos currais de cabras e porcos (Schachter-Broide *et al.*, 2004, Abrahan *et al.*, 2008), ou ainda serem consequências de efeitos ambientais, como altitude ou temperatura (Hernández *et al.*, 2011).

*T. infestans* pode ainda apresentar uma variação cromática, chamada de *T. infestans* “*dark morph*”. Noireau e colaboradores (1997; 2000) compararam indivíduos de *T. infestans* “*dark morph*” com *T. infestans* de padrão cromático comumente observado a partir de experimentos de cruzamento, eletroforese de isoenzimas, morfometria, análise citogenética e RAPD. Foi observado compatibilidade reprodutiva nos experimentos de cruzamento, ou seja, os diferentes morfótipos geraram descendentes férteis em condições de laboratório. Adicionalmente, o grau de diferenciação morfológica e genética dos indivíduos

“*dark morph*” foram considerados dentro do nível intraespecífico de *T. infestans*. Portanto, *T. infestans* “*dark morph*” e *T. infestans* pertencem à mesma espécie.

Dias e colaboradores em 2008 observaram em um estudo na Chapada do Araripe no estado do Ceará que *R. nasutus* apresentava uma grande variabilidade de morfótipos de acordo com a espécie de palmeira que habitavam e que a coloração encontrada em espécimes de *R. nasutus* (ninfas e adultos) correspondia exatamente a coloração encontrada nos caules e nas bases das folhas que esses insetos habitavam, promovendo uma camuflagem aos indivíduos (Apêndices 1 e 2). Até o momento não foram realizados estudos genéticos para saber se essa variabilidade cromática em *R. nasutus* é resultado da seleção natural ou se na realidade *R. nasutus* representa um complexo de espécies crípticas.

#### **1.4. A espécie em estudo: *Rhodnius neglectus***

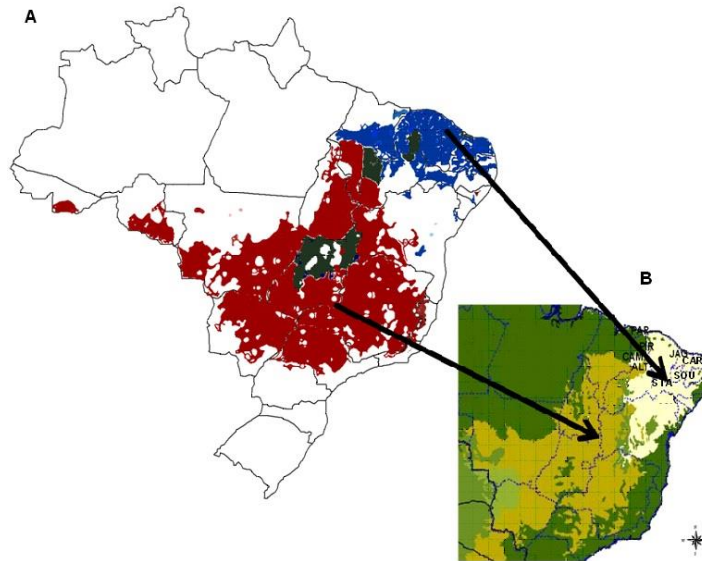
*Rhodnius neglectus* ocorre principalmente no bioma cerrado e está entre as espécies brasileiras de *Rhodnius* que apresenta maior distribuição geográfica, presente em 11 estados brasileiros (Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Bahia, Piauí, Pernambuco, Maranhão, Tocantins, Minas Gerais, Paraná, São Paulo), além do Distrito Federal (Carcavallo *et al.* 1999; Galvão *et al.* 2003, Gurgel-Gonçalves & Cuba 2009). Esta espécie está associada principalmente a palmeiras dos gêneros *Attalea*, *Acrocomia*, *Mauritia*, *Syagrus* e *Oenocarpus*, onde ocupa ninhos de pássaros da família Furnariidae (*Phacellodomus* e *Pseudoseisura*) (Diotaiuti & Dias 1984, Gurgel-Gonçalves *et al.* 2003, 2004a, Abad-Franch *et al.* 2009) e refúgios de mamíferos do gênero *Didelphis* (Gurgel-Gonçalves *et al.* 2004a). *R. neglectus* é frequentemente encontrado infectado por *T. cruzi* nos estados do Piauí, Minas Gerais, São Paulo, Goiás e Distrito Federal com taxas que variam de 1,5 a 22% (Gurgel-Gonçalves *et al.* 2004b). Além disso, essa espécie tem sido encontrada invadindo habitações humanas atraída pelas luzes das casas (Gurgel-Gonçalves *et al.* 2008). Este panorama requer atenção dos programas de vigilância epidemiológica, uma vez que estratégias de combate tradicionais (*i.e.* aplicação de inseticidas) são ineficazes e o risco de transmissão vetorial sem a presença de uma espécie capaz de colonizar o intradomicílio é iminente (Gurgel-Gonçalves *et al.* 2010).

*R. neglectus* pode ser facilmente confundida com outra espécie característica da caatinga, *Rhodnius nasutus* (Dias et al. 2008; Lima & Sarquis 2008) e, portanto, os limites de distribuição destas espécies ainda não estão totalmente esclarecidos (Figura 2). Adicionalmente, *R. neglectus* apresenta grande variação de tamanho em populações da região centro-oeste do Brasil, o que dificulta ainda mais a identificação morfológica destes espécimes (Gurgel-Gonçalves et al. 2008). Existem evidências de co-ocorrência dessas espécies no Maranhão, Piauí, Ceará, Pernambuco, Paraíba e Bahia em áreas de transição cerrado-caatinga (Abad-Franch et al. 2009, Gurgel-Gonçalves et al. 2012).

Bento et al. (1992) observaram em Teresina (Piauí) e em municípios vizinhos que 75% das palmeiras de babaçú e carnaúba examinadas estavam infestadas por *R. neglectus* e *R. nasutus* apresentando altas taxas de infecção natural por *T. cruzi*. É importante ressaltar que essas palmeiras podem ocorrer em áreas urbanas, onde espécies de *Rhodnius* e mamíferos mantêm o ciclo de transmissão enzoótico de *T. cruzi*.

A correta identificação de *R. neglectus* e *R. nasutus*, a delimitação precisa de suas áreas de ocorrência e a determinação de sua ecologia irão fornecer subsídios para a vigilância e controle destes vetores silvestres na região estudada.





**Figura 2.** A) Mapa com a predição da distribuição geográfica de *R. neglectus* (em vermelho), *R. nasutus* (em azul) e possíveis áreas de simpatria (em preto), baseado na modelagem de nicho ecológico; B) Delimitação dos biomas cerrado (bege) e caatinga (amarelo) (modificado de Batista & Gurgel-Gonçalves (2009).

Recentemente nosso grupo coletou em palmeiras *C. prunifera* espécimes de *Rhodnius* que cromaticamente se assemelhavam a *R. nasutus*. Contudo, a partir do sequenciamento de um fragmento de 630pb do gene mitocondrial (mtcytb), foi possível observar que todos os indivíduos sequenciados (padrão de coloração claro e escuro) foram agrupados em um clado monofilético com a sequência referência de *R. neglectus*. Contudo, os espécimes mais escuros apresentaram uma divergência genética de 1,7 - 2,5% quando comparados aos indivíduos mais claros, e 0,2 – 0,4% quando comparados entre si (Apêndice 3). Ao sequenciar a região ITS-2 do RNA ribossomal (rRNA; 703 – 740-pb) foi possível notar que *R. neglectus* formava um grupo parafilético, evidenciado por 23% dos indivíduos de coloração clara de *R. neglectus* provenientes do estado da Bahia que foram agrupados com a espécie *R. nasutus* e 15% dos indivíduos de *R. nasutus* foram agrupados ao clado de *R. neglectus*. Contudo, a maioria das sequências de *R. neglectus* claro foi agrupada aos ribotipos de *R. neglectus* escuro. A única e curiosa exceção foi um espécime identificado morfológica e molecularmente como *R. neglectus* que teve 75% dos seus ribotipos agrupados

no clado de *R. nasutus* (Apêndice 4). Algumas hipóteses poderiam explicar os resultados obtidos, tais como, introgressão do DNA mitocondrial de *R. neglectus* no genoma de *R. nasutus*, o que explicaria a incongruência observada entre os marcadores mitocondrial e nuclear e a classificação incompleta das linhagens (*incomplete lineage sorting*), mostrando a retenção de polimorfismo ancestral ou eventos de hibridação passados, já que o ITS-2, por ser um marcador nuclear, evolui de forma mais lenta que mtcytb.

Esses achados revelam um contraste entre os resultados encontrados com os marcadores mitocondrial e nuclear, fato que nos levou a analisar marcadores moleculares que evoluem mais rapidamente para um melhor esclarecimento acerca do status taxonômico dessas populações de padrões cromáticos distintos.

### **1.5. Marcadores microssatélites e sua aplicação na análise da estrutura populacional de triatomíneos**

Microssatélites são *motifs* de um a seis pares de bases que se repetem sequencialmente [*in tandem*; ex.: (AT)<sub>n</sub>, (GTA)<sub>n</sub>] e estão presentes em organismos procariotos e eucariotos, podendo ser encontrados em regiões codificantes e não codificantes do genoma (Zane *et al.* 2002). Acredita-se que dois mecanismos expliquem suas altas taxas de mutação: o fenômeno conhecido como DNA *slippage* (“deslize” da polimerase, que leva a incorporação ou deleção errônea desses *motifs* durante a replicação) e o mecanismo que envolve recombinação (*crossing-over* desigual ou conversão gênica; Ellegren, 2004).

A maioria dos microssatélites encontrados são dinucleotídeos (30-67%) e a taxa de mutação estimada é de  $10^{-2} - 10^{-6}$  por loco por geração, muito maior que em regiões não repetitivas do DNA, que são da ordem de  $10^{-9}$  (Chistiakov *et al.*, 2006). Embora o mecanismo de evolução dos microssatélites ainda não esteja totalmente elucidado, existem basicamente três modelos propostos para explicar a sua evolução: (1) envolve apenas um passo mutacional por vez (modelo SSM – *single step mutation*; Kimura & Otha, 1978); (2) com passos mutacionais múltiplos (modelo IAM – *infinite allele model*; Kimura & Crow, 1964); e (3) o modelo dependente do tamanho alélico, onde alelos pequenos tendem a

aumentar em número de repetições, enquanto alelos maiores tendem a diminuir (Ellegren, 2004).

Atualmente esses marcadores são muito úteis em estudos populacionais, pois apresentam diversas vantagens, como por exemplo: (a) são marcadores neutros; (b) possuem herança biparental (possibilitando a identificação de possíveis híbridos); (c) são altamente polimórficos; (d) são codominantes; e (e) proporcionam a análise de vários *loci* de uma única vez. Além disso, possuem potencial para fornecer estimativas de migrações contemporâneas, distinguir elevadas taxas de migração de panmixia e estimar o parentesco dos indivíduos, permitindo uma melhor avaliação das habilidades de dispersão dos indivíduos (Abad-Franch & Monteiro, 2005; Selkoe & Toonen, 2006).

Diversos trabalhos com triatomíneos utilizando microssatélites já foram publicados e já existem iniciadores para muitos *loci*, como por exemplo, para *R. pallescens* (Harry *et al.* 1998), *T. dimidiata* (Anderson *et al.* 2002), *T. infestans* (Garcia *et al.* 2004; Marcet *et al.* 2006), *T. pseudomaculata* (Harry *et al.* 2008a), *Triatoma brasiliensis* (Harry *et al.* 2009), *R. prolixus* (Fitzpatrick *et al.* 2008; Harry *et al.* 2008b) e *Triatoma sordida* (Belisário *et al.* 2015). A disponibilidade de tantos *loci* de microssatélites favorece sua utilização em trabalhos genético-populacionais, possibilitando uma determinação mais precisa do fluxo gênico entre populações.

Devido ao seu alto grau de polimorfismo, os marcadores microssatélites são eficientes na detecção de diferenças inter e intraespecíficas. Em 2007, Hong-Mei e colaboradores selecionaram 77 *loci* de microssatélites para identificar e analisar a estruturação de três espécies de tilápias, 3 *loci* foram diagnósticos para diferenciar as espécies em estudo (*Oreochromis aureus*, *O. niloticus* e *O. mossambicus*). Routtu e colaboradores (2007) analisaram 50 *loci* de microssatélites e observaram 14 *loci* polimórficos para o complexo de espécies crípticas em estudo, *Drosophila virilis* (*D. a. americana*, *D. borealis*, *D. canadiana*, *D. ezoana*, *D. flavomontana*, *D. kanekoi*, *D. laticola*, *D. littoralis*, *D. lummei*, *D. montana*, *D. novamexicana*, *D. a. texana*, *D. virilis*). Os autores notaram que o *locus* Vir72m foi muito informativo e serviu como diagnóstico para separação de *D. kanekoi*, *D. ezoana*, *D. novamexicana* e *D. virilis* das demais espécies do grupo.

Diante do exposto anteriormente, surge o questionamento sobre a homogeneidade do taxon de *R. neglectus* e a dinâmica existente entre as populações do bioma cerrado e de áreas de transição cerrado-caatinga. Será que existe fluxo gênico entre o grupo de *R. neglectus* presente no cerrado e o grupo na área de transição cerrado-caatinga ou estas populações estão ecologicamente isoladas e não mais co-específicas?

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Analisar se as populações de *R. neglectus* presentes no bioma cerrado e nas áreas de transição cerrado-caatinga representam um único táxon ou compõem um complexo de espécies crípticas.

### 2.2. Objetivos específicos

- Testar 19 *loci* de microssatélites, visando obter um número mínimo de 10 *loci* polimórficos.
- Avaliar a frequência alélica, níveis de endogamia, magnitude e direcionamento do fluxo gênico nas populações de *R. neglectus*.
- Determinar o nível de estruturação das populações de *R. neglectus* ao longo de sua distribuição geográfica.
- Estimar as taxas de migração e a origem dos espécimes de cada população analisada.
- Avaliar se a região de transição cerrado-caatinga atua como uma barreira de isolamento ecológico para o fluxo gênico entre as populações de *R. neglectus*.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Descrição das amostras e extração de DNA

Os espécimes de *Rhodnius neglectus* foram coletados em 14 localidades (Figura 4; Tabela 1), sendo uma no estado do Piauí, em Minas Gerais e em São Paulo, duas no estado de Tocantins, na Bahia, em Goiás, no Distrito Federal, três em Mato Grosso. A estratégia de coleta adotada teve como objetivo abranger toda extensão geográfica em que a espécie ocorre (áreas de cerrado e de transição cerrado-caatinga).

O método escolhido para a coleta dos triatomíneos variou de acordo com a palmeira, sendo usado coleta manual (Gurgel-Gonçalves 2008) para *M. flexuosa* e dissecação para as palmeiras dos gêneros *Attalea* (Barretto *et al.* 1969), *Copernicia* (Diotaiuti & Dias 1984) e *Acrocomia* (Romaña *et al.*, 1999). Todas as palmeiras amostradas foram georreferenciadas (GPS 12 Garmin).

A identificação morfológica das amostras foi feita com base em Lent & Wygodzinsky (1979) e por técnicas de morfometria geométrica (Gurgel-Gonçalves *et al.* 2008) das asas e cápsulas cefálicas, realizadas na Universidade de Brasília (UnB) pelo colaborador Dr. Rodrigo Gurgel-Gonçalves. Todos os indivíduos foram ainda identificados molecularmente a partir do sequenciamento de DNA de um fragmento de 682 pares de base (pb) do gene mitocondrial *cytb*, como já descrito previamente (Monteiro *et al.* 2003) a fim de certificar se os espécimes coletados pertenciam a um único táxon ou se poderiam representar um complexo de espécies crípticas.

O DNA de cada espécime foi extraído utilizando o kit de extração da RBC genomics (Real Genomics), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante para o isolamento do material genético contido no tecido animal. Para a extração do DNA de indivíduos adultos e ninfas de 5<sup>o</sup> estágio, três patas foram maceradas; os demais estágios ninfais tiveram os corpos inteiros macerados. Após a extração, a concentração de DNA de todas as amostras foi mensurada por fluorimetria no Qubit® 3.0 Fluorometer (Life Technologies, Inc.). Este equipamento permite a quantificação do DNA, mesmo em baixas concentrações (até 0,1 ng/uL), utilizando um corante fluorescente específico, o que confere a esta metodologia alta especificidade e sensibilidade. Para quantificar o DNA

obtido em cada amostra foi utilizado o kit Qubit® dsDNA HS Assay (Life Technologies, Inc.).

### 3.2. Análise de microssatélites

Foram testados 19 *loci* microssatélites usando as condições de ciclagem estabelecidas por Fitzpatrick *et al.* (2009) e Harry *et al.* (1998; 2008b), otimizando as condições de amplificação quando necessário. Após os testes para o estabelecimento das temperaturas de anelamento na reação em cadeia da polimerase para cada *locus* (Apêndice 5), foram realizados testes de reações multiplex para os loci que apresentavam temperaturas de anelamento próximas, a fim de diminuir os custos financeiros do experimento (Apendice 6; Tabela 3).

Os microssatélites foram amplificados usando conjuntos de três iniciadores (iniciador com cauda, iniciador marcado com fluorocromo, VIC, NED, PET ou 6-FAM, e iniciador reverso), adotando-se o método previamente descrito por Schuelke (2000). Todas as genotipagens foram realizadas no sequenciador automático ABI3130XL (Applied Biosystems) da Plataforma de Sequenciamento e Análise de Fragmentos PDTIS-Fiocruz. Os resultados foram visualizados no programa Peak Scanner™ v.2.0 (Applied Biosystems) para a identificação dos alelos.

### 3.3. Análise dos dados

O programa *Micro-Checker* v. 2.2 foi utilizado para a possível detecção de erros de genotipagem (alelos nulos, *stutter* e *dropout* de alelos) em cada população analisada (Van Oosterhout *et al.*, 2004). Os equilíbrios de ligação (LE) foram testados entre todos os pares de *loci* de cada população no programa *Arlequin* v. 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010).

Desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (H-W) foram calculados para cada população e cada *locus*, no programa *Genalex* v. 6.5 (Peakall & Smouse, 2012) e no *Arlequin* v. 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010). Deficiências significativas de heterozigotos foram corrigidas para testes múltiplos pelo algoritmo de FDR (Benjamini & Yekutieli, 2001). O número de alelos e as frequências alélicas dos *loci* dos espécimes de cada localidade coletada foram estimados no programa *Arlequin* v. 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010).

**Tabela 1:** Amostras de *R. neglectus* obtidas no bioma cerrado e em áreas de transição cerrado-caatinga. A coluna “código” mostra os nomes que foram dados para as localidades. A coluna N significa o número de amostras coletadas.

Localidade	N	Bioma	Coloração	Ano da coleta	Código
Buritizal, SP	20	Cerrado	Escura	2010	BL
Canto do Buriti, PI	22	Transição*	Clara	2010	CB
Diamantino, MT	25	Cerrado	Escura	2010	DI
Ibotirama, BA	21	Transição*	Clara	2010	IBO
Ituiutaba, MG	20	Cerrado	Escura	2010	IT
Mambá, GO	22	Cerrado	Escura	2010	MA
Mozarlândia, GO	21	Cerrado	Escura	2010	MO
Nossa Senhora do Livramento, GO	20	Cerrado	Escura	2010	NS
Nova Xavantina, MT	20	Cerrado	Escura	2010	NX
Palmeirante, TO	21	Cerrado	Escura	2009	PA
Paranoá, DF	20	Cerrado	Escura	2010	IB
Presidente Kennedy, TO	20	Cerrado	Escura	2010	PK
Rajadinha, DF	20	Cerrado	Escura	2010	RA
Xique-Xique, BA	20	Transição*	Clara	2010	XX
<b>Total</b>	<b>292</b>				

\*Área de transição cerrado-caatinga.

O coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) e a diferenciação genética entre populações (usando  $F_{ST}$  e  $R_{ST}$ ) foram calculados no programa *Arlequin* v. 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010).

O programa *Structure* v. 2.2 (Pritchard *et al.*, 2000), que tem como base o modelo bayesiano de agrupamento, foi utilizado para a determinação do número de populações (K) existentes. Para esta análise, foi utilizado o modelo de ancestralidade misturada (*admixture model*), com os alelos correlacionados, pois este modelo de frequência de alelos assume que nenhuma população contém genótipos muito divergentes, permitindo a resolução máxima na separação das populações. Foram estabelecidas  $10^6$  cadeias Markov Monte Carlo (MCMC), com  $10^5$  iterações, descartando as primeiras  $3 \times 10^5$  iterações. Dez rodadas independentes foram executadas para cada número de populações *a posteriori* (ou K).

Os valores de verossimilhança e a probabilidade dos dados serem verdadeiros para cada número de K foram calculados e posteriormente utilizados em uma análise estatística *ad hoc*, chamada de delta K ( $\Delta K$ ), no programa



*Structure Harvester* ([http://taylor0.biology.ucla.edu/struct\\_harvest/](http://taylor0.biology.ucla.edu/struct_harvest/)) (Earl *et al.*, 2012). Nesta estatística *ad hoc*, o desvio-padrão das dez estimativas independentes dos valores de verossimilhança dos dados entre sucessivas K populações testadas é utilizado para definir o número de populações mais provável (Evanno *et al.*, 2005). Após a definição de K, as 10 corridas geradas no programa *Structure* v 2.2 (Pritchard *et al.*, 2000) foram analisadas nos programas *Clumpp* v. 1.1 (Jakobsson & Rosenberg 2007) e *Distruct* v. 1.1 (Rosenberg, 2004) para a construção de um gráfico de estruturação das populações de *R. neglectus*.

O teste de Mantel implementado no programa *Arlequin* v. 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010) foi realizado a fim de observar se a divergência genética entre as populações é diretamente proporcional a distância geográfica.

O índice modificado de Garza-Williamson (G-W; Garza & Williamson 2001) foi calculado no programa *Arlequin* v. 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010), a fim de testar se as populações definidas sofreram efeito “gargalo de garrafa” (ou efeito *bottleneck*). Valores próximos de um são indícios de que a população é estacionária, enquanto valores próximos de zero indicam que possivelmente houve uma drástica redução do tamanho populacional.

O programa *EdeNetwork* v. 2.18 (Kivela *et al.*, 2014) foi utilizado para a construção de uma rede de agrupamentos populacionais a fim de ilustrar as relações entre as populações estudadas. Estas redes consistem em nós (ou vértices) ligados por arestas. Os nós representam as unidades fundamentais do sistema, como indivíduos ou populações, e as arestas representam as relações ou interações nesse sistema. A força de cada interação é medida de acordo com o “peso” de cada aresta. Esse “peso” foi representado na análise pelo índice de estruturação populacional ( $F_{ST}$ ). O programa calcula um limiar (valor ótimo) para as interações, através da definição clássica proposta para sistemas finitos (Stauffer & Aharony 1994), cujos valores acima do limiar resultariam em uma rede com todos os nós conectados e abaixo desse limiar a rede estaria fragmentada, ou seja, com poucos nós conectados. A partir desta análise, é possível identificar a presença de populações-fonte (*i.e.* que fornece colonizadores para as populações periféricas), a partir do cálculo de quatro parâmetros: *degree*, *clustering*, *betweenness*. O parâmetro *degree* está associado ao número de conexões que uma dada população realiza com as

demais. Quanto maior o número de conexões, maiores as chances de uma determinada população ser fonte de migrantes para as demais. O coeficiente *clustering* está associado a média dos coeficientes de agrupamento de todos os nós da rede. O coeficiente de agrupamento de cada nó é representado pela equação:

$$C_i = \frac{2E_i}{K_i(K_i-1)}, \text{ onde}$$

$K_i$  = parâmetro *degree* do dado nó.

$E_i$  = número de conexões existentes entre os vizinhos de um dado nó, varia entre 0 e  $E_i^{(máx)}$ ; e

$$E_i = \frac{K_i(K_i-1)}{2}$$

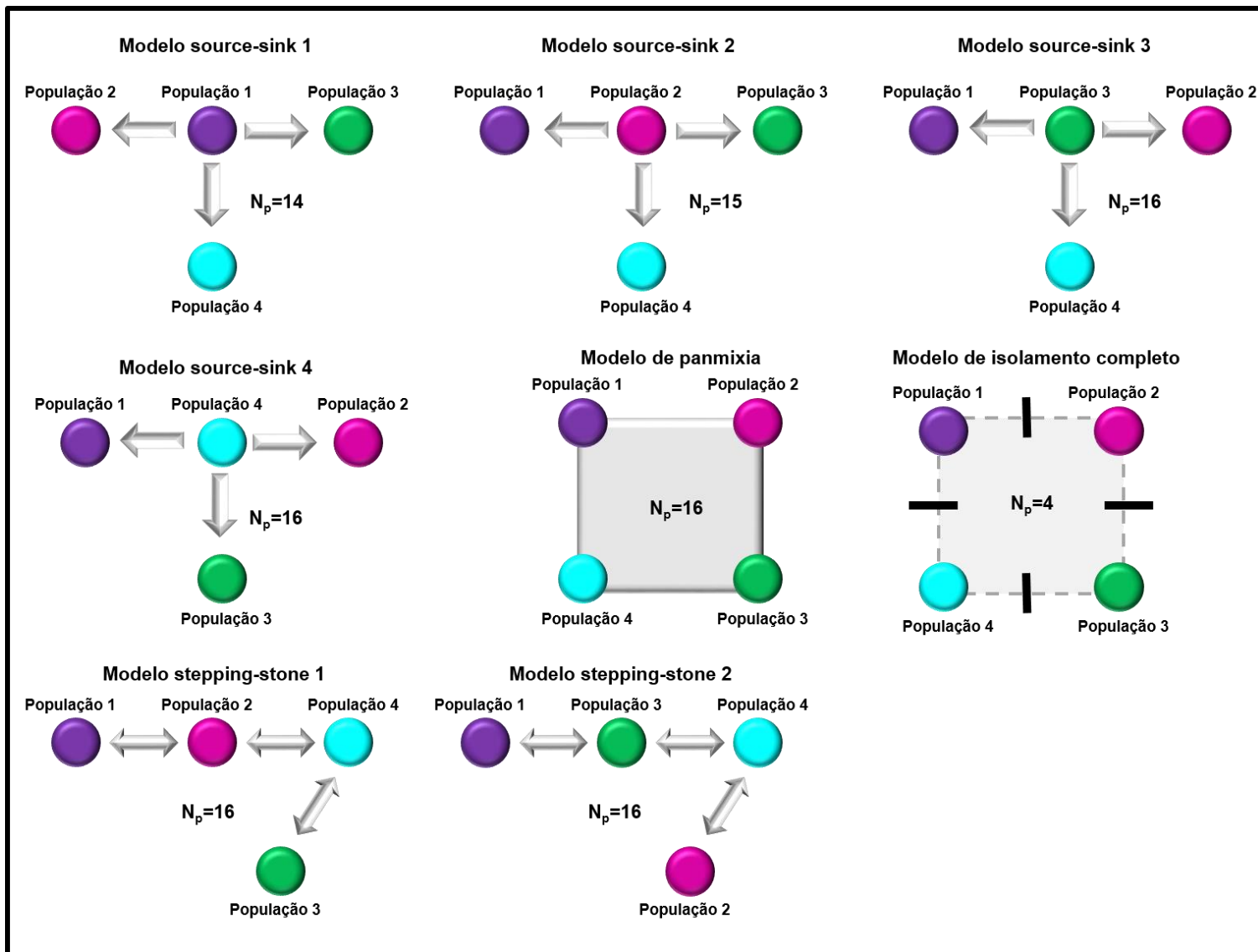
$E_i$  atinge seu valor máximo quando um nó vizinho está conectado com todos os demais nós. Valores altos desse coeficiente de agrupamento ( $C_i$ ) indicam que a estrutura da rede não é aleatória e que há indícios de, pelo menos, uma população-fonte. O parâmetro *betweenness* está associado ao peso dado a essas conexões, neste trabalho sendo representado pelo índice de estruturação populacional  $F_{ST}$ .

O programa *Migrate-n* v. 3.6 (Beerli & Felsenstein 2001; Beerli & Palczewski 2010) ainda foi usado para estimar o número de migrantes entre as diferentes populações pelo método bayesiano. Esta abordagem apresenta a vantagem de tornar possível a observação de taxas de migração diferenciais, ao contrário dos cálculos tradicionais de número de migrantes baseados em  $F_{ST}$  que utilizam o modelo de ilhas. Nesta análise, o número de indivíduos em cada população foi limitado pelo agrupamento que possuiu o menor número de espécimes ( $N=40$ ). Foram testados diferentes valores de cadeias longas e número de réplicas das cadeias durante a execução das  $MC^3$  (Cadeias de Markov Monte Carlo *Metropolis-coupled*), até que visualmente estivessem convergentes. Foi utilizado o padrão de aquecimento estático de cadeias, sendo uma cadeia fria e três quentes (com valores de temperaturas de 1,0; 1,2; 3,0; 1.000.000) e uma única cadeia longa. As cadeias de  $MC^3$  visualmente permaneceram estáveis e não apresentaram nenhuma tendência (*long-inc=200; long-sample=2000; burn-in=1000*). Todos os valores de ESS obtidos foram maiores que  $10^5$  e o número de genealogias amostradas foi maior que 10%, indicando boa mistura das cadeias e convergência dos parâmetros estimados. Estas análises de

coalescência foram utilizadas para a geração de hipóteses acerca da origem e dispersão das populações de *R. neglectus* no cerrado e na região de transição cerrado-caatinga (Beerli e Palczewski, 2010). A hipótese nula deste teste de hipóteses foi o modelo de panmixia (*full migration*), que pressupõe fluxo gênico entre todas as populações estudadas. Primeiramente, foram testadas quatro hipóteses alternativas representando diferentes padrões de migração, a fim de sabermos qual seria a possível população que teria dado origem as demais (Figura 3): (*source-sink 1*) a origem das populações de *R. neglectus* teria sido na região mais ao norte do bioma cerrado, com posterior ocupação da área de transição cerrado-caatinga e da região mais ao sul do bioma cerrado, com fluxo gênico bidirecional (população 1 como fonte); (*source-sink 2*) a origem das populações de *R. neglectus* teria sido na área de transição cerrado-caatinga e posteriormente migrantes teriam ocupado a região mais ao sul e ao norte do bioma cerrado, com fluxo gênico bidirecional (população 2 como fonte); (*source-sink 3*) a origem das populações de *R. neglectus* teria sido na região mais a sudoeste do bioma cerrado, com posterior ocupação da área de transição cerrado-caatinga e da região mais ao leste e norte do bioma cerrado, com fluxo gênico bidirecional (população 3 como fonte); (*source-sink 4*) a origem das populações de *R. neglectus* teria sido na região mais a sudeste do bioma cerrado, com posterior ocupação da área de transição cerrado-caatinga e da região mais ao oeste e norte do bioma cerrado, com fluxo gênico bidirecional (população 4 como fonte); e (isolamento completo) onde a linhagem ancestral ocupava todas as regiões analisadas e, com o surgimento de barreiras geográficas naturais, as populações se isolaram e eventualmente especiaram em alopatria; Posteriormente foram testadas mais duas hipóteses, a fim de sabermos como teria ocorrido a migração a partir da possível população fonte (stepping-stone 1) a origem das populações de *R. neglectus* teria sido na região mais ao norte do bioma cerrado (população 1 como possível fonte), posteriormente migrantes teriam ocupado a área de transição cerrado-caatinga e a partir dessa região teriam ocupado a área mais ao sul do bioma cerrado, com fluxo gênico bidirecional; (stepping-stone 2) a origem das populações de *R. neglectus* teria sido na região mais ao norte do bioma cerrado (população 1 como possível fonte), posteriormente migrantes teriam ocupado a área mais ao sul do

bioma cerrado e a partir dessa região teria ocorrido a ocupação da área de transição cerrado-caatinga, com fluxo gênico bidirecional.

Para cada hipótese, foram realizadas 50 réplicas. Foram calculados os valores de verossimilhança marginal (*marginal likelihood*) e a probabilidade de cada modelo usando a integração termodinâmica com a aproximação de Bezier, de acordo com Beerli & Palczewski (2010). Todas as corridas foram repetidas no mínimo cinco vezes, para verificar a consistência dos resultados. Como o valor de verossimilhança marginal de todas as repetições das corridas de cada hipótese foram semelhantes, os valores finais utilizados foram aqueles de maior valor verossimilhança.



**Figura 3.** Hipóteses de dispersão testadas em uma macroescala. Cada círculo representa uma população (ver a seção Resultados para maiores detalhes). As setas indicam a direção de fluxo gênico. O quadrado preenchido representa uma população panmítica.

As genealogias de fluxo gênico foram ranqueadas de acordo com os fatores logarítmicos de Bayes (LBF), calculados através da fórmula:

**LBF =  $\ln(\text{mL}(\text{modelo1})) - \ln(\text{mL}(\text{modelo2}))$** , onde o modelo 2 é o maior valor de máxima-verossimilhança.

Após o cálculo dos valores de LBF, os mesmos foram exponenciados e os modelos testados foram ranqueados. O cálculo da probabilidade de cada modelo ser o mais correto foi feito a partir do valor exponencial de LBF do melhor modelo dividido pela soma dos valores exponenciais de LBF de todos os pares de modelos testados.

A fim de saber o número de migrantes entre as populações do modelo que apresentou melhor posição no *ranking* foi utilizada a fórmula:

$$4Nm = (M_{\text{popx} \rightarrow \text{popy}} \times \Theta_{\text{popy}}) \times Tg, \text{ onde:}$$

$M_{\text{popx} \rightarrow \text{popy}}$  – taxa de migração da população x para a população y;

$\Theta_{\text{popy}}$  – parâmetro  $\Theta$  da população y;

Tg – número de gerações em um ano. Como cada geração de *R. neglectus* tem aproximadamente quatro meses (Mello 1977), neste caso Tg = 3.

Os mapas gerados nessa dissertação foram realizados no programa *Diva-Gis* v. 7.5. O gráfico gerado para visualizar o padrão de migração inferido pela análise realizada no programa *Migrate-n* v. 3.6 (Beerli & Felsenstein 2001; Beerli & Palczewski 2010) foi feito no R (<http://www.R-project.org>) usando o pacote *Migest* (Abel 2014).

## 4. RESULTADOS

Foram testados 19 *loci* microssatélites já descritos na literatura para espécies do gênero *Rhodnius* (Apêndice 5), dos quais 12 *loci* foram amplificados para *R. neglectus* (Apêndice 7), porém para as análises de genética de populações foram utilizados 8 *loci*, sendo estes os com maior número de indivíduos genotipados (Tabela 2). Diferentes quantidades de reagentes e de DNA e ajustes nas temperaturas de anelamento dos iniciadores foram testados a fim de otimizar as reações de multiplex (Apêndice 6; Tabela 2). Todas as análises dos produtos amplificados foram realizadas na Plataforma de Análise de Fragmentos / PDTIS - FIOCRUZ. Foram genotipados 258 espécimes provenientes de 14 localidades (Figura 4; Tabela 3).

De dois a dezesseis alelos foram observados nos *loci* analisados (média de 8 alelos por *locus*). O *locus* List14-064 foi o mais polimórfico, apresentando 16 alelos (Figura 5).

A frequência alélica foi primeiramente calculada para cada localidade estudada, a fim de verificarmos se existia algum *locus* diagnóstico que nos forneceria indícios de que estávamos trabalhando com espécies distintas de *R. neglectus*, uma presente no bioma cerrado e a outra em áreas de transição cerrado-caatinga (Apêndice 8). A partir do resultado obtido, foi possível notar que não há um *locus* diagnóstico para a separação dos indivíduos entre essas distintas regiões (Tabela 4).

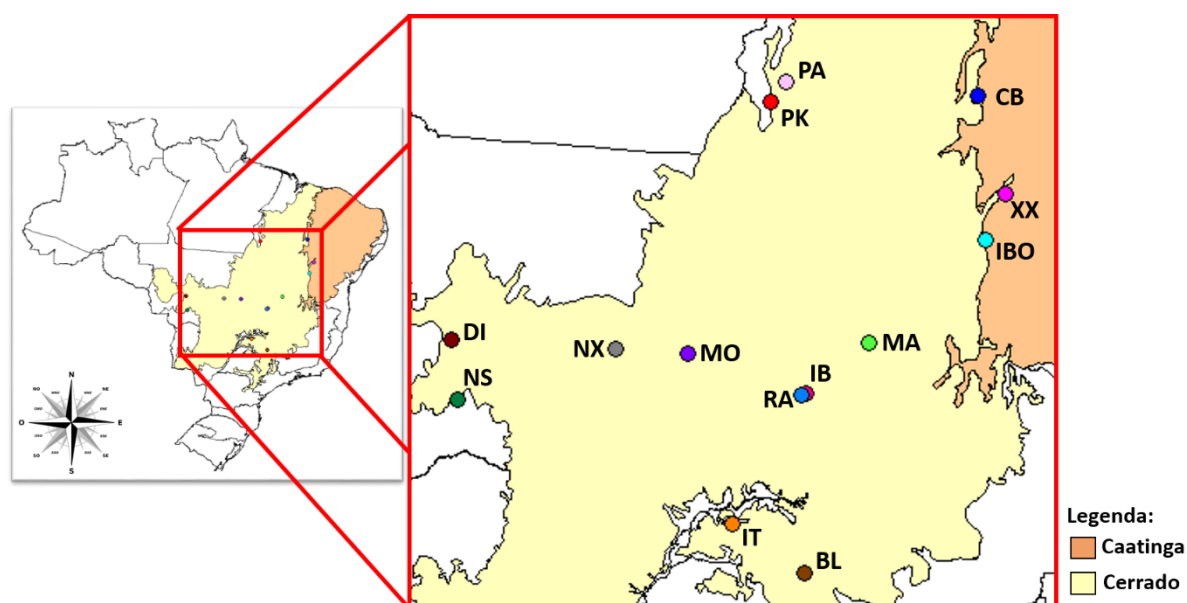
**Tabela 2:** Características gerais dos oito *loci* padronizados. Ta (°C) – temperatura de anelamento, em graus Celsius; F – fita senso; R – fita anti-senso; A – adenina; C – citosina; G – guanina; T – timina; N – qualquer um dos quatro nucleotídeos.

<i>Locus</i>	Iniciador	Repetição	Tamanhos Esperados (pb)	Tamanhos obtidos (pb)	Ta°	Fluorófilo	Referência
L03	F: AAGGGAGAAAGCCTGAG R: TCGTGACATCCTTTGTGTAAG	(CA) <sub>8</sub> N <sub>10</sub> (CA) <sub>2</sub>	88-113	83-117	56	6FAM	Harry <i>et al.</i> , 1998
L43	F: ACAGTTGTACAGCGCGTC R: CATGTTCCGTACAGTAGGC	(GT) <sub>3</sub> N <sub>8</sub> (CT) <sub>2</sub> (GT) <sub>13</sub>	114-135	136-156	56	HEX	Harry <i>et al.</i> , 1998
R26	F: AGAAGGAATCTATCCACTTTCGC R: CCTCGCTATCAGCTGCTACG	(CA) <sub>3</sub> CT(CA) <sub>2</sub>	112-120	112-124	52	6FAM	Harry <i>et al.</i> , 2008
R30	F: GATCCAGGCAGTTTTCTTAAGTG R: CAATGGAACAAGAATTTAGTGAGG	(GT) <sub>8</sub>	218-220	200-222	54	VIC	Harry <i>et al.</i> , 2008
List 14 – 010	F: AATGATGACTGTATTGATGGGC R: TTCGACCAACAACAACCTCCC	(CA) <sub>9</sub>	311-339	307-309	54	6FAM	Fitzpatrick <i>et al.</i> , 2009
List 14 - 013	F: CATACTACACGCACACAAGACC R: ATACTCGCATCAAGCCATTTGG	(AC) <sub>10</sub>	335-345	332-346	52	6FAM	Fitzpatrick <i>et al.</i> , 2009
List 14 - 025	F: CCGCTCTATCAACTACTCC R: GATCCCTTATGTTTCTCAGC	(TC) <sub>9</sub> (AC) <sub>7</sub> N <sub>13</sub> (AC) <sub>7</sub>	163-181	125-169	52	6FAM	Fitzpatrick <i>et al.</i> , 2009
List 14 - 064	F: AGAAAATGAGCAAAACGGCC R: ACAGGCAAACAACATGACG	(GT) <sub>10</sub>	237-247	240-280	54	6FAM	Fitzpatrick <i>et al.</i> , 2009

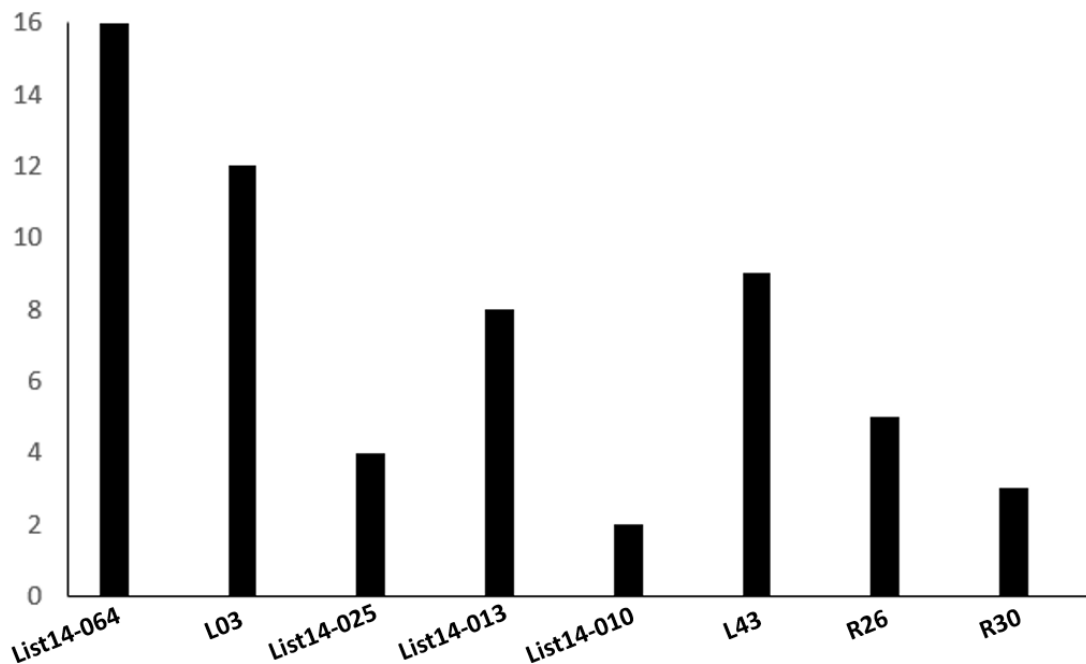


**Tabela 3:** Número de espécimes genotipados por *locus* em cada localidade amostrada.

Localidades/Locus	List14-064	List14-025	List 14-013	List 14-010	R26	R30	L43	L03
Buritizal (SP)	16	18	12	15	16	9	17	11
Canto do Buriti (PI)	11	11	4	6	9	10	8	9
Diamantino (MT)	13	12	7	15	15	11	4	11
Ibotirama (BA)	13	16	9	14	17	15	11	9
Ituiutaba (MG)	15	20	7	14	17	12	8	13
Mambaí (GO)	15	15	7	9	8	0	14	4
Mozarlândia (GO)	15	15	14	12	10	1	13	13
Nossa Sra. do Livramento (MT)	18	19	16	17	17	8	19	17
Nova Xavantina (MT)	16	20	9	16	20	16	9	16
Palmeirantes (TO)	19	16	20	20	16	6	18	14
Paranoá (DF)	18	19	18	17	19	3	17	4
Presidente Kennedy (TO)	20	20	19	20	17	12	17	16
Rajadinha (DF)	19	20	5	19	18	14	6	2
Xique-Xique (BA)	16	20	15	20	12	11	16	8
<b>Total de espécimes genotipados/locus</b>	<b>224</b>	<b>241</b>	<b>162</b>	<b>214</b>	<b>211</b>	<b>128</b>	<b>177</b>	<b>147</b>

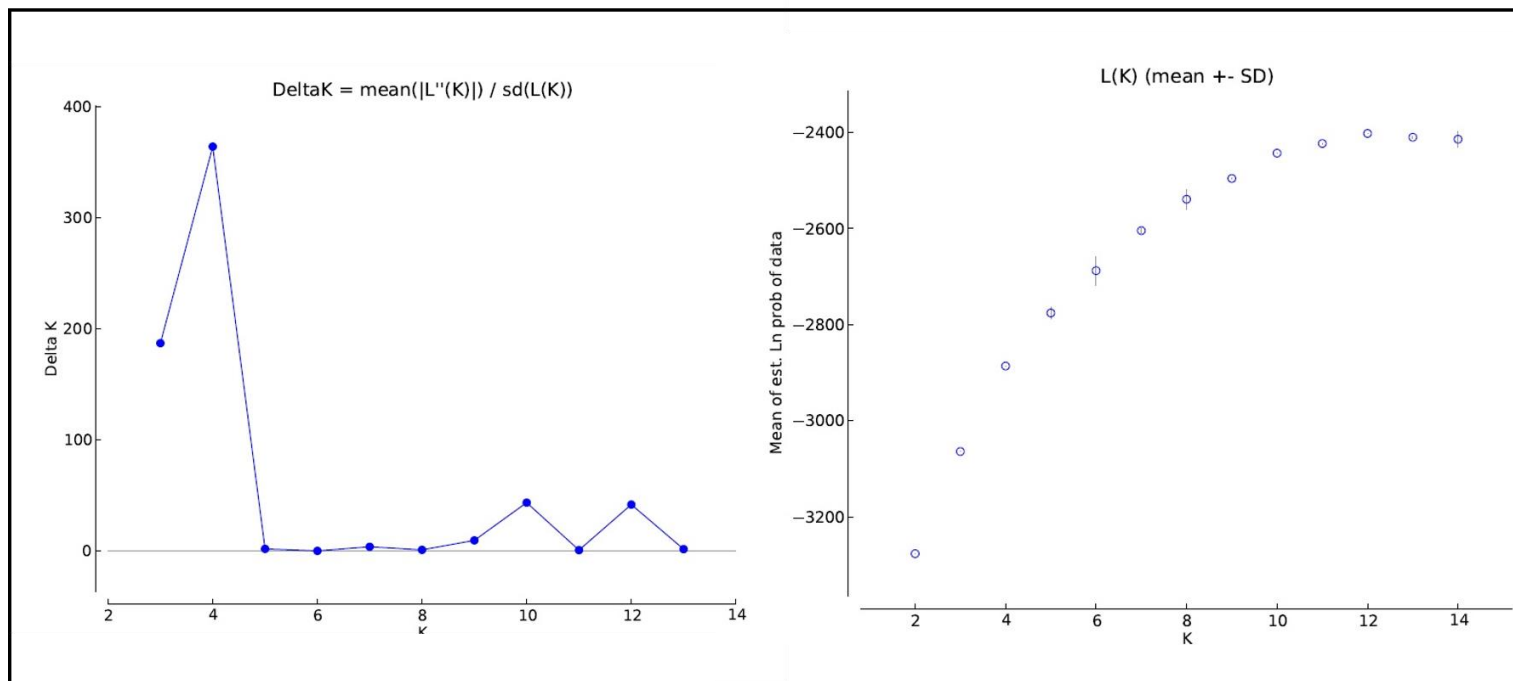


**Figura 4.** Localidades amostradas no bioma cerrado e em áreas de transição cerrado-caatinga. **BL:** Buritizal, São Paulo; **CB:** Canto do Buriti, Piauí; **XX:** Xique-Xique, Bahia; **DI:** Diamantino, Mato Grosso; **IBO:** Ibotirama, Bahia; **IT:** Ituiutaba, Minas Gerais; **MA:** Mambaí, Goiás; **MO:** Mozarlândia, Goiás; **NS:** Nossa Sra. do Livramento, Mato Grosso; **NX:** Nova Xavantina, Mato Grosso; **PA:** Palmeirante, Tocantins; **IB:** Paranoá, Distrito Federal; **PK:** Presidente Kennedy, Tocantins; **RA:** Rajadinha, Distrito Federal.

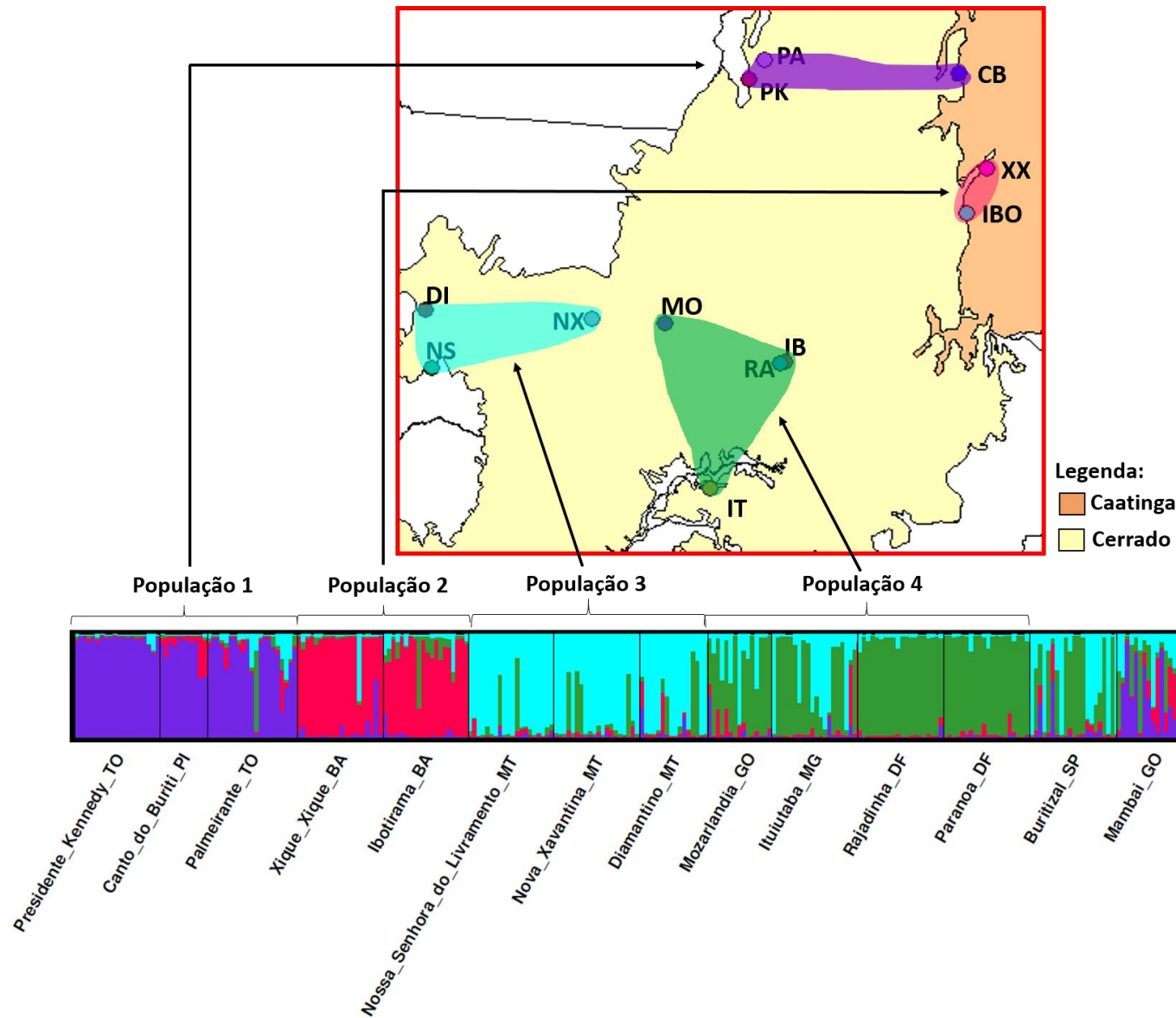


**Figura 5.** Gráfico representando o número de alelos por *locus*. Observe que o *locus* mais polimórfico foi o List14-064.

A partir dos resultados da análise bayesiana realizada nos programas *Structure* v. 2.2 (Pritchard *et al.*, 2000) e *Structure Harvester* (Earl *et al.*, 2012) para a definição do número de agrupamentos (K) em que as localidades amostradas estariam inseridas, com base na observação dos valores de  $\Delta K$  (*sensu* Evanno *et al.*, 2005), foi possível agrupar as 14 localidades de coleta em quatro populações (Figura 6). Com a definição de K, as 10 corridas de K=4 geradas no *Structure* v. 2.2 (Pritchard *et al.*, 2000) foram utilizadas para a construção de um gráfico de estruturação das populações de *R. neglectus* (Figura 7).



**Figura 6.** Gráfico dos valores de verossimilhança para definição do número de agrupamentos (K). À esquerda, os valores de delta K ( $\Delta K$ ) para cada agrupamento testado. Note que o maior valor obtido foi para o agrupamento contendo quatro populações. À direita, o gráfico dos valores de verossimilhança calculados a partir do log natural da probabilidade dos dados serem agrupados em de duas a 14 populações (K). Note que o valor de verossimilhança do agrupamento contendo quatro populações apresentou o menor desvio-padrão em relação à média e antecede imediatamente o platô do gráfico.



**Figura 7.** Gráfico da estruturação das 14 localidades analisadas. A partir do resultado, foi possível confirmar a separação das localidades em quatro populações pertencentes ao bioma cerrado e áreas de transição cerrado-caatinga (definidas em roxo, rosa escuro, ciano e verde). É possível notar que há migrantes entre as populações obtidas (barras com cores diferentes daquelas observadas no plano de fundo). É possível observar também que as localidades Buritizal (SP) e Mambai (GO) apresentaram muitos migrantes e, portanto, não foi possível agrupá-las em nenhuma das populações definidas.

Seis dos oito *loci* submetidos à análise no programa *Micro-Checker* v. 2.2 (Van Oosterhout *et al.*, 2004) apresentaram alelos nulos (Apêndice 9). Entretanto, a inclusão destes alelos nas análises não influenciou os resultados finais e, portanto, decidiu-se por não excluí-los (dados não mostrados). As quatro populações estudadas apresentaram indício de abandono de alelos (*allele dropout*).

As populações estudadas não apresentaram *locus* monomórfico, porém os *loci* List14-010 e List14-025 apresentaram o menor número de alelos nas populações 1 – 4 (2 e 3 alelos, respectivamente).

Nos oito *loci* analisados, foram encontrados ao todo 16 alelos privados, sendo nove na população 1 (242, 266 e 268 em List14-064; 83 em L03; 133 e 135 em List14-025; 346 em List14-013; 140 em L43; e 120 em R26), três na população 2 (264 em List14-064; 136 em L43; e 200 em R30), dois nas populações 3 e 4 (236 em List14-064; e 344 em List14-013; 103 em L03; e 152 em L43, respectivamente) (Tabela 4).

**Tabela 4:** Frequência alélica encontrada em cada uma das quatro populações para os oito *loci* de microssatélites analisados. Em vermelho pode-se notar os alelos privados para cada *locus* genotipado.

<i>Locus</i>	Alelos	População 1	População 2	População 3	População 4
List14-064	236	0,00	0,00	0,02	0,00
	240	0,07	0,00	0,00	0,1
	242	0,02	0,00	0,00	0,00
	244	0,03	0,00	0,18	0,00
	246	0,20	0,02	0,03	0,00
	248	0,28	0,02	0,00	0,00
	250	0,06	0,02	0,00	0,00
	252	0,18	0,43	0,68	0,69
	254	0,04	0,00	0,00	0,01
	256	0,02	0,13	0,03	0,14
	258	0,02	0,31	0,05	0,00
	260	0,02	0,02	0,02	0,03
	262	0,00	0,02	0,00	0,02
	264	0,00	0,02	0,00	0,00
	266	0,05	0,00	0,00	0,00
	268	0,01	0,00	0,00	0,00
L03	83	0,11	0,00	0,00	0,00
	85	0,03	0,10	0,41	0,27
	87	0,03	0,06	0,43	0,52
	89	0,00	0,00	0,04	0,03
	91	0,23	0,06	0,01	0,04
	93	0,60	0,59	0,05	0,00
	95	0,03	0,06	0,03	0,00
	97	0,03	0,07	0,00	0,00
	101	0,00	0,00	0,02	0,04
	103	0,00	0,00	0,00	0,10
113	0,03	0,00	0,01	0,00	
List14-025	133	0,18	0,00	0,00	0,00
	135	0,04	0,00	0,00	0,00
	139	0,69	0,57	0,07	0,20
	153	0,09	0,43	0,93	0,80

<i>Locus</i>	Alelos	População 1	População 2	População 3	População 4
List14013	332	0,11	0,02	0,26	0,11
	334	0,00	0,00	0,04	0,13
	336	0,57	0,25	0,40	0,53
	338	0,07	0,08	0,00	0,07
	340	0,08	0,40	0,02	0,15
	342	0,10	0,25	0,02	0,01
	344	0,00	0,00	0,26	0,00
	346	0,07	0,00	0,00	0,00
List14010	307	0,27	0,29	0,12	0,71
	309	0,73	0,71	0,88	0,29
L43	136	0,00	0,14	0,00	0,00
	138	0,11	0,00	0,02	0,05
	140	0,11	0,00	0,00	0,00
	142	0,18	0,00	0,00	0,82
	144	0,24	0,16	0,72	0,08
	150	0,03	0,00	0,24	0,09
	152	0,00	0,00	0,00	0,01
	154	0,33	0,00	0,00	0,01
	156	0,00	0,70	0,02	0,01
	R26	114	0,00	0,02	0,50
116		0,25	0,60	0,50	0,95
118		0,35	0,24	0,00	0,00
120		0,40	0,00	0,00	0,00
124		0,00	0,14	0,00	0,04
R30	200	0,00	0,19	0,00	0,00
	218	0,43	0,34	0,92	0,74
	220	0,57	0,47	0,08	0,26

Foi observado indício de desequilíbrio de ligação em 67 dos 112 (60%) testes realizados *locus-por-locus* de cada população, após a correção FDR ( $p \leq 0,01$ ; Apêndice 10). É provável que tenhamos obtido esse resultado devido ao número reduzido de indivíduos genotipados para determinadas populações, até o momento. Foram encontrados também desvios no equilíbrio de quatro populações ( $p \leq 0,016$ ), segundo o modelo de Hardy-Weinberg (H-W), para alguns *loci* (Tabela 5). Esses desvios podem estar sendo causados por efeito Wahlund, acasalamento não-aleatório, migração, seleção ou deriva genética.

**Tabela 5:** Teste chi-quadrado do equilíbrio de Hardy-Weinberg (H-W) dos oito marcadores microssatélites das populações de *R. neglectus*. Em negrito podemos notar os *loci* que não apresentaram equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada população estudada. **N** significa número de indivíduos genotipados para cada *locus*. População 1 – Palmeirantes, TO, Presidente Kennedy, TO e Canto do Buriti, PI; População 2 – Xique-Xique, BA e Ibotirama, BA; População 3 – Nossa Senhora do Livramento, MT, Nova Xavantina, MT e Diamantino, MT; População 4 – Rajadinha, DF, Paranoá, DF, Mozarlândia, GO e Ituiutaba, MG.

<i>Locus</i>	População 1			População 2			População 3			População 4		
	Chi-Quadrado	p	N	Chi-Quadrado	p	N	Chi-Quadrado	p	N	Chi-Quadrado	p	N
<b>List14064</b>	196,573	<b>0.000*</b>	50	101,556	<b>0.000*</b>	29	7,394	0,997	47	65,865	<b>0.000*</b>	67
<b>L03</b>	82,830	<b>0.000*</b>	39	3,000	0,083	17	9,004	<b>0.029*</b>	44	40,902	<b>0.000*</b>	44
<b>List14025</b>	37,106	<b>0.000*</b>	47	2,054	0,152	36	0,338	0,561	51	0,093	0,761	74
<b>List14013</b>	77,252	<b>0.000*</b>	43	27,167	<b>0.002*</b>	24	40,770	<b>0.006*</b>	32	228,879	<b>0.000*</b>	44
<b>List14010</b>	18,933	<b>0.000*</b>	46	11,241	<b>0.001*</b>	34	3,798	0,051	48	24,939	<b>0.000*</b>	62
<b>L43</b>	29,393	0,105	43	0,274	0,601	27	3,031	0,805	32	2,204	1,000	44
<b>R26</b>	50,408	<b>0.000*</b>	42	87,000	<b>0.000*</b>	29	0,490	0,484	48	0,160	0,984	64
<b>R30</b>	9,000	<b>0.003*</b>	28	32,000	<b>0.000*</b>	26	29,000	<b>0.000*</b>	35	19,000	<b>0.000*</b>	30

\*valor significativo após a correção do valor-p pelo algoritmo de FDR ( $p = 0,016$ ) para múltiplas comparações.



O índice modificado de Garza-Williamson (G-W) foi calculado a fim de testar se as populações sofreram efeito “gargalo de garrafa”. Os valores observados variaram entre 0,00 e 0,08. Em todas as populações, os valores de M foram próximos de zero (Tabela 6) e esses valores muito menores do que 1, poderiam indicar um possível efeito “gargalo de garrafa” nas populações analisadas.

**Tabela 6:** Valores do índice modificado de Garza-Williamson (Garza & Williamson 2001). População 1 – Palmeirantes, TO, Presidente Kennedy, TO e Canto do Buriti, PI; População 2 – Xique-Xique, BA e Ibotirama, BA; População 3 – Nossa Senhora do Livramento, MT, Nova Xavantina, MT e Diamantino, MT; População 4 – Rajadinha, DF, Paranoá, DF, Mozarlândia, GO e Ituiutaba, MG.

<i>Locus</i>	População 1	População 2	População 3	População 4
List14-064	0,05	0,04	0,03	0,03
L03	0,07	0,06	0,08	0,06
List14-025	0,03	0,02	0,02	0,02
List14-013	0,02	0,02	0,02	0,02
List14-010	0,00	0,00	0,00	0,00
L43	0,04	0,03	0,03	0,05
R26	0,03	0,04	0,02	0,03
R30	0,01	0,01	0,01	0,01

Após a definição das quatro populações foram calculados os valores estatísticos de  $F_{ST}$  e  $R_{ST}$  em comparações par-a-par, utilizando a informação genética dos oito *loci* microssatélites genotipados, a fim de estimar a estruturação populacional. A partir da análise dos valores de  $F_{ST}$  (em amarelo na Tabela 7) podemos observar níveis moderados de diferenciação populacional. As populações 3 e 4 apresentaram os maiores valores de  $F_{ST}$  (variando de 0,13 a 0,20, ambos significativos), já a população 2 apresentou os menores valores de  $F_{ST}$  (variando de 0,10 a 0,13, ambos também significativos). Já os valores de  $R_{ST}$  (em verde na Tabela 7) nos fornecem indícios de níveis baixos de diferenciação populacional (0,03 a 0,07, ambos significativos) ou até mesmo ausência de estruturação (0,00 a 0,03). O teste de Mantel evidenciou falta de correlação entre a divergência genética e a distância geográfica das populações ( $r = 0,38$ ;  $p = 0,185$ ). Todos os valores foram corrigidos para o índice de significância de 0,014 pelo método FDR (Benjamini & Yekutieli, 2001).

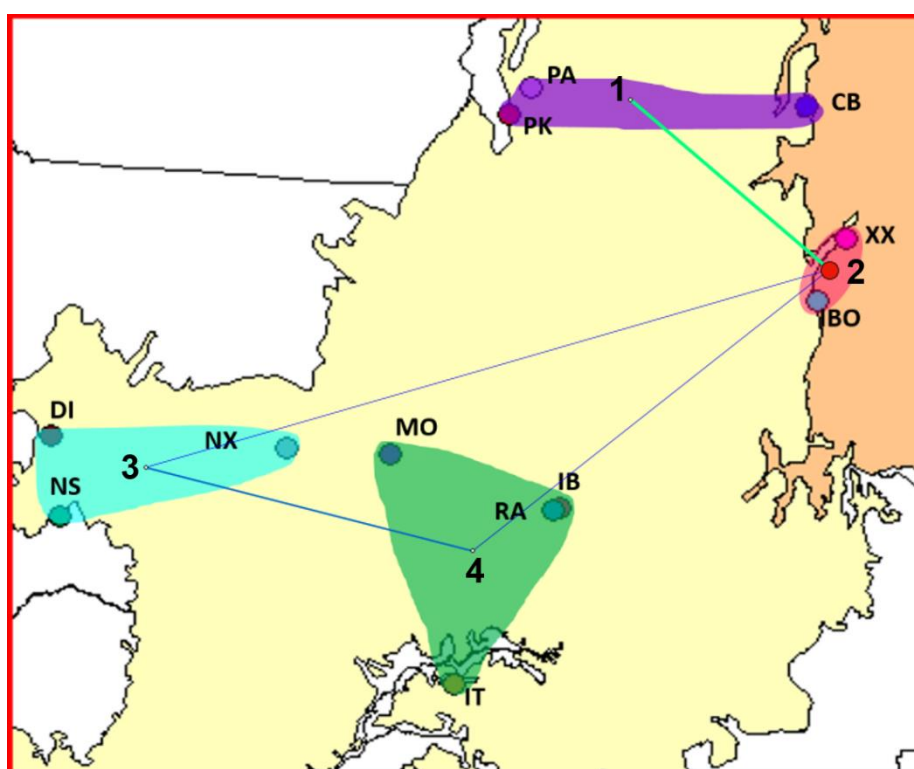
**Tabela 7:** Valores dos índices de  $F_{ST}$  (em amarelo) e  $R_{ST}$  (em verde) calculados a partir de comparações par-a-par das frequências alélicas interpopulacionais dos oito *loci* polimórficos analisados. O índice de significância alfa foi corrigido para 0,011 pelo método de FDR. Note que os valores de  $R_{ST}$  não foram significativos apenas na comparação entre as populações 2 e 3; 2 e 4. População 1 – Palmeirantes, TO, Presidente Kennedy, TO e Canto do Buriti, PI; População 2 – Xique-Xique, BA e Ibotirama, BA; População 3 – Nossa Senhora do Livramento, MT, Nova Xavantina, MT e Diamantino, MT; População 4 – Rajadinha, DF, Paranoá, DF, Mozarlândia, GO e Ituiutaba, MG.

	População 1	População 2	População 3	População 4
População 1	0,00	0,07*	0,07*	0,05*
População 2	0,10*	0,00	0,00	0,03
População 3	0,20*	0,15*	0,00	0,03*
População 4	0,20*	0,15*	0,13*	0,00

Uma rede de agrupamento populacional foi construída para melhor ilustrar as relações entre as populações estudadas. Observando a Tabela 8 e a Figura 8 é possível verificar que a população 2 exibe menor estruturação quando comparada às demais populações (medida pelo parâmetro *Clustering*), um maior valor de conexão (*Degree*) e intermediação (*Betweenness*) entre todas as populações estudadas. Este resultado indica que esta população poderia ser identificada como uma região “fonte” de migrantes para as demais populações. Foi obtido um valor alto de coeficiente *clustering* para a rede (0,60), indicando que a rede obtida não foi gerada de forma aleatória, dando confiabilidade no resultado obtido.

**Tabela 8:** Valores dos componentes *degree*, *clustering* e *betweenness*. Em negrito a população que apresentou os maiores valores de *degree* e *betweenness* e menor valor de *clustering*.

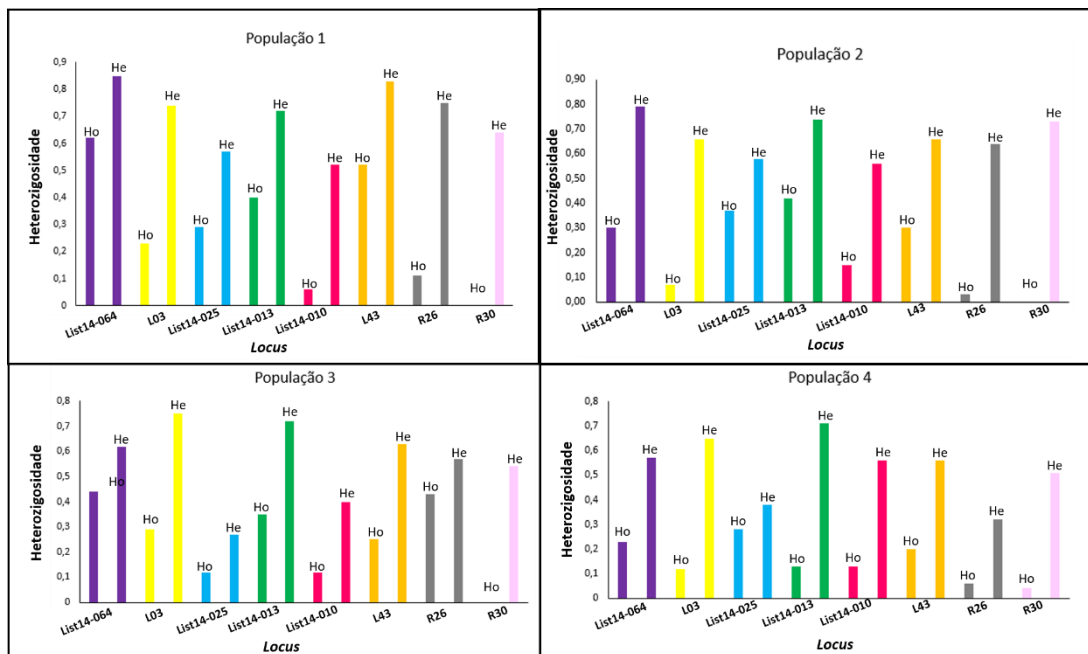
<b>População</b>	<b><i>Degree</i></b>	<b><i>Clustering</i></b>	<b><i>Betweenness</i></b>
1	1	0.00	0.00
<b>2</b>	<b>3</b>	<b>0.33</b>	<b>2.00</b>
3	2	1.0	0.00
4	2	1.0	0.00



**Figura 8:** Rede de agrupamento populacional mostrando que a população 2, representada pelo círculo vermelho, seria uma população “fonte” que estaria fornecendo migrantes para as demais populações.

O coeficiente de endogamia  $F_{IS}$  apresentou um valor alto e significativo (0,66;  $P \leq 0,011$ ), indicando desvio no equilíbrio de H-W nas populações (evidenciado pela redução na heterozigosidade), possivelmente em consequência da alta taxa de endocruzamentos. Essa redução na heterozigosidade pode ser visualizada nos gráficos de heterozigosidade observada e esperada para cada *locus*. É

possível observar que nenhum dos *loci* analisados apresentaram heterozigidade observada maior que a esperada (Figura 9).



**Figura 9:** Gráfico mostrando os valores de heterozigidade observada e esperada por *locus*. Ho significa heterozigidade observada e He heterozigidade esperada para cada *locus*.

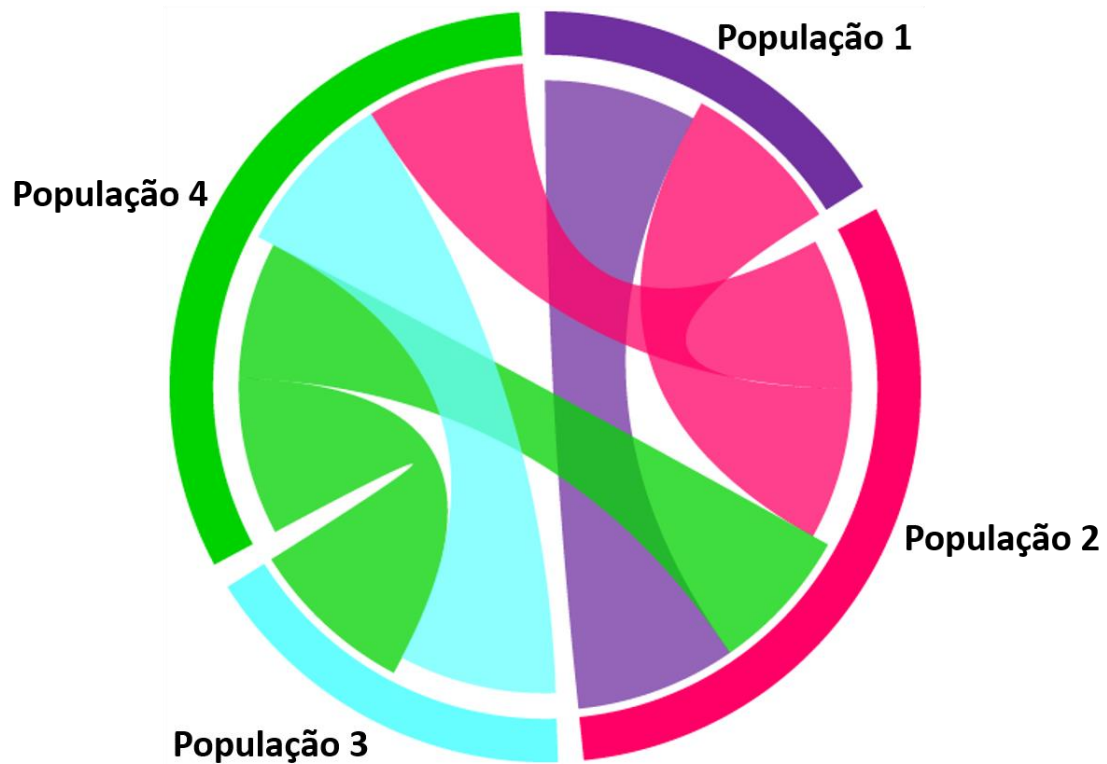
As análises realizadas no programa *Migrate-n* v. 3.6 (Beerli & Felsenstein 2001; Beerli & Palczewski 2010) revelaram que a hipótese de dispersão com maior probabilidade de ser verdadeira foi a *source-sink* 1 + *stepping-stone* 1 (probabilidade = 100%; Figura 10; Tabela 9 e 10), na qual a população 1 seria a possível população ancestral que teria fornecido migrantes para as demais populações, e portanto, a dispersão de *R. neglectus* do bioma cerrado e áreas de transição cerrado-caatinga teria ocorrido a partir da região mais ao norte do bioma cerrado (população 1), ocupando a área de transição cerrado-caatinga onde se encontra a população 2 e posterior ocupação da região onde se encontra a população 4 e 3.

**Tabela 9:** Valores marginais dos logaritmos de verossimilhança dos modelos de dispersão de *R. neglectus*, calculados segundo o modelo harmônico e corrigidos pelo método de Bezier. A partir do cálculo do fator bayesiano logarítmico (LBF), os modelos foram ranqueados de acordo com a probabilidade de cada um estar correto. O modelo escolhido com probabilidade de 100% é destacado em negrito.

Hipóteses	ImL Bezier	LBF(Bezier)	Probabilidade Modelo* (%)	Escolha Bezier **
<b>source-sink 1</b>	<b>-499,22</b>	<b>0,000</b>	<b>100</b>	<b>1</b>
source-sink 2	-528,76	-29,54	0	2
source-sink 3	-709,3	-210,08	0	5
source-sink 4	-603,33	-104,11	0	3
full migration	-707,71	-208,49	0	4
isolamento completo	-594119,48	-593620,26	0	6

**Tabela 10:** Valores marginais dos logaritmos de verossimilhança dos modelos de dispersão de *R. neglectus*, calculados segundo o modelo harmônico e corrigidos pelo método de Bezier. A partir do cálculo do fator bayesiano logarítmico (LBF), os modelos foram ranqueados de acordo com a probabilidade de cada um estar correto. O modelo escolhido com probabilidade de 100% é destacado em negrito.

Hipóteses	ImL Bezier	LBF(Bezier)	Probabilidade Modelo* (%)	Escolha Bezier **
<b>stepping-stone 1</b>	<b>-665,27</b>	<b>0,000</b>	<b>100</b>	<b>1</b>
stepping-stone 2	-712,23	-46,96	0	2



**Figura 10.** Fluxo gênico inferido pela análise bayesiana para a hipótese com maior probabilidade de ser verdadeira (*source-sink 1 + stepping stone 1*). As populações são representadas pelas respectivas cores da Figura 6. A espessura das linhas representa a porcentagem de migrantes, linhas mais grossas representam mais migrantes entre as populações analisadas. A cor das linhas corresponde a população fonte dos migrantes.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. A escolha dos marcadores microssatélites para a identificação da espécie em estudo: *Rhodnius neglectus*

Muitas espécies de triatomíneos podem ser identificadas com base em caracteres morfológicos. Porém, algumas espécies são morfológicamente idênticas (espécies crípticas) ou apresentam elevada plasticidade fenotípica (Lent & Wygodzinky, 1979; Dujardin *et al.*, 1999). Marcadores moleculares têm sido muito úteis na resolução de problemas taxonômicos, evolutivos e populacionais em triatomíneos (Abad-Franch & Monteiro, 2005). Marcadores que apresentam altas taxas de mutação são vantajosos para estudos populacionais, como, por exemplo, os microssatélites (Selkoe & Toonen, 2006) e por esse motivo foram escolhidos para este trabalho. Esses marcadores são altamente polimórficos e, portanto, podem ser utilizados para determinar o grau de relacionamento entre indivíduos ou grupos de uma mesma espécie (Blouin *et al.*, 1996), avaliar níveis de endogamia (Arbeláez-Cortes *et al.*, 2007), magnitude e direcionamento do fluxo de gênico entre as populações (Gaggiotti *et al.*, 2002), análise da história demográfica (Hoelzel *et al.*, 2002) e ainda estimar o tamanho efetivo de populações de uma mesma espécie (Hauser *et al.*, 2002).

Não existe ainda registro na literatura de microssatélites isolados especificamente para a espécie em estudo, *R. neglectus*. Uma excelente alternativa é a utilização na espécie alvo de iniciadores (*primers*) de microssatélites já descritos para outras espécies próximas. Esse procedimento demanda menos tempo e recursos financeiros do que o isolamento e descrição de regiões de repetição a partir da construção de bibliotecas genômicas. Até o momento 31 *loci* de microssatélites já foram descritos para espécies do gênero *Rhodnius* (Harry *et al.*, 1998; 2008; Fitzpatrick *et al.*, 2009), dos quais 19 foram testados em *R. neglectus* (Apêndice 1).

Os resultados obtidos aqui a partir da análise de oito *loci* microssatélites evidenciaram que os espécimes provenientes da área de transição cerrado-caatinga e muito semelhante aquele observado em *R. nasutus* (Figura 11) são uma variação cromática de *R. neglectus*, já que não foi encontrado nenhum

indício de um *locus* diagnóstico para a separação dos espécimes coletados no bioma cerrado e em áreas de transição cerrado caatinga.

A convergência fenotípica observada entre os padrões claros de *R. neglectus* provenientes da região de transição cerrado-caatinga e *R. nasutus*, por habitarem a mesma espécie de palmeira (*C. prunifera*) podem ter sido resultado de (a) seleção natural atuando em favor dos indivíduos que apresentam esse fenótipo claro no novo ecótopo, já que esses espécimes estariam camuflados no substrato claro das fibras da palmeira *C. prunifera* (Apêndice 8); ou (b) hibridação entre *R. neglectus* e *R. nasutus*.



**Figura 11.** Espécimes adultos de *Rhodnius neglectus* e *Rhodnius nasutus*. (A) indivíduo proveniente do bioma cerrado mais similar a padrão observado em *R. neglectus* (note o padrão escuro com pontos claros bem marcados no conexivo); (B) espécime proveniente da área de transição cerrado-caatinga morfológicamente similar ao indivíduo pertencente a espécie *R. nasutus*; (C) espécime proveniente do bioma caatinga pertencente a espécie *R. nasutus* (note o padrão claro com pontos menos marcados no conexivo). A identificação desses espécimes foi realizada por sequenciamento do gene *mtcytb* (Gurgel-Gonçalves *et al.*, dados não publicados).

## 5.2. Análises de estruturação das populações e filogeografia de *R. neglectus*

A estratégia de amostragem de *R. neglectus* foi a de abranger a maior área possível do bioma cerrado e das regiões de transição cerrado-caatinga, a fim de determinar se as populações que apresentaram fenótipo escuro (bioma cerrado)

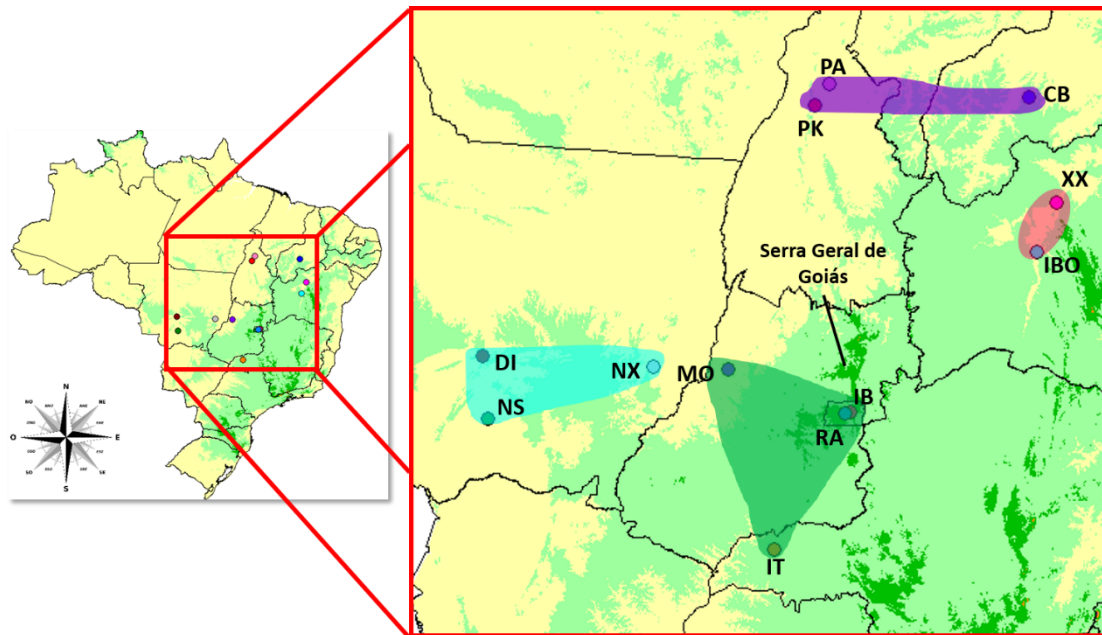


e claro (áreas de transição) são ecologicamente específicas e estão reprodutivamente isoladas, ou se existe fluxo gênico entre elas.

Os 258 espécimes de *R. neglectus* provenientes das 14 localidades amostradas foram agrupados em quatro populações, com base nas análises realizadas a partir dos oito *loci* microssatélites genotipados. Ao observamos o padrão populacional obtido é possível notar mais um indício de que os espécimes de *R. neglectus* escuro e claro não podem ser considerados espécies crípticas, neste trabalho, já que a população 1 foi formada por indivíduos de coloração escura presentes nas localidades de Palmeirantes e Presidente Kennedy, ambos no estado do Tocantins, e espécimes de coloração clara provenientes da localidade de Canto do Buriti no estado do Piauí. A partir dos índices de estruturação  $F_{ST}$  e  $R_{ST}$  foi possível observar que as quatro populações estudadas apresentaram de baixo a moderado a grau de estruturação populacional (Tabela 7). Com exceção na comparação par-a-par entre a população 3 e as populações 2 e 4 para o  $R_{ST}$ . Os resultados obtidos para o  $F_{ST}$  indicam que populações 1 e 3 ( $F_{ST}=0,20$ ;  $P \leq 0,011$ ) e 1 e 4 ( $F_{ST}=0,20$ ;  $P \leq 0,011$ ) estão mais bem estruturadas do que as populações 1 e 2 ( $F_{ST}=0,10$ ;  $P \leq 0,011$ ). Já as populações 4 e 3 estão menos estruturadas ( $F_{ST}=0,13$ ;  $P \leq 0,011$ ) do que as populações 4 e 2 ( $F_{ST}=0,15$ ;  $P \leq 0,011$ ). As quatro populações não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, como podemos notar que deficiências de heterozigotos significativas foram encontradas em diversos *loci*. Entretanto, dado que as populações encontradas distam 692 km (distância mínima entre duas populações) nós esperamos que o efeito Wahlund tenha uma menor importância para o desequilíbrio encontrado, já que espécies de triatomíneos têm uma baixa capacidade de dispersão. Contudo, sugerimos que a deficiência de heterozigotos encontrada nas populações analisadas possa ser consequência de endogamia devido à baixa capacidade de dispersão da espécie estudada que aumenta o cruzamento entre indivíduos aparentados.

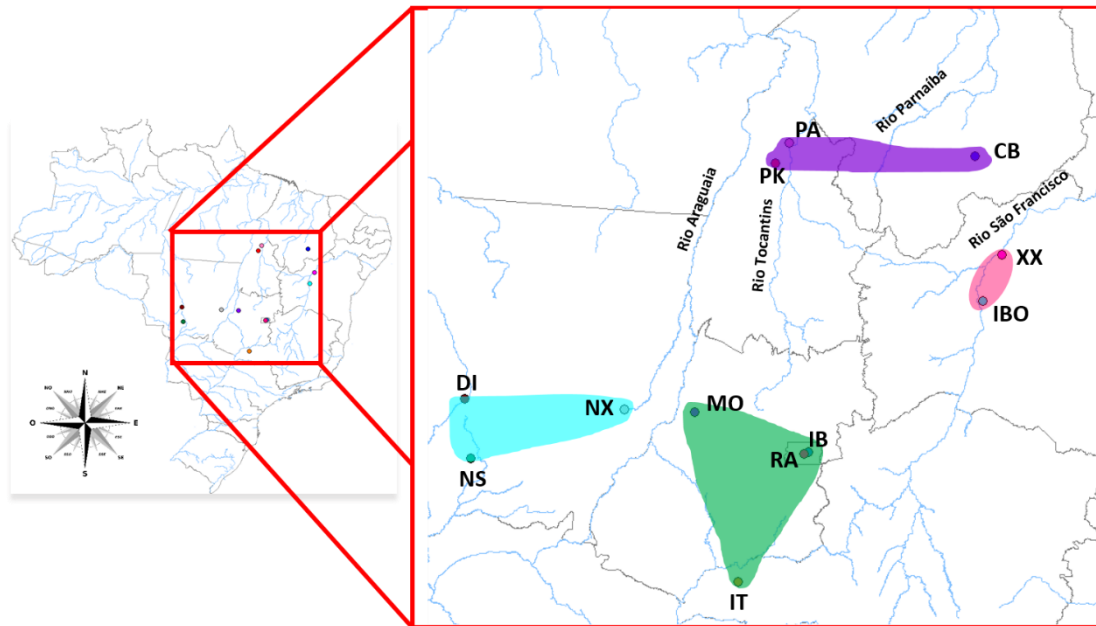
A fim de saber se o padrão populacional encontrado poderia ser explicado com base na geografia da área estudada, foram gerados dois mapas no programa *Diva-Gis 7.5* (Figura 12 e 13), sobrepondo a distribuição geográfica das sete populações com o relevo e os rios da região. A presença de regiões de planalto e de montanha (acima de 400 m de altitude) parece não impedir o fluxo

genético das populações de *R. neglectus* (Figura 12). Ao contrário do observado neste estudo, Faria e colaboradores (2013) analisaram fragmentos de mtcytb e do éxon 28 do fator nuclear Von Willenbrand (e28-vWF) de populações do marsupial *Gracilinanus agilis* e observaram que a Serra Geral de Góias, entre os estados de Góias e Bahia, teria sido responsável pela diversificação de *G. agilis*.



**Figura 12.** Mapa de relevo e populações de *R. neglectus* amostradas no bioma cerrado e em áreas de transição cerrado-caatinga. Observe que a elevação mais alta não parece ser uma barreira limitante para o fluxo gênico entre as populações. População 1: roxo; População 2: rosa; População 3: ciano; População 4: verde.

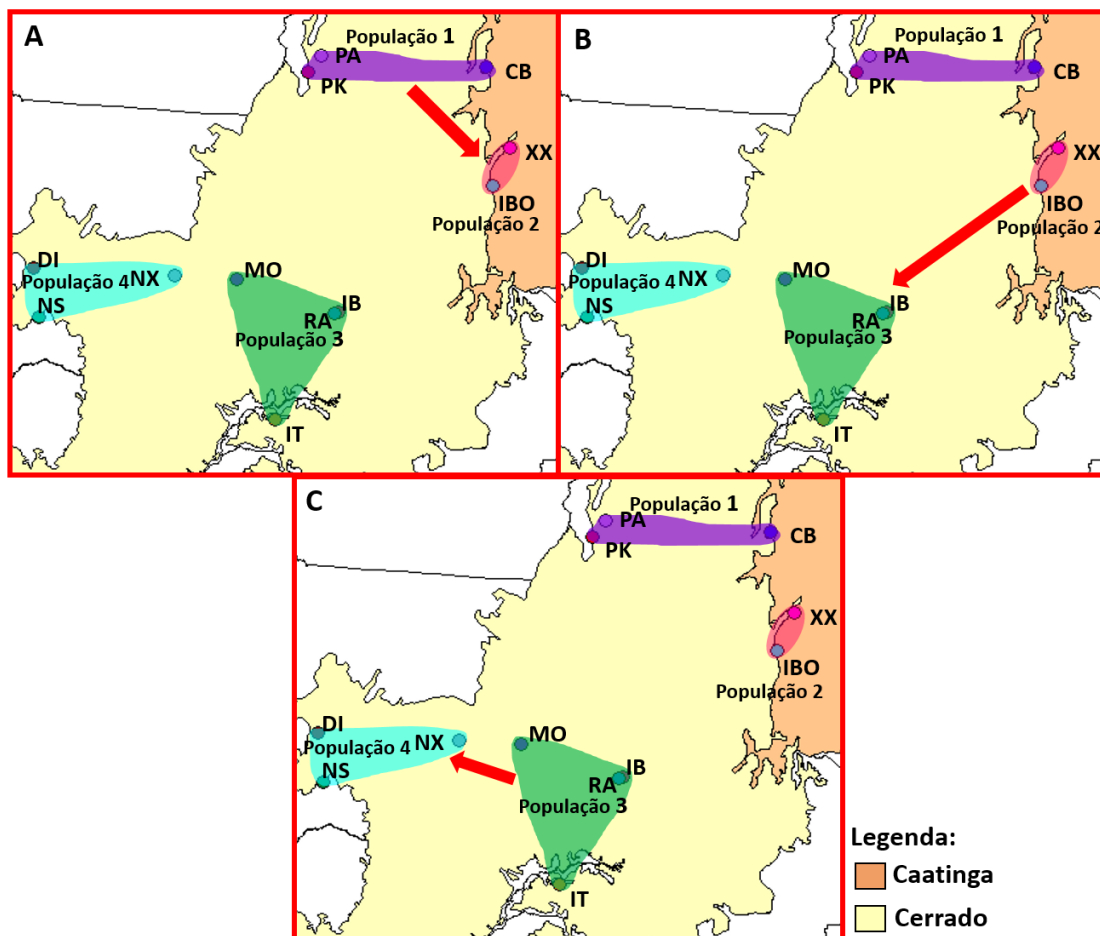
A presença de rios atuando como barreira ao fluxo gênico (Figura 13) parece explicar o padrão populacional obtido para as populações 2, 3 e 4 em relação as demais. A população 3 parece estar isoladas das populações 1, 2, e 4 pelo rio São Francisco, enquanto a população 3 parece estar isolada das populações 1 e 4 pelo rio São Araguaia. Coutinho-Abreu e colaboradores (2008) observaram, através do sequenciamento de um fragmento de mtcytb, que populações da espécie *Lutzomyia longipalpis s.l.* na região nordeste do Brasil, apresentaram moderada diferenciação genética quando comparados os grupos ao norte e ao sul da área estudada. Os autores sugerem que o rio São Francisco é uma barreira significativa, restringindo o fluxo gênico entre populações de *Lu. longipalpis s.l.*



**Figura 13.** Mapa de rios e populações de *R. neglectus* amostradas no bioma cerrado e em áreas de transição cerrado-caatinga. Observe que a hipótese de rios atuando como fator limitante para o fluxo gênico entre as populações estudadas parece explicar a estruturação elevação mais alta não parece ser uma barreira limitante para o fluxo gênico entre as populações. População 1: roxo; População 2: rosa; População 3: ciano; População 4: verde.

A partir do método bayesiano, foram testadas algumas hipóteses de dispersão de *R. neglectus* no bioma cerrado e em áreas de transição cerrado-caatinga. A hipótese com maior probabilidade de ser verdadeira (100%) foi a *source-sink 1 + stepping-stone 1* (Tabela 9 e 10). Nestas hipóteses, a população 1, a norte do bioma cerrado, seria uma possível fonte de migrantes e a partir desta população, indivíduos teriam migrado para região a nordeste do bioma ocupando a área de transição cerrado-caatinga onde se encontra a população 2 (Figura 14A). Posteriormente, espécimes da população 2 teriam migrado e ocupado secundariamente a região mais a oeste do bioma cerrado, onde se encontra a população 4 (Figura 14B). Finalmente, após a ocupação da região onde se encontra a população 4, indivíduos teriam migrado e ocupado a área onde se encontra a população 3 (Figura 14C). A rede de agrupamentos populacionais nos fornece indícios de que a população 2 seria uma possível população “fonte” de migrantes do sistema (Figura 7; Tabela 8) e estaria contribuindo para a manutenção do fluxo gênico entre as quatro populações estudadas.

É importante ressaltar ainda que os desvios significativos obtidos no equilíbrio de H-W podem ser resultantes de características ecológicas do inseto em estudo, já que triatomíneos apresentam uma baixa capacidade de dispersão ativa e, portanto, uma baixa variabilidade genética nas populações (Schofield 1994). Logo, a dispersão passiva é considerada um dos mais frequentes tipos de dispersão de triatomíneos, já que, ovos, ninfas e insetos adultos podem ser “carregados” em roupas humanas, em pelos de mamíferos e penas de aves (Forattini *et al.* 1971, Lent & Wygodzinsky 1979).



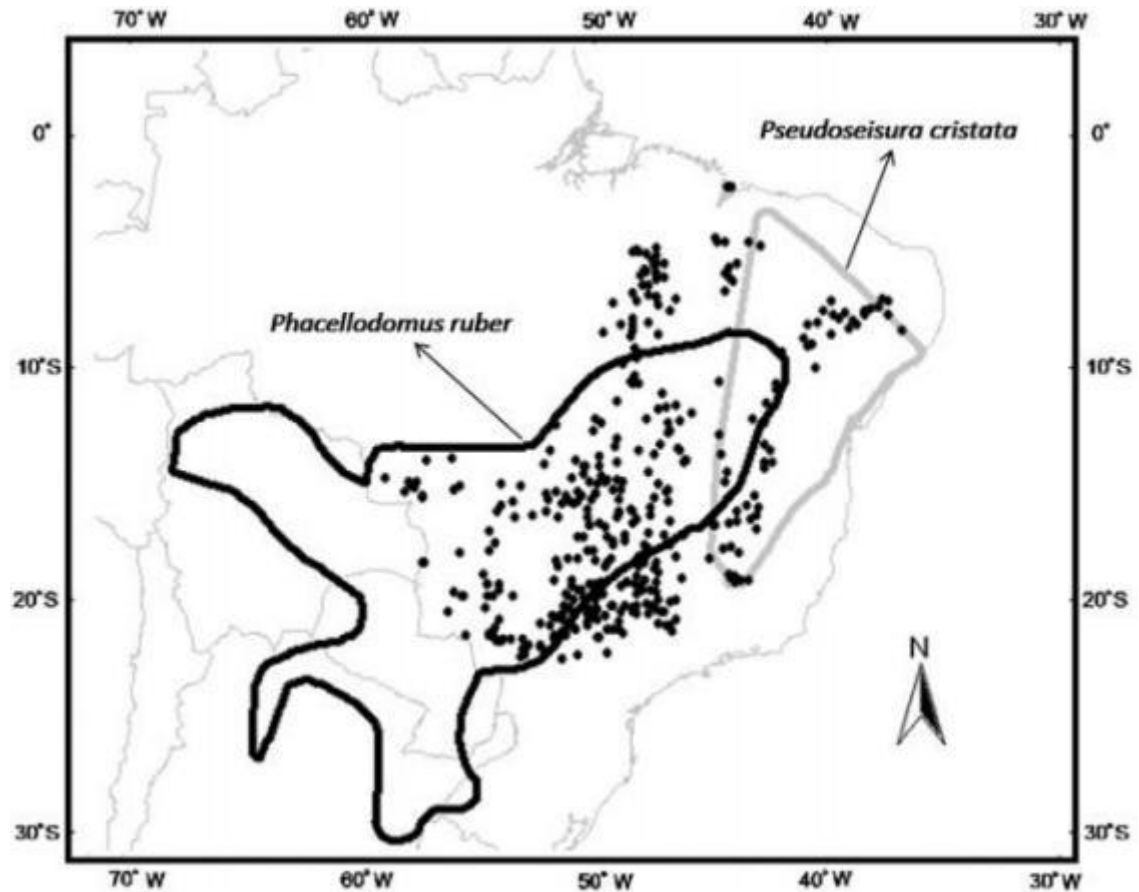
**Figura 14:** Origem e dispersão de *R. neglectus* no bioma cerrado e em áreas de transição cerrado-caatinga. (A) População 1 (em roxo) provável população ancestral teria fornecido migrantes para a população 2 (área de transição cerrado-caatinga, em rosa) (B) Indivíduos da população 2 teriam migrado para a população 4 (em verde) ocupando secundariamente o bioma cerrado; (C) Posteriormente indivíduos da população 4 teriam ocupado a área onde se encontra as população 3 (em azul).

A hipótese de dispersão de *R. neglectus* no bioma cerrado e áreas de transição cerrado caatinga no sentido oeste-nordeste foi defendida

anteriormente por Gurgel-Gonçalves (2008), ao analisar sequências do gene *mtcytb* de *R. neglectus*. O autor observou um haplótipo ancestral nos grupos oeste (formado pelas populações do Mato Grosso e oeste de Goiás) e leste (formado pelas populações presentes no Brasil central) da região estudada e sugeriu que a divergência entre os grupos oeste e leste de *R. neglectus* possivelmente teria ocorrido entre 0,9 e 1,1 milhão de anos atrás, período coincidente com a formação dos corredores transamazônicos secos. As populações do grupo oeste e leste poderiam ter tido um contato secundário com as linhagens de *Rhodnius* de savanas amazônicas e dos llanos venezuelanos via esses corredores transamazônicos no Pleistoceno, principalmente no norte de Mato Grosso e de Tocantins, promovendo a diversificação da região oeste para a leste. Neste trabalho, contrastando dos resultados obtidos por Gurgel-Gonçalves (2008), foi possível observar que essa diversificação pode ter ocorrido da região mais ao norte do bioma cerrado para a área a nordeste (transição cerrado-caatinga) e, posteriormente, uma ocupação secundária do cerrado na região oeste desse bioma.

É possível que as quatro populações estudadas nesse trabalho sejam mantidas isoladas por barreiras naturais, como os rios, e que o fluxo gênico observado (Figura 9) seja na realidade antigo. Porém, uma possível explicação para a manutenção do fluxo gênico recente entre as populações seria a hipótese de dispersão passiva por aves, já que *R. neglectus* está associado principalmente a palmeiras dos gêneros *Attalea*, *Acrocomia*, *Mauritia*, *Syagrus* e *Oenocarpus*, onde ocupa ninhos de pássaros da família Furnariidae (Diotaiuti & Dias, 1984, Gurgel-Gonçalves *et al.*, 2003, 2004, Abad-Franch *et al.*, 2009) e refúgios de mamíferos do gênero *Didelphis* (Gurgel-Gonçalves *et al.*, 2004). Espécies do gênero *Rhodnius* são ornitofílicas e secretam substâncias aderentes durante a oviposição. Desta forma, os ovos poderiam se aderir às penas das aves (Barata, 1998) e facilitar a dispersão passiva, promovendo a expansão da distribuição geográfica destes triatomíneos. *R. neglectus* é frequentemente encontrado em ninhos de aves, tais como *Phacellodomus ruber* (Gurgel-Gonçalves *et al.*, 2004, Gurgel-Gonçalves & Cuba, 2007) e *Pseudoseisura cristata* (Empereire & Romana, 2006). A partir da observação das áreas de distribuição geográfica dessas espécies de aves (Figura 15), é possível

notar uma grande área de sobreposição da distribuição de *P. ruber* e *P. cristata* com os registros de ocorrência de *R. neglectus*. Isso sugere que a dispersão passiva por pássaros pode ser um importante mecanismo de dispersão de *R. neglectus*, apoiando a distribuição geográfica potencial da região nordeste para a oeste do Brasil.



**Figura 15:** Sobreposição entre os registros ocorrência de *R. neglectus* (círculos pretos) e áreas de distribuição das aves da família Furnariidae no Brasil (modificado de Gurgel-Gonçalves & Cuba, 2009).

## 6. CONCLUSÃO

Após definir o padrão estrutural das populações de *R. neglectus* no bioma cerrado e em áreas de transição cerrado-caatinga estudadas, foi possível concluir que:

- (1) As populações de *R. neglectus* provenientes do bioma cerrado e de áreas de transição cerrado-caatinga não estão geneticamente isoladas e, portanto, a área de transição cerrado-caatinga não representa uma barreira ecológica para a dispersão de suas populações.
- (2) A população 2 parece ter um papel fundamental para a estrutura populacional de *R. neglectus* fornecendo migrantes para as demais populações estudadas.
- (3) A dispersão de *R. neglectus* no bioma cerrado e áreas de transição cerrado caatinga possivelmente ocorreu da região norte do bioma cerrado em direção a região leste deste bioma com a ocupação da área de transição cerrado-caatinga (nordeste) e posterior reocupação do bioma cerrado mais a oeste.
- (4) Possivelmente as quatro populações estudadas no bioma cerrado e em áreas de transição cerrado-caatinga sejam mantidas isoladas por barreiras naturais, como os rios, e que o fluxo gênico observado seja na realidade antigo. Porém, uma possível explicação para a manutenção do fluxo gênico recente entre as populações seria a hipótese de dispersão passiva por aves.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abad-Franch F; Monteiro FA (2005). Molecular research and the control of Chagas disease vectors. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 77: 437-454.
- Abad-Franch F; Monteiro FA (2007). Biogeography and evolution of Amazonian triatomines (Heteroptera: Reduviidae): implications for Chagas disease surveillance in humid forest ecoregions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102: 57-69.
- Abad-Franch F; Monteiro F; Jaramillo N; Gurgel-Gonçalves R; Dias FBS; Diotaiuti L (2009). Ecology, evolution, and the long-term surveillance of vector-borne Chagas disease: A multi-scale appraisal of the tribe Rhodniini (Triatominae). *Acta Tropica* 110: 159-177.
- Abad-Franch F; Ferraz G; Campos C; Palomeque FS; Grijalva MJ; Aguilar HM; Miles MA (2010). Modeling disease vector occurrence when detection is imperfect: infestation of Amazonian palm trees by triatomine bugs at three spatial scales. *Plos Neglected Tropical Disease* 4: 620.
- Abad-Franch F; Pavan MG; Jaramillo N; Palomeque FS; Dale C; Chaverra D; Monteiro FA (2013). *Rhodnius barretti*, a new species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) from western Amazonia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 108: 92-99.
- Abel GJ (2015). Estimates of global bilateral migration flow by gender between 1960 and 2010. *Vienna Institute of Demography Working Papers* 5/2015.
- Abraham L; Hernández L; Gorla D; Catalá S (2008). Phenotypic diversity of *Triatoma infestans* at the microgeographic level in the Gran Chaco of Argentina and the Andean valleys of Bolivia. *Journal of Medicine and Entomology* 45(4): 660-6.
- Almeida OS; Ceretti Júnior W; Obara MT; Santos HR; Barata JM; Faccenda O (2008). Levantamento da fauna de Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) em ambiente domiciliar e infecção natural por Trypanosomatidae no estado de Mato Grosso do Sul. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 41: 374-380.
- Anderson JM; Lai JE; Dotson EM; Cordon-Rosales C; Ponce C; Norris DE; Beard CB (2002). Identification and characterization of microsatellite markers in the



- Chagas disease vector *Triatoma dimidiata*. *Infection, Genetic & Evolution* 1: 243-248.
- Arbeláez-Cortes E; Castillo-Cárdenas MF; Toro-Perea N; Cárdenas-Henao H (2007). Genetic structure of the red mangrove (*Rhizophora mangle* L.) on the Colombian Pacific detected by microsatellite molecular markers. *Hydrobiologia* 583: 321-330.
- Barata, JMS (1998). Macroscopic and exochorial structures of Triatominae eggs (Hemiptera, Reduviidae), pp. 409 - 448. In R. U. Carcavallo, I. Galóndez Giron, J. Jurberg, and H. Lent (eds.), Atlas of Chagas disease vectors in Americas, vol. 2. Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil.
- Bargues MD; Klisiowicz DR; González-Candelas F; Ramsey JM; Monroy C; Ponce C; Salazar-Schettino PM; Panzera F; Abad-Franch F; Souza OE; Schofield CJ; Dujardin JP; Guhl F & Mas-Coma S (2008). Phylogeography and genetic variation of *Triatoma dimidiata*, the main Chagas disease vector in Central America, and its position within the genus *Triatoma*. *Plos Neglected Tropical Diseases* 2: 1-19.
- Barretto MP; Albuquerque DRR; Funayama GK (1979). Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XXXVI: Investigaç o sobre triatomíneos de palmeiras no município de Uberaba, MG, Brasil. *Revista Brasileira de Biologia* 29: 577-588.
- Batista TA & Gurgel-Gonç alves R (2009). Ecological niche modelling and differentiation between *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 and *Rhodnius nasutus* St al, 1859 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in Brazil. *Mem rias do Instituto Oswaldo Cruz* 104: 1165-1170.
- Beerli P; Felsenstein J (2001). Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in n subpopulations by using a coalescent approach. *Proceedings of National Academy of Sciences* 98(8): 4563–4568.
- Beerli P; Palczewski M (2010). Unified framework to evaluate panmixia and migration direction among multiple sampling locations. *Genetics* 185:313-326.
- Belis rio CJ; Pessoa GCD; Santos PF; Dias LS, Rosa ACL; Diotaiuti L (2015). Markers for the populations genetic studies of *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae). *Parasites & Vectors* 8: 269.
- Benjamini, Y, Yekutieli, D (2001). The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. *Annals of Statistics* 29: 1165-1188.

- Bento DNC; Farias LM; Godoy MF; Araújo JFP (1992). Epidemiologia da doença de Chagas na zona rural do município de Teresina-Piauí, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 25: 51-58.
- Blouin MS; Parsons M; Lacaille V; Lotz S (1996). Use of microsatellite loci to classify individuals by relatedness. *Molecular Ecology* 5: 393-401.
- Carcavallo, RU; Curto de Casas SI; Sherlock I; Galíndez Girón I, Jurberg J; Galvão C; Mena Segura CA; Noireau F (1999). Geographical distribution and alti-latitudinal dispersion; p. 747- 792 In R.U. Carcavallo, I. Galíndez Girón, J, Jurberg and H. Lent. (ed.) Atlas of Chagas disease vectors in Americas, Volume III. Rio de Janeiro: Fiocruz.
- Ceballos LA; Piccinali RV; Marcet PL; Vazquez-Prokopec GM; Cardinal MV; Schachter-Broide J; Dujardin JP; Dotson EM; Kitron U; Gurtler RE (2011). Hidden sylvatic foci of the main vector of Chagas disease *Triatoma infestans*: threats to the vector elimination campaign? *Plos Neglected Tropical Disease* 5: 1365.
- Chagas C (1909). Nova trypanosomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o cyclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 1: 159-218.
- Chistiakov DA; Hellemans B; Volckaert FAM (2006). Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture* 255: 1-29.
- Coura JR (2007). Chagas disease: what is known and what is needed – A background article. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102: 113-122.
- Coura JR; Borges-Pereira J (2010). Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Tropica* 115: 5–13.
- Coutinho-Abreu IV, Sonoda IV, Fonseca JA, Melo MA, Balbino VQ, Ramalho-Ortigão M 2008. *Lutzomyia longipalpis*.I. in Brazil and the impact of the São Francisco River in the speciation of this sand fly vector. *Parasit Vectors* 1: 16.
- Dias JCP & Schofield CJ (1998). Controle da transmissão transfusional da doença de Chagas na Iniciativa do Cone Sul. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 31: 373-383.

- Dias JCP; Silveira AC; Schofield CJ (2002). The impact of Chagas disease control in Latin America - A review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97: 603-612.
- Dias FBS; Bezerra CM; Machado EMM; Casanova C; Diotaiuti L (2008). Ecological aspects of *Rhodnius nasutus* Stål, 1859 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in palms of the Chapada do Araripe in Ceará, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 103: 824-830.
- Diotaiuti L; Dias JCP (1984). Ocorrência e biologia de *Rhodnius neglectus*, Lent, 1954 em macaubeiras da periferia de Belo Horizonte, Minas Gerais. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 79: 293-301.
- Dujardin JP; Chaves T; Moreno JM; Machane M; Noireau F; Schofield CJ (1999). Comparation of isozyme electrophoresis and morphometric analysis for phylogenetic reconstruction of the Rhodniini (Heiptera: Reduviidae: Triatominae). *Journal of Medical Entomology* 36: 653-659.
- Earl DA & VonHoldt BM (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4(2): 359-361.
- Ellegren H (2004). Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics* 5: 435-445.
- Empeaire L & Romana CA (2006). Triatominae et Cactaceae: un risque pour la transmission de la Trypanosomose Américaine dans le péri-domicile (Nord-Est du Brésil). *Parasite* 13: 171-178.
- Evanno G; Regnault S; Goudet J (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software structure. A simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611–2620.
- Excoffier L; Lischer HE (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology* 10: 564-567.
- Faria MB, Nascimento FF, Oliveira JA, Bonvicino CR. (2013). Biogeographic determinants of Genetic Diversification in the Mouse Opossum *Gracilinanus agilis* (Didelphimorphia: Didelphidae). *Journal of Heredity* 104: 613–626.
- Ferdy JB; Austerlitz F (2002). Extinction and introgression in a community of partially cross-fertile plant species. *The American Naturalist* 160: 74-86.

- Fitzpatrick S; Feliciangeli MD; Sánchez-Martín M; Monteiro FA; Miles MA (2008). Molecular genetics reveal that silvatic *Rhodnius prolixus* do colonise rural houses. *Plos Neglected Tropical Disease* 2: 210.
- Fitzpatrick S; Watts PC; Feliciangeli MD; Miles MA; Kemp SJ (2009). A panel of ten microsatellite loci for the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Infection, Genetic & Evolution* 9: 206-209.
- Freitas SPC; Lorosa ES; Rodrigues DCS; Freitas ALC; Gonçalves TCM (2005). Fontes alimentares de *Triatoma pseudomaculata* no Estado do Ceará, Brasil. *Revista de Saúde Pública* 39: 27-32.
- Gaggiotti OE; Lange O; Rassmann K; Gliddon CA (2002). Comparison of two indirect methods for estimating average levels of gene flow using microsatellite data. *Molecular Ecology* 8: 1513-1520.
- Galvão C; Carcavallo R; Rocha DS; Jurberg J (2003). A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae, Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographic distribution. *Zootaxa* 202:1-36.
- Garcia BA; Zheng LO; Perez de Rosas AR; Segura EL (2004). Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the Chagas" disease vector *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Molecular Ecology* 4: 568-571.
- Garza JC; Williamson EG (2001). Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular Ecology* 10: 305-308.
- Gaunt M & Miles MA (2000). The ecotopes and evolution of triatomine bugs (Triatominae) and their associated trypanosomes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 95: 557–565.
- Gu Z; Gu L; Eils R; Schlesner M; Brors B (2014). Circlize implements and enhances circular visualization in R. *Bioinformatics* 30: 2811-2812.
- Guhl F; Pinto N; Aguilera G (2009). Sylvatic triatominae: a new challenge in vector control transmission. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104 (1): 71-75.
- Gurgel-Gonçalves R; Palma ART; Menezes MNA; Leite RN; Cuba CAC (2003). Sampling *Rhodnius neglectus* in *Mauritia flexuosa* palm trees: a field study in the Brazilian savanna. *Medical and Veterinary Entomology* 17: 347–349.
- Gurgel-Gonçalves R; Duarte MA; Ramalho ED; Romaña CA; Cuba CAC (2004a). Distribuição espacial de populações de Triatominae (Hemiptera, Reduviidae)

- em palmeiras da espécie *Mauritia flexuosa* no Distrito Federal, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 37: 241-247.
- Gurgel-Gonçalves R; Ramalho ED; Marcos ABD; Palma ART; Abad-Franch F; Carranza JC; Cuba CAC (2004b). Enzootic transmission of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in Federal District of Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 46 (6): 323-330.
- Gurgel-Gonçalves R & Cuba CAC (2007). Estrutura de populações de *Rhodnius neglectus* (Lent) e *Psammolestes tertius* (Lent & Jurberg) (Hemiptera, Reduviidae) em ninhos de pássaros (Furnariidae) presentes na palmeira *Mauritia flexuosa* no Distrito Federal, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 24: 157-163.
- Gurgel-Gonçalves R (2008). Filogeografia, morfometria e distribuição geográfica potencial de populações de *Rhodnius neglectus* (Hemiptera, Reduviidae) no Brasil. Tese de Doutorado. Universidade de Brasília -Brasília. 212p.
- Gurgel-Gonçalves R & Cuba CAC (2009). Estrutura de populações de *Rhodnius neglectus* (Lent) e *Psammolestes tertius* (Lent & Jurberg) (Hemiptera, Reduviidae) em ninhos de pássaros (Furnariidae) presentes na palmeira *Mauritia flexuosa* no Distrito Federal, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 24: 157-163.
- Gurgel-Gonçalves R; Pereira FCA; Lima IP; Cavalcante RR (2010). Distribuição geográfica, infestação domiciliar e infecção natural de triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae) no estado do Piauí, Brasil, 2008. *Revista Pan-Amazônica de Saúde* 1: 57-64.
- Gurgel-Gonçalves R; Galvão C; Costa J; Peterson AT (2012). Geographic distribution of Chagas disease vectors in Brazil based on ecological niche modeling. *Journal of Tropical Medicine* 2012: 1-15.
- Harry M; Galindez I & Cariou ML (1992). Isozyme variability and differentiation between *Rhodnius prolixus*, *R. robustus* and *R. pictipes*, vectors of Chagas disease in Venezuela. *Medical and Veterinary Entomology* 6: 37-43.
- Harry M (1993a). Isozymic data question the specific status of some blood-sucking bugs of the genus *Rhodnius*, vectors of Chagas disease. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine Hygiene* 87: 492-493.

- Harry M (1993b). Use of the median process of the pygophore in the identification of *Rhodnius nasutus*, *R. neglectus*, *R. prolixus* and *R. robustus* (Hemiptera: Reduviidae). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 87: 277–282.
- Harry M; Poyet G; Romana CA; Solignac M (1998). Isolation and characterization of microsatellite markers in the bloodsucking bug *Rhodnius pallescens* (Heteroptera, Reduviidae). *Molecular Ecology* 7: 1784-1786.
- Harry M; Dupont L; Romana C; Demanche C; Mercier A; Livet A; Diotaiuti L; Noireau F; Emperaire L (2008a). Microsatellite markers in *Triatoma pseudomaculata* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), Chagas' disease vector in Brazil. *Infection, Genetic & Evolution* 8: 672-675.
- Harry M; Roose CL; Vautrin D; Noireau F; Romana CA; Solignac M (2008b). Microsatellite markers from the Chagas disease vector, *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae), and their applicability to *Rhodnius* species. *Infection, Genetic & Evolution* 8: 381-385.
- Harry M; Dupont L; Quartier M; Diotaiuti L; Walter A; Romana C (2009). New perspectives for population genetics of Chagas' disease vectors in the Northeastern Brazil: isolation of polymorphic microsatellite markers in *Triatoma brasiliensis*. *Infection, Genetic & Evolution* 9: 633-637.
- Hauser L; Adcock GJ; Smith PJ; Ramírez JHB; Carvalho GR (2002). Loss of microsatellite diversity and low effective population size in an overexploited population of New Zealand snapper (*Pagrus auratus*). *Proceedings of the National Academy of Science* 99: 11742-11747.
- Hernández ML; Abraham LB; Dujardin JP; Gorla DE; Catalá SS (2011). Phenotypic variability and population structure of peridomestic *Triatoma infestans* in rural areas of the arid Chaco (western Argentina): spatial influence of macro- and microhabitats. *Vector-Borne and Zoonotic Disease* 11:503–513.
- Herrera-Aguilar M; Be-Barragán LA; Ramirez-Sierra MJ; Tripet F; Dorn P; Dumonteil E (2009). Identification of a large hybrid zone between sympatric sibling species of *Triatoma dimidiata* in the Yucatan peninsula, Mexico, and its epidemiological importance. *Infection, Genetics and Evolution* 9: 1345-1351.
- Hoelzel AR; Natoli A; Dahlheim ME; Olavarria C; Baird RW; Black NA (2002). Low worldwide genetic diversity in the killer whale (*Orcinus orca*): implications for demographic history. *Proceedings of the Royal Society of Biological Science* 269: 1467-1473.

- Hong-Mei, S; Jun-Jie; B; Ying-Chun, Q; Sheng-Jie, Li (2009). Identification and structure analysis of three tilapia species using microsatellite markers. *Chinese Journal of Agricultural and Biotechnology* 6: 119-125.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE): disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm> acessado em 26 de abril de 2016.
- Jakobsson M & Rosenberg NA (2007). CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23(14): 1801-1806.
- Juberg J; Rodrigues JMS; Moreira FFF; Dale C; Cordeiro IRS; Junior VDL; Galvão C; Rocha DS (2014). Atlas iconográfico dos triatomíneos do Brasil (vetores da doença de Chagas). Disponível em: [http://www.fiocruz.br/ioc/media/Atlas\\_triatominio\\_jurberg.pdf](http://www.fiocruz.br/ioc/media/Atlas_triatominio_jurberg.pdf) acessado em 26 de abril de 2016.
- Justi SA; Noireau F; Cortez MR & Monteiro FA (2010). Infestation of peridomestic *Attalea phalerata* palms by *Rhodnius stali*, a vector of *Trypanosoma cruzi* in the Alto Beni, Bolivia. *Tropical Medicine and International Health* 15: 727-32.
- Kimura M & Crow J (1964). The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49: 725-738.
- Kimura M & Ohta T (1978). Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in finite populations. *Proceedings of the National Academy of Science* 75:2868-2872.
- Kivelä M; Arnould-Haondi S; Saramäki J (2014). EDENetworks: A user-friendly software to build and analyse network in biogeography, ecology and population genetics. *Molecular Ecology* doi:10.1111/1755-0998.12290.
- Lent H; Wygodzinsky P (1979). Revision of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas disease. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 163: 123-520.
- Lima MM; Sarquis O (2008). Is *Rhodnius nasutus* (Hemiptera; Reduviidae) changing its habitat as a consequence of human activity? *Parasitol Research* 102: 97-800.
- Lyman DF; Monteiro FA; Escalante AA; Cordon-Rosales C; Wesson DM; Dujardin JP & Beard CB (1999). Mitochondrial DNA sequence variation among

- triatomine vectors of Chagas disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 60: 377-386.
- Marcet PL; Lehmann T; Groner G; Gurtler RE; Kitron U; Dotson EM (2006). Identification and characterization of microsatellite markers in the Chagas disease vector *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Infection, Genetic & Evolution* 6: 32-37.
- Mello DA (1977). Biology of Triatominae (Reduviidae, Hemiptera) from north of Formosa county (Goiás - Brazil) II. Length of life cycle of *Rhodnius neglectus* Lent, 1954. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 11:63-66.
- Miles MA; Souza AA; Póvoa M (1981). Chagas' disease in the Amazon Basin. III. Ecotopes of ten triatomine bug species (Hemiptera: Reduviidae) from the vicinity of Belém, Pará State, Brazil. *Journal of Medical Entomology* 18: 266-278.
- Monteiro FA; Barrett TV; Fitzpatrick S; Cordon-Rosales C; Feliciangeli D & Beard CB (2003). Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. *Molecular Ecology* 12: 997-1006.
- Monteiro FA; Peretolchina T; Lazoski C; Harris K; Dotson E; Abad-Franch F; Tamayo E; Pennington P; Monroy C; Cordon-Rosales C; Salazar-Schetino PM; Gomes-Palacio A; Grijalva M; Beard CB; Marcet PL (2013). Phylogeographic Pattern and Extensive Mitochondrial DNA Divergence Disclose a Species Complex within the Chagas Disease Vector *Triatoma dimidiata*. *Plos One* 8: 70974.
- Nattero J; Malerba R; Rodríguez CS; Crocco L (2013). Phenotypic plasticity in response to food source in *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Hemiptera, Reduviidae: Triatominae). *Infection, Genetic & Evolution* 19:38-44.
- Noireau F; Flores R; Gutierrez T & Dujardin JP (1997). Detection of wild dark morphs of *Triatoma infestans* in the Bolivian Chaco. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 92: 583-584.
- Noireau F; Flores R; Gutierrez T; Abad-Franch F; Flores E; Vargas F (2000). Natural ecotopes of *Triatoma infestans* dark morph and other wild triatomines in the Bolivian Chaco. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 94:23-27.



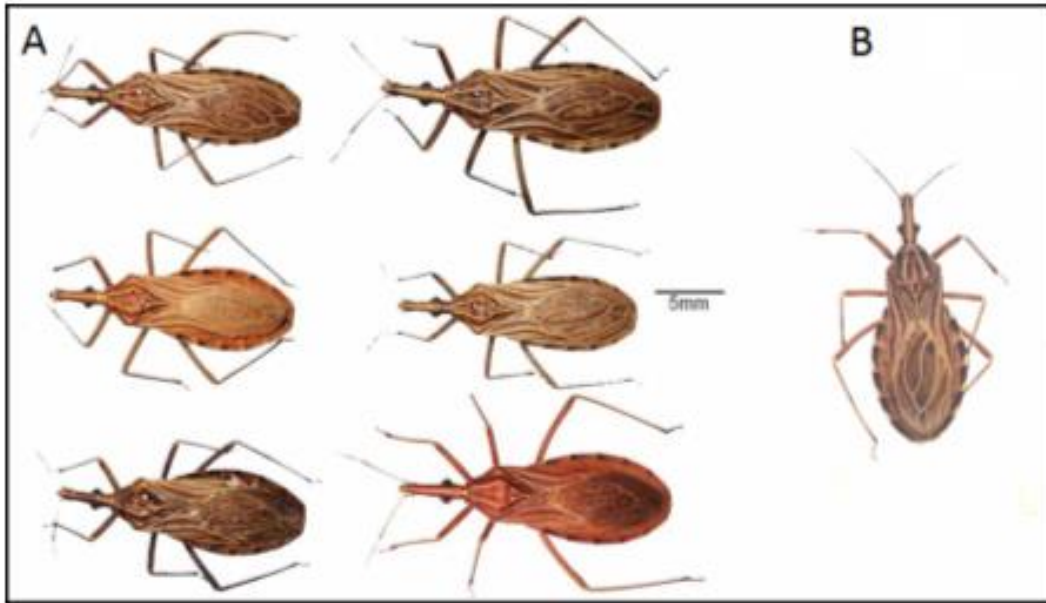
- Oliveira AWS; Silva IG (2007). Distribuição geográfica e indicadores entomológicos de triatomíneos sinantrópicos capturados no estado de Goiás. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 40: 204-208.
- OMS - Organização Mundial da Saúde (2002). Control of Chagas disease. Second Report of the WHO Expert Committee. *WHO Technical Report Series* 905: 1-109.
- OMS - Organização Mundial da Saúde (2016). Chagas disease (American trypanosomiasis). Fact sheet N°340 [atualizado em: março de 2016; acessado em: abril de 2016]: Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>.
- Organização Panamericana de Saúde (2006). Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en Las Américas. Montevideo: OPAS. 29p.
- Pavan MG; Monteiro FA (2007). A multiplex PCR assay that separates *Rhodnius prolixus* from members of the *R. robustus* cryptic species complex (Hemiptera: Reduviidae). *Tropical Medicine and International Health* 12: 751-758.
- Pavan MG (2009). Filogeografia de *Rhodnius pictipes* (Hemiptera: Reduviidae) na região amazônica. Dissertação de Mestrado. Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ. Rio de Janeiro. 127p.
- Pavan MG; Mesquita RD; Lawrence GG; Lazoski C; Dotson EM; Abubucker S; Mitreva M; Randall-Maher J; Monteiro FA (2013). A nuclear single-nucleotide polymorphism (SNP) potentially useful for the separation of *Rhodnius prolixus* from members of the *Rhodnius robustus* cryptic species complex (Hemiptera: Reduviidae). *Infection, Genetic & Evolution* 14:426-33.
- Peakall R; Smouse PE (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update. *Bioinformatics* 28, 2537-2539.
- Pereira JM; Almeida OS; Sousa AV; Paula AM; Machado RB; Gurgel-Gonçalves R (2013). Climatic factors influencing triatomine occurrence in Central-West Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 108: 335:341.
- Pritchard JK; Stephens M; Donnelly P (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Quisberth S; Waleckx E; Monje M; Chang B; Noireau F; Breniere SF (2011). "Andean" and "non-Andean" ITS-2 and mtCytB haplotypes of *Triatoma*

- infestans* are observed in the Gran Chaco (Bolivia): population genetics and the origin of reinfestation. *Infection, Genetic & Evolution* 11: 1006-1014.
- Romaña CA; Pizarro JCN; Rodas E; Guilbert E (1999). Palm trees as ecological indicators of risk areas for Chagas disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 93: 594-595.
- Rosenberg NA (2004). DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology* 4:137-138.
- Routtu, J (2007). Genetic and phenotypic divergence in *Drosophila virilis* and *D. montana*. *Jyväskylä studies in biological and environmental Science*; 181: 1-36.
- Sandoval CM; Duarte R; Gutiérrez R; Rocha DS; Angulo VM; Esteban L; Reyes M; Jurberg J; Galvão C (2004). Feeding sources and natural infection of *Belminus herreri* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) from dwellings in Cesar, Colombia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 99:137–140.
- Schachter-Broide J, Dujardin JP, Kitron U, Gürtler RE. Spatial structuring of *Triatoma infestans*(Hemiptera, Reduviidae) populations from northwestern Argentina using wing geometric morphometry. *J Med Entomol.* 2004;41:643–649.
- Schofield CJ (1994). *Triatominae Biology & Control*. West Sussex: Eurocommunica Publications.
- Schuelke M (2000). An economic method for the fluorescent labelling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18: 233-234.
- Selkoe KA & Toonen RJ (2006). Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellites markers. *Ecology Letters* 9: 615-629.
- Silveira AC; Feitosa VR; Borges R (1984). Distribuição de triatomíneos capturados no ambiente peridomicilar, no período de 1975/83, Brasil. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais* 39: 15-312.
- Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde (2015). Boletim Epidemiológico. Doença de Chagas aguda no Brasil: uma série histórica de 2000 a 2013. Volume 46 nº21.
- Stauffer D; Aharony A (1994). *Introduction to Percolation Theory*. London. Van Oosterhout C; Hutchinson WF; Wills DPM; Shipley PF (2004) MICRO-CHECKER: For identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology* 4: 535-538.

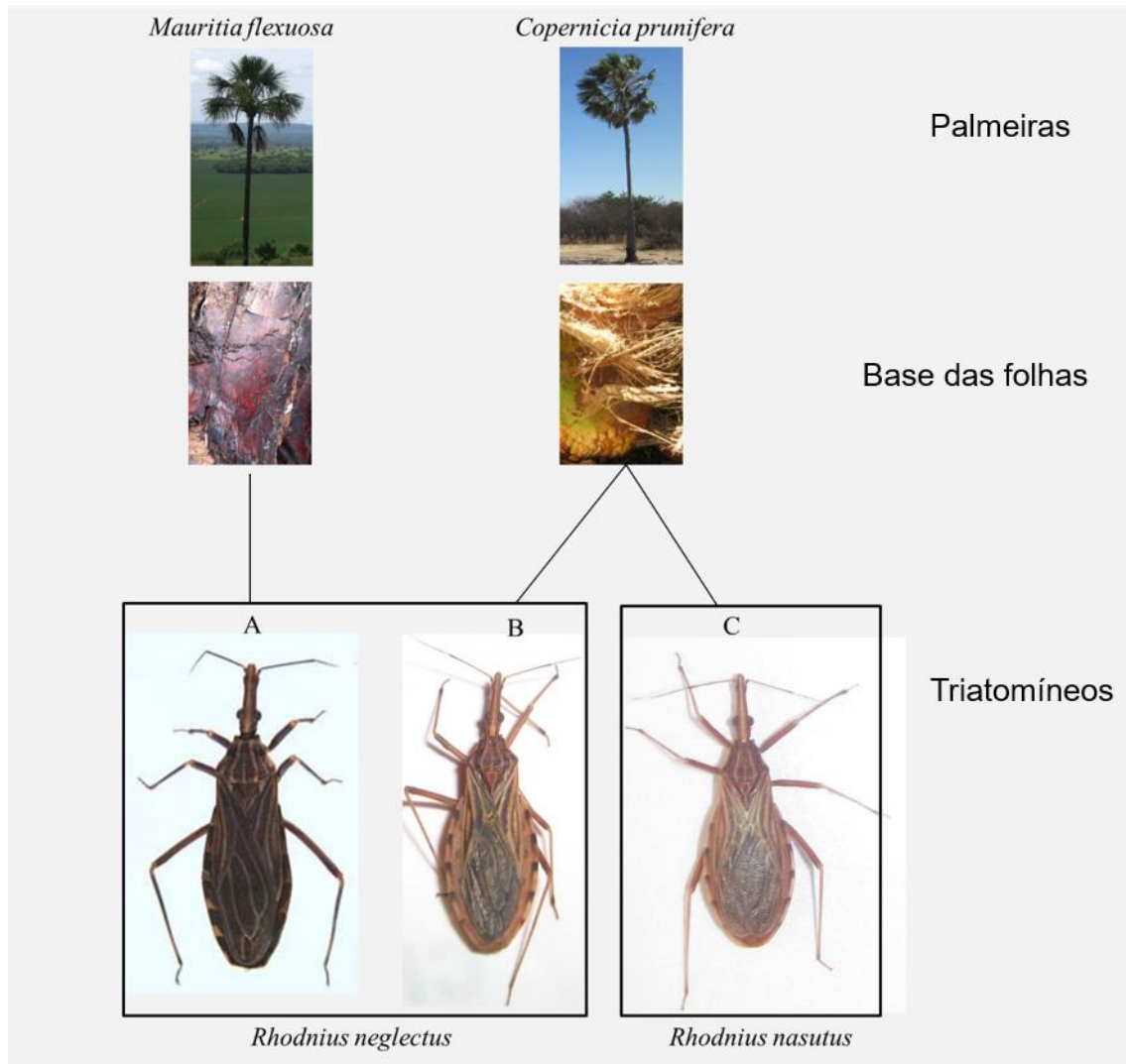
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM and Shipley PF (2004). MICRO-CHECKER: For identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4:535-538.
- Zane L; Bargelloni L; Patarnello T (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11: 1-16.
- Wiwegweaw A; Seki K; Utsuno H & Asami T (2009). Fitness consequences of reciprocally asymmetric hybridization between simultaneous hermaphrodites. *Zoological Science* 26: 191-196.

## 8. APÊNDICES

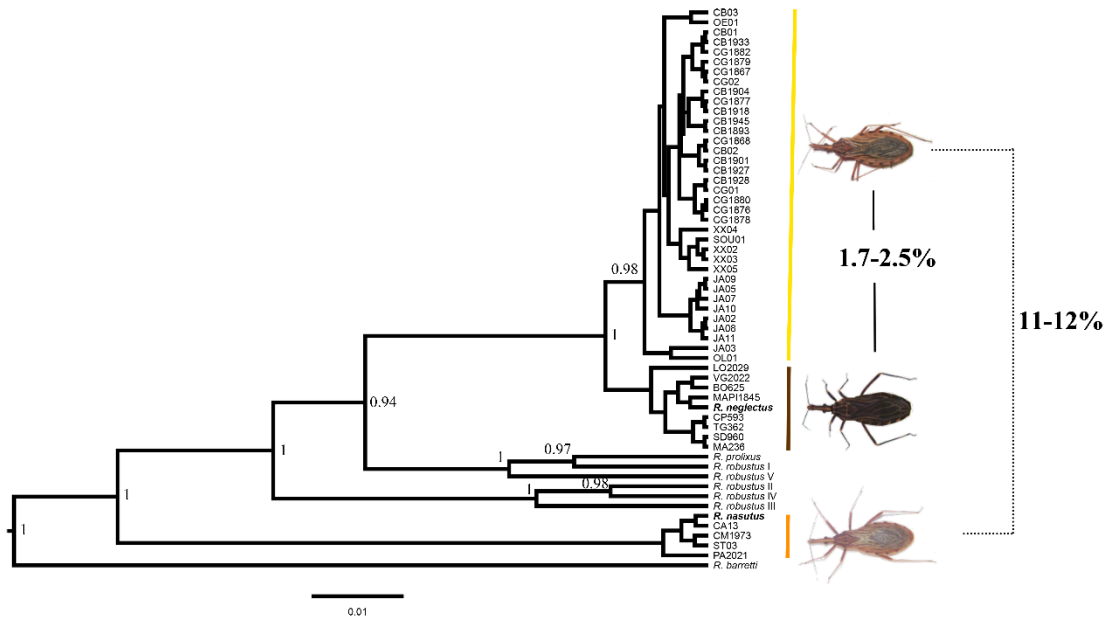
**Apêndice 1:** A) Variabilidade cromática em *R. nasutus* (modificado Dias *et al.* 2008).  
B) *R. neglectus*. (modificado de Dias *et al.* 2008)



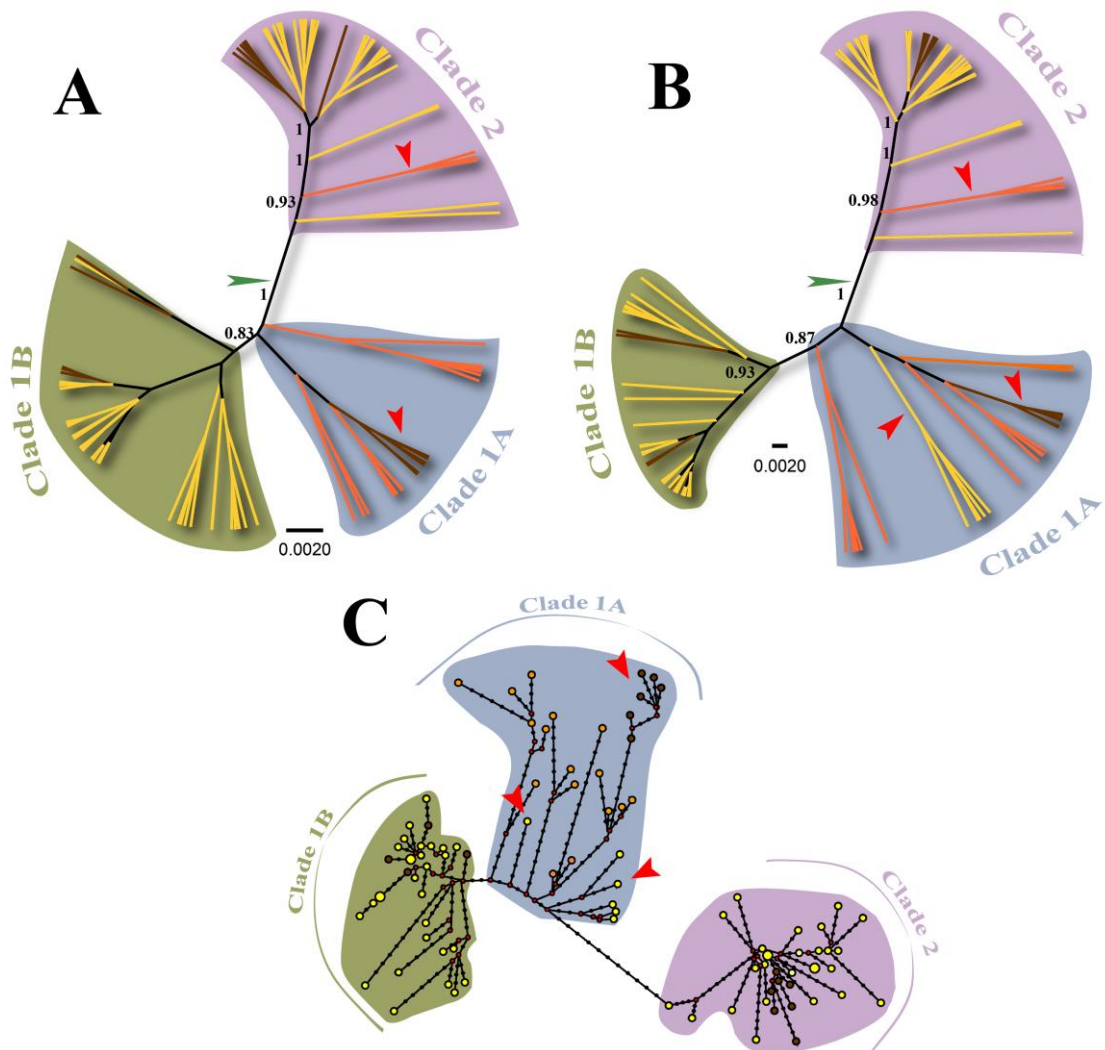
**Apêndice 2:** Variação fenotípica de *R. neglectus* proveniente de diferentes espécies de palmeiras e convergência cromática para o fenótipo típico de *R. nasutus* quando habitam a palmeira *Copernicia prunifera*. A: fenótipo escuro capturado em *Mauritia flexuosa*; B: fenótipo claro de *R. neglectus* capturado em *C. prunifera* que é similar a *R. nasutus* quando habitam a mesma espécie de palmeira; C: Fotos das palmeiras e base das folhas ilustrando a diferença de cor entre *M. flexuosa* e *C. prunifera* (Gurgel-Gonçalves *et al.*, dados não publicados).



**Apêndice 3:** Árvore de consenso bayesiana de 35 sequências de *Rhodnius* e porcentagem da divergência genética entre *R. neglectus*, *R. nasutus* e *Rhodnius* spp. Probabilidade *a posteriori* > 0,9 são mostradas nos nós da árvore. Somente as distancias entre *Rhodnius* spp. e *R. neglectus* (1,7 -2,6%), e *Rhodnius* spp. e *R. nasutus* (12%) são mostradas. Local de coleta e número de acesso no GenBank: *Rhodnius* spp. padrão claro KT317034-KT317068; *R. neglectus* - Tocantins, Brazil, JX273156; *R. prolixus* - Portuguesa, Venezuela, EF011723; *R. robustus* I - Trujillo, Venezuela, AF421340; *R. robustus* II - Napo, Ecuador, AF421341; *R. robustus* III - Pará (PA), Brazil, AF421342; *R. robustus* IV - PA, Brazil, AF421342; *R. robustus* V - Novo Airão, Amazonas (AM), Brazil, JX273158; *R. nasutus* - Ceará, Brazil, JX273155; *R. barretti* – Sucumbíos, Ecuador, JX273160 (Gurgel-Gonçalves *et al.*, dados não publicados).



**Apêndice 4:** Métodos com base em sequências de ITS-2 para identificação das espécies. A: Ribotipos de *R. neglectus* e *Rhodnius* spp. que foram agrupados com *R. nasutus* no Clado 1A foram sinalizados com setas vermelhas, do mesmo modo com as sequências de *R. nasutus* que foram agrupadas junto com *R. neglectus* no Clado 2. Árvore de consenso bayesiana de 97 ribotipos de *Rhodnius* spp., *R. neglectus* e *R. nasutus* resultado do alinhamento sem *indels*. B: e *indels* substituídos com uma única mutação. Árvores foram enraizadas no ponto do médio sinalizado com a seta verde. Cores dos ramos correspondem ao padrão cromático dos insetos (marrom – *Rhodnius* spp. fenótipo escuro e *R. neglectus*; amarelo – *Rhodnius* spp. fenótipo claro; laranja – *R. nasutus*); C: Rede genealógica haplotípica com base em 97 ribotipos. O tamanho dos círculos é proporcional a frequência de haplotipos. Números de acesso no GenBank: KT316937-KT317033 (Gurgel-Gonçalves *et al.* dados não publicados).



**Apêndice 5:** Características gerais dos 19 *loci* de microssatélites. Ta (°C) – temperatura de anelamento (em graus Celsius); F – fita senso; R – fita anti-senso; A – adenina; C – citosina; G – guanina; T – timina; N – qualquer um dos quatro nucleotídeos; pb – pares de base.

Locus	Iniciador	Repetição	Tamanhos Esperados* (pb)	Ta (°C)	Fluoróforo	Referência
L03	F: AAGGGAGAAAGGCCTGAG R: TCGTGACATCCTTTGTGTAAG	(CA) <sub>8</sub> N <sub>10</sub> (CA) <sub>2</sub>	88-113	58	6FAM	Harry <i>et al.</i> , 1998
L17	F: TTTTCTCCAGTTGGCGAGG R: CATCACGCGTGCTGTTCTG	(AG) <sub>25</sub>	98-170	58	6FAM	Harry <i>et al.</i> , 1998
L33	F: GATCGAGATGCCAGATGG R: TCTGTACCTCTCTAAACAGTTCATC	(AC) <sub>12</sub>	177-195	58	6FAM	Harry <i>et al.</i> , 1998
L43	F: ACAGTTGTACAGCGCGTC R: CATGTTCCGTCACGTAGGC	(GT) <sub>3</sub> N <sub>8</sub> (CT) <sub>2</sub> (GT) <sub>13</sub>	114-135	58	HEX	Harry <i>et al.</i> , 1998
R4	F: AAGTGGTTAAAAATGAAAATATTCC R: CCGGTAAGACGCAGAGTAC	(GT) <sub>2</sub> T <sub>2</sub> (GT) <sub>17</sub>	252-258	50	6FAM	Harry <i>et al.</i> , 2008b
R8	F: ATGGCAACTTTAATTTCAAGTATTC R: TCTGACGAAACGCCACTG	(GT) <sub>8</sub>	203-205	50	NED	Harry <i>et al.</i> , 2008b
R11	F: CTCGAAGCATCCAGCTTCTC R: CAATGACCACCTGGTCACG	(GA) <sub>15</sub>	222-230	48	PET	Harry <i>et al.</i> , 2008
R13	F: TACATCTTCAATAATCATCACACAC R: AAGTAAATTGAATGAATGCC	(AC) <sub>5</sub> GC(AC) <sub>1</sub>	190-192	48	6FAM	Harry <i>et al.</i> , 2008b
R17	F: TCCAATGTGTTAAAATGGCAGTTCTG R: ACGCGCTGGTTGCTCGG	(CT) <sub>3</sub> (CA) <sub>10</sub>	230-234	48	VIC	Harry <i>et al.</i> , 2008
R26	F: AGAAGGAATCTATCCACTTTTCGC R: CCTCGTATCAGCTGCTACG	(CA) <sub>3</sub> CT(CA) <sub>2</sub>	112-120	54	6FAM	Harry <i>et al.</i> , 2008b
R29	F: ATCAAAGCCAAACGCTGTTG R: GCAAATACCTGCGCTATTTTCTC	(GT) <sub>2</sub> GC(GT) <sub>8</sub>	183-199	54	PET	Harry <i>et al.</i> , 2008b
R30	F: GATCCAGGCAGTTTTCTTAAGTG R: CAATGGAACAAGAATTTAGTGAGG	(GT) <sub>8</sub>	218-220	54	VIC	Harry <i>et al.</i> , 2008b
R31	F: TGTGGTAAGTCCGTGTAGAAAGG R: TCTGTTGGTCCAGACACGG	(GT) <sub>11</sub>	129-133	52	6FAM	Harry <i>et al.</i> , 2008b
List14-010	F: AATGATGACTGTATTGATGGGC R: TTCGACCAACAACAACCTTCCC	(CA) <sub>9</sub>	311-339	52	6FAM	Fitzpatrick <i>et al.</i> , 2009
List14-013	F: CATACTACACGCACACAAGACC R: ATACTCGCATCAAGCCATTTGG	(AC) <sub>10</sub>	335-345	55	6FAM	Fitzpatrick <i>et al.</i> , 2009
List14-021	F: AACCTCTGAACACATCAAATGG R: AGCTACCTCTTGCCTCTACG	(TG) <sub>10</sub>	291-299	55	NED	Fitzpatrick <i>et al.</i> , 2009
List14-025	F: CCGCTCTATCAACTACTCC R: GATCCCTTATGTTTCTCAGC	(TC) <sub>9</sub> (AC) <sub>7</sub> N <sub>13</sub> (AC) <sub>7</sub>	163-181	50	6FAM	Fitzpatrick <i>et al.</i> , 2009
List14-037	F: GGCGACACCCCATAGAAACC R: ATTAAGAACGGAAACCCACC	(GT) <sub>8</sub>	231-253	55	NED	Fitzpatrick <i>et al.</i> , 2009
List14-064	F: AGAAAATGAGCAAAACGGCC R: ACAGGCAAACAACCTATGACG	(GT) <sub>10</sub>	237-247	57	6FAM	Fitzpatrick <i>et al.</i> , 2009

\* Faixa do tamanho dos alelos encontrados nas referências citadas.



**Apêndice 6:** Reações multiplex para a amplificação das regiões microssatélites. Completar o volume com 1ng de DNA e o restante com água Milli-Q.

List14-010/List14-064/L17			L03/L43		
Reagentes (concentração)	Quantidade (µL)	Concentração Final	Reagentes (concentração)	Quantidade (µL)	Concentração Final
Tampão 10x (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl)	3	1x (10mM Tris-HCl, 50 mM KCl)	Tampão 10x (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl)	2	1x (10mM Tris-HCl, 50 mM KCl)
dNTP (2,5mM)	1,92	0,16 mM	dNTP (2,5mM)	1,28	0,16 mM
Iniciador senso (10µM)	0,2/0,2/0,4	0,06/0,06/0,13 µM	Iniciador senso (10µM)	0,6/0,2	0,3/0,06 µM
Iniciador anti-senso (10µM)	0,2/0,2/0,4	0,06/0,06/0,13 µM	Iniciador anti-senso (10µM)	0,6/0,2	0,3/0,06 µM
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	0,9	1,5 mM	MgCl <sub>2</sub> (50mM)	0,6	1,5 mM
Taq polimerase (5U/µL)	0,6	3 U	Taq polimerase (5U/µL)	0,4	2 U
<b>Volume Total:</b>	<b>30</b>	-	<b>Volume Total:</b>	<b>20</b>	-
List14-013/R31			R11/R17		
Reagentes (concentração)	Quantidade (µL)	Concentração Final	Reagentes (concentração)	Quantidade (µL)	Concentração Final
Tampão 10x (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl)	2	1x (10mM Tris-HCl, 50 mM KCl)	Tampão 10x (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl)	2	1x (10mM Tris-HCl, 50 mM KCl)
dNTP (2,5mM)	1,28	0,16 mM	dNTP (2,5mM)	1,28	0,16 mM
Iniciador senso (10µM)	0,4/0,2	0,2/0,06 µM	Iniciador senso (10µM)	0,2/0,4	0,06/0,2 µM
Iniciador anti-senso (10µM)	0,4/0,2	0,2/0,06 µM	Iniciador anti-senso (10µM)	0,6/0,4	0,06/0,2 µM
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	0,6	1,5 mM	MgCl <sub>2</sub> (50mM)	0,6	1,5 mM
Taq polimerase (5U/µL)	0,4	2 U	Taq polimerase (5U/µL)	0,4	2 U
<b>Volume Total:</b>	<b>20</b>	-	<b>Volume Total:</b>	<b>20</b>	-
List 14-025/R26			R30		
Reagentes (concentração)	Quantidade (µL)	Concentração Final	Reagentes (concentração)	Quantidade (µL)	Concentração Final
Tampão 10x (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl)	2	1x (10mM Tris-HCl, 50 mM KCl)	Tampão 10x (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl)	1	1x (10mM Tris-HCl, 50 mM KCl)
dNTP (2,5mM)	1,28	0,16 mM	dNTP (2,5mM)	0,64	0,16 mM
Iniciador senso (10µM)	0,2/0,2	0,06/0,06 µM	Iniciador senso (10µM)	0,2	0,2 µM
Iniciador anti-senso (10µM)	0,2/0,2	0,06/0,06 µM	Iniciador anti-senso (10µM)	0,2	0,2 µM
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	0,6	1,5 mM	MgCl <sub>2</sub> (50mM)	0,3	1,5 mM
Taq polimerase (5U/µL)	0,4	2 U	Taq polimerase (5U/µL)	0,2	1 U
<b>Volume Total:</b>	<b>20</b>	-	<b>Volume Total:</b>	<b>10</b>	-

**Apêndice 7:** Características gerais dos 12 *loci* padronizados. Ta<sup>0</sup> – temperatura de anelamento, em graus Celsius; F – fita senso; R – fita anti-senso; A – adenina; C – citosina; G – guanina; T – timina; N – qualquer um dos quatro nucleotídeos.

<i>Locus</i>	Iniciador	Repetição	Tamanhos Esperados (pb)	Tamanhos obtidos (pb)	Ta (°C)	Fluoróforo	Referência
L03	F: AAGGGAGAAAGGCCTGAG R: TCGTGACATCCTTTGTGTAAG	(CA) <sub>8</sub> N <sub>10</sub> (CA) <sub>2</sub>	88-113	83-117	56	6FAM	Harry <i>et al.</i> , 1998
L17	F: TTTTCTCCAGTTGGCGAGG R: CATCACGCGTGCTGTTCTG	(AG) <sub>25</sub>	98-170	77-95	54	6FAM	Harry <i>et al.</i> , 1998
L43	F: ACAGGTTGTACAGCGCGTC R: CATGTTCCGTCACGTAGGC	(GT) <sub>3</sub> N <sub>8</sub> (CT) <sub>2</sub> (GT) <sub>13</sub>	114-135	136-156	56	HEX	Harry <i>et al.</i> , 1998
R11	F: CTCCAAGCATCCAGCTTCTC R: CAATGACCACCTGGTCACG	(GA) <sub>15</sub>	222-230	222-224	49	PET	Harry <i>et al.</i> , 2008
R17	F: TCCAATGTGTTAAAATGGCAGTTCTG R: ACGCGCTGGTTGCTCGG	(CT) <sub>3</sub> (CA) <sub>10</sub>	230-234	85-265	49	VIC	Harry <i>et al.</i> , 2008
R26	F: AGAAGGAATCTATCCACTTTTCGC R: CCTCGCTATCAGCTGCTACG	(CA) <sub>3</sub> CT(CA) <sub>2</sub>	112-120	112-124	52	6FAM	Harry <i>et al.</i> , 2008
R30	F: GATCCAGGCAGTTTTCTTAAGTG R: CAATGGAACAAGAATTTAGTGAGG	(GT) <sub>8</sub>	218-220	200-222	54	VIC	Harry <i>et al.</i> , 2008
R31	F: TGTGGTAAGTCCTGTGTAGAAGG R: TCTGTTGGTCCAGACACGG	(GT) <sub>11</sub>	129-133	126-130	52	6FAM	Harry <i>et al.</i> , 2008
List 14 – 010	F: AATGATGACTGTATTGATGGGC R: TTCGACCAACAACAACCTTCCC	(CA) <sub>9</sub>	311-339	307-309	54	6FAM	Fitzpatrick <i>et al.</i> , 2009
List 14 - 013	F: CATACTACACGCACACAAGACC R: ATACTCGCATCAAGCCATTTGG	(AC) <sub>10</sub>	335-345	332-346	52	6FAM	Fitzpatrick <i>et al.</i> , 2009
List 14 - 025	F: CCGCTCTATCAACTACTCC R: GATCCCTTATGTTTCTCAGC	(TC) <sub>9</sub> (AC) <sub>7</sub> N <sub>13</sub> (AC) <sub>7</sub>	163-181	125-169	52	6FAM	Fitzpatrick <i>et al.</i> , 2009
List 14 - 064	F: AGAAAATGAGCAAAACGGCC R: ACAGGCAAACAACCTATGACG	(GT) <sub>10</sub>	237-247	240-280	54	6FAM	Fitzpatrick <i>et al.</i> , 2009

**Apêndice 8:** Frequência alélica encontrada em cada uma das localidades amostradas para os oito *loci* de microssatélites analisados. Em vermelho pode-se notar os alelos privados para cada *locus* genotipado.

<i>Locus</i>	Alelos	Localidades													
		PA	PK	NS	NX	DI	MO	RA	IT	BL	IB	MA	IBO	XX	CB
List14064	236	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	240	0,00	0,18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,36	0,40	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00
	242	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	0,00	0,00	0,00
	244	0,00	0,07	0,35	0,00	0,16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00
	246	0,19	0,33	0,00	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00
	248	0,13	0,23	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,64
	250	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,27
	252	0,37	0,05	0,65	0,73	0,65	0,66	0,96	0,64	0,60	0,53	0,53	0,08	0,69	0,09
	254	0,08	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	256	0,00	0,05	0,00	0,06	0,00	0,20	0,00	0,00	0,00	0,41	0,10	0,00	0,23	0,00
	258	0,06	0,00	0,00	0,06	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	0,66	0,00	0,00
	260	0,02	0,02	0,00	0,03	0,00	0,07	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00	0,20	0,02	0,00
	262	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	0,00	0,02	0,00
	264	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,02	0,00
266	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
268	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
L03	101	0,00	0,00	0,00	0,00	0,09	0,00	0,22	0,19	0,00	0,17	0,00	0,00	0,00	0,00
	103	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,15	0,00	0,00	0,00	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00
	111	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	113	0,07	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	83	0,18	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	85	0,07	0,00	0,47	0,25	0,56	0,35	0,78	0,08	0,16	0,17	0,00	0,23	0,00	0,00
	87	0,07	0,00	0,38	0,63	0,18	0,47	0,00	0,57	0,70	0,41	0,77	0,27	0,00	0,00
	89	0,00	0,00	0,00	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	0,00	0,23	0,00	0,00	0,00
	91	0,26	0,00	0,00	0,00	0,04	0,03	0,00	0,00	0,07	0,00	0,00	0,00	0,09	0,62
	93	0,28	0,91	0,06	0,00	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,35	0,82	0,27
95	0,00	0,00	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,09	0,11	
97	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,11	0,00	0,00	
List14025	133	0,00	0,42	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	135	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	139	0,75	0,48	0,05	0,10	0,04	0,10	0,00	0,05	0,30	0,39	0,60	0,47	0,55	1,00
	153	0,25	0,00	0,95	0,90	0,96	0,90	1,00	0,95	0,70	0,61	0,40	0,33	0,45	0,00
List14013	332	0,13	0,07	0,28	0,23	0,28	0,00	0,00	0,28	0,34	0,00	0,00	0,00	0,03	0,11
	334	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	336	0,67	0,61	0,21	0,62	0,58	0,78	0,40	0,44	0,08	0,83	0,85	0,12	0,34	0,00
	338	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,40	0,00	0,08	0,00	0,00	0,12	0,00	0,00
	340	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00	0,14	0,00	0,28	0,17	0,17	0,15	0,00	0,63	0,89
	342	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,66	0,00	0,00
	344	0,05	0,16	0,44	0,05	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	346	0,00	0,16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
List14010	307	0,15	0,18	0,12	0,06	0,17	0,50	0,98	0,17	0,33	0,92	0,17	0,64	0,05	1,00
	309	0,85	0,82	0,88	0,94	0,83	0,50	0,02	0,83	0,67	0,08	0,83	0,36	0,95	0,00
L43	136	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,22	0,00
	138	0,03	0,24	0,02	0,00	0,00	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,22	0,00	0,00	0,00
	140	0,06	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,11	0,00	0,00	0,00
	142	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,88
	144	0,33	0,20	0,74	0,75	0,64	0,60	1,00	0,62	1,00	0,82	0,47	0,40	0,00	0,12
	150	0,08	0,00	0,22	0,25	0,36	0,12	0,00	0,38	0,00	0,18	0,11	0,00	0,00	0,00
	152	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	154	0,50	0,30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
156	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,60	0,78	0,00	
R26	114	0,00	0,00	0,44	0,50	0,57	0,04	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00
	116	0,32	0,26	0,56	0,50	0,43	0,76	1,00	0,90	1,00	1,00	0,50	0,96	0,33	0,12
	118	0,34	0,32	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,67	0,44
	120	0,34	0,42	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	0,00	0,00	0,44
	124	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00
R30	200	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,33	0,00	0,00	0,00
	218	0,50	0,58	0,88	0,93	0,91	1,00	0,93	0,50	0,33	1,00	0,00	0,34	0,36	0,20
	220	0,50	0,42	0,12	0,07	0,09	0,00	0,07	0,10	0,67	0,00	0,00	0,33	0,64	0,80

**Apêndice 9:** *Loci* microssatélites que apresentaram evidência de alelos nulos em cada população amostrada.

<b>Locus</b>	<b>População 1</b>	<b>População 2</b>	<b>População 3</b>	<b>População 4</b>
<b>List14064</b>	x			
<b>L03</b>				
<b>List14025</b>		x		
<b>List14013</b>	x		x	
<b>List14010</b>		x		x
<b>L43</b>				
<b>R26</b>	x			
<b>R30</b>				x

**Apêndice 10:** *Loci* microssatélites com índice de desequilíbrio de ligação na comparação realizada entre os oito *loci* ( $P \leq 0,01$ ) para cada população.

População 1	<i>Loci</i> em desequilíbrio de ligação		População 3	<i>Loci</i> em desequilíbrio de ligação	
PA/PK/CB	List14-064/L03	List14-025/List14-013	NS/NX/DI	List14-064/L03	
	List14-064/List14-025	List14-025/List14-010		List14-064/List14-025	
	List14-064/List14-013	List14-025/L43		List14-064/List14-010	
	List14-064/List14-010	List14-013/List14-10		List14-064/R26	
	List14-064/L43	List14-013/L43		List14-064/R30	
	List14-064/R26	List14-013/R30		L03/R26	
	List14-064/R30	List14-10/L43		List14-025/R26	
	L03/List14-025	List14-10/R26		List14-013/L43	
	L03/List14-013	List14-10/R30		List14-013/R26	
L03/R30	L43/R30	List14-10/R26			
População 2	<i>Loci</i> em desequilíbrio de ligação		População 4	<i>Loci</i> em desequilíbrio de ligação	
XX/IBO	List14-064/L03	List14-025/List14-010	MO/IT/RA/IB	List14-064/L03	List14-025/List14-013
	List14-064/List14-013	List14-025/R30		List14-064/List14-025	List14-025/List14-010
	List14-064/List14-010	List14-013/List14-10		List14-064/List14-013	List14-025/R30
	List14-064/R26	List14-013/R26		List14-064/List14-010	List14-013/List14-10
	List14-064/R30	List14-013/R30		List14-064/L43	List14-013/L43
	L03/List14-013	List14-10/L43		L03/List14-013	List14-013/R30
	L03/List14-010	List14-10/R26		L03/List14-010	List14-10/R30
	L03/R26	List14-10/R30		L03/L43	L43/R26
	L03/R30	L43/R26		L03/R30	L43/R30
	R26/R30				