



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

Sistemática de *Triatoma dimidiata*
(Hemiptera: Reduviidae) en Mesoamérica
por medio de ITS2 (rDNA) y ND4
(mtDNA)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(SISTEMÁTICA)

P R E S E N T A:

PATRICIA LANDAVERDE GONZÁLEZ

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Daniel Ignacio Piñero Dalmau

MÉXICO D.F

JUNIO, 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatoria:

A mi madre **Gregoria González**, que ha sido un ejemplo de lucha e independencia, de buscar el éxito a base de esfuerzo y trabajo, sin miedo y especialmente sin pasar sobre los demás. Por tener la suerte de que hayas sido mi madre.

A mi hermano **Juan Luis Landaverde González**, con quien comparto no solo la mitad de mi información genética sino los mismos gustos por todo y toda una vida, (mi casi gemelo) y que a pesar de ser el pequeño me ha dado soporte y valor. Con quien he compartido tantos secretos y tanto de la vida.

A mi hermanito **Robín Emilio Landaverde González** por ser el regalo que nos devolvió la alegría.

A mi hermosa Mesoamérica...

Tan llena de tanta diversidad biológica y cultural, pero también llena de tantos problemas sociales y de salud. Por toda esa gente maravillosa, de sangre cálida que he conocido a lo largo de estos años de trabajo con Chagas. Porque la pobreza y la ignorancia no sea una plaga que no nos permita crecer. Por esa nueva raza latina con la que soñaba José de Vasconcelos.

Para ellos y con la esperanza de que tenga alguna utilidad este trabajo.

Agradecimientos:

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional Autónoma de México – UNAM-

A la Dirección General de Estudios de Posgrado –DGEP- de la UNAM por la beca proporcionada durante el ciclo del 2008-1 a 2009-1.

Al laboratorio de Genética y Evolución del Departamento de Ecología Evolutiva por el apoyo económico proporcionado para la elaboración de la tesis.

A mis miembros del comité tutorial:

- ✓ Daniel Piñero por darme la oportunidad de ser parte de su laboratorio, permitirme aprender de ellos, apoyarme económicamente y orientarme académicamente con tanta libertad y sus buenos consejos.
- ✓ Paz María Salazar Schettino, por admitirme en su equipo, por los contactos, por el conocimiento compartido y por su apoyo.
- ✓ Juan José Morrone, por su camarería, por ser tan estricto en las correcciones, por su apoyo constante, por el conocimiento compartido.

A Juan Núñez por confiar en mí, apoyarme para poder desarrollar mi posgrado, por su amistad y sus consejos.

A Helga Ochoterena, por enseñarme con su humildad a gustar de la sistemática y permitirme conocer un poco de su sabiduría y del mundo de la sistemática.

A Bertha Espinoza, por escucharme, por sus consejos, por sus correcciones y apertura en la ciencia.

A Carlota Monroy por orientarme desde hace muchos años en el maravilloso mundo de la ciencia y enseñarme con su ejemplo, que con un duro trabajo se logra la diferencia y se puede construir una Mesoamérica mejor.

Patricia Martínez, Secretaria de Ecología posgrado, por siempre estar disponible para resolver todos mis problemas, siempre con un gesto muy amable.

Lilia Espinosa, por toda su orientación, por creer en mí también y su apoyo académico

Lilia Jiménez, por su amistad, los grandes consejos y apoyo académico.

A la Secretaria salud Cozumel: Al Biólogo Efrén Torres por su apoyo incondicional en el campo. Al técnico Hugo Alberto Pérez Rozas por su apoyo en el campo. A José Luis Meneses por su apoyo logístico

A la secretaria de salud de Cancún: Al Dr. Jaime Salomon por todo su apoyo logístico y compartir la ilusión de colecta de triatominos. Gerardo Ventura Lugo Moguel, por su curiosidad por aprender, su apoyo incondicional y su amistad. Manuel León Buenfil y Eiter Pascual Uchi por su apoyo en la búsqueda de triatominos.

Flor Lara por el apoyo económico brindado para la colecta en Cozumel.

Personal de colecta de los diferentes países que forman parte del estudio.

A mis compañeros del Laboratorio de Genética y Evolución: Ale Moreno (mi gran amiga a quien quiero mucho por su apoyo y su inocencia y gran inteligencia) Lev Jardon (con quien he compartido más de una manera de luchar por la justicia social) Mónica Amendola (por su linda amistad y orientación), Ariadna (por compartir tantas vivencias y aprender juntas), Alicia (por

su amor a la literatura), Ale Vásquez (por ser un faro de conocimiento que siempre nos auxilia y orienta), Mariana (con quien he compartido muchas horas de plática y trabajo) Ale Ortiz, Rodolfo Salas, Miroslava, Bianca, Nadia, Ana W., Brian, Diego, Valeria, Bertha, Tania, Adan, Gaby, Joost, Gretel y Marlyn por regalarme un trozo de alegría cubana, a todos con los cuales he compartido de una manera u otra conocimientos o vivencias que aun con un sabor amargo o dulce me han enseñado mucho.

A todos los miembros del Laboratorio de Investigación en Entomología Aplicada y Parasitología-LENAP-, Escuela de Biología, Facultad de ciencias Químicas y Farmacia, USAC por crecer junto a mí y especialmente por siempre estar para todo lo que he necesitado, por las muestras y colectas juntos, en especial a Anto, Majo (mi gran amiga), Nela, Eli, Mahua, Roberto, Gaby Armas, Gaby Rodriguez, Sharon, Ligia, Mafer, Eunice, (por esa gran energía y por demostrar que nada es imposible), Claudia y Sergio.

A Mauro Omar Vences por su apoyo académico y profesional constante y principalmente por su gran amistad y compartir conmigo los momentos más significativos de su vida.

Al laboratorio de Laboratorio de Biología de Parásitos. Facultad de medicina. Universidad Nacional Autónoma de México, por su amistad y orientarme en el mundo del Chagas, en especial a Glori, Margarita, Santiago y todos los demás miembros de ese equipo.

A mis grandes amigos que me han ayudado, orientado y compartido conocimientos, lagrimas y risas; Jesús Ballesteros y Belem (quienes me han brindado una gran amistad), Eirá (que me ha dado mucho apoyo y comprensión de amiga), Irene, Ruth, María Clara, Laura Lorena, Rafa (por ser mi primer buen amigo al llegar a México), Memo, Bukles, Lilibeth, Lilia Roa, Iván, Jessica, los chicos arcnólogos; Alejandro, Héctor y Carlos, Arturo, Marco, Las Tánias, Oris por compartir la aventura de ser extranjeras en el posgrado de ciencias biológicas.

A Sindy y Kelly por ser mis maestras de tolerancia y convivencia en nuestro apartamentito en División del Norte.

A Armando López, por protegerme, por siempre estar para mí, por soportarme en mis peores momentos o con mi peor carácter, por todos esos momentos, dulces y amargos llenos de amor y desamor pero con mucha pasión por la vida y la esencia de la mente. Porque a pesar de todos los reclamos que nos tenemos mutuamente, se que de igual forma nos hemos ayudado a crecer.

A mis grandes amigos de la Sangha, de quienes he aprendido mucho del camino de la mente... Eduardo (por todo su conocimiento y disciplina), Alexis (por su gran amistad, escucharme siempre, sus buenos consejos llenos de luz y su orientación), A Samuel (por su apoyo y recordarme que no debo estresarme pues soy budista, su gran amistad y sus bromas), Lety, Diana, Luis, Lucio, Paco, Leslie, Michelle y todos los demás miembros de la Sangha de los cuales he aprendido mucho sobre lo realmente importante en la vida.

1. CONTENIDO

1. CONTENIDO	5
2. RESUMEN.....	8
3. INTRODUCCIÓN	11
4. ANTECEDENTES.....	13
4.1. Planteamiento del Problema.....	13
4.2. Concepto de Especie.	14
4.2.1. Los conceptos nominales de especie.....	14
4.2.2. Conceptos Realistas.....	15
4.2.3. Concepto de Especie propuesto.....	15
4.3. Información General sobre Subfamilia Triatominae.....	16
4.4. <i>Triatoma dimidiata</i>	17
4.4.1. Características Morfológicas:.....	17
4.4.2. Biología.....	18
4.4.3. Ecotopos	18
4.5. Distribución de <i>T. dimidiata</i>	19
4.6. Condición epidemiológica de <i>T. dimidiata</i> en México y Centroamérica.....	19
4.7. Uso de marcadores moleculares para el estudio de sistemática	21
4.7.1. ADN ribosomal	21
4.7.2. ADN Mitocondrial (Nicotina Deshidrogenasa Subunidad4 -ND4-).....	22
5. JUSTIFICACIÓN	23
6. OBJETIVOS	24
6.1. Objetivo General	24
6.2. Objetivos Específicos.....	24
7. HIPÓTESIS.....	24
8. MATERIALES Y MÉTODOS	25
8.1. Materiales.....	25
8.1.1. Universo de Trabajo.....	25
8.2. Procedimiento	28
8.2.1. Colecta de Material Biológico.....	28
8.2.2. Extracción de ADN	29
8.2.3. Amplificación por PCR.....	29
8.2.4. Amplificación.....	29
8.2.5. Secuenciación de ADN	30

8.3. Análisis de Datos.....	30
8.3.1. Alineación ITS2	30
8.3.2. Alineación ND4	32
8.3.3. Estadísticos de las matrices	32
8.3.3.1. Test de neutralidad	32
8.3.3.2. Sitios segregantes	33
8.3.3.3. Recombinación.....	33
8.3.4. Análisis Filogenéticos	33
9. RESULTADOS	35
9.1. Composición nucleotídica y longitud de secuencias	35
9.1.1. ITS2.....	35
9.1.2. ND4.....	35
9.2. Estadísticos de las matrices	36
9.2.1. Test de neutralidad	36
9.2.2. Seudogenes.....	36
9.2.3. Sitios segregantes	37
9.2.4. Recombinación.....	38
9.2.5. Copias múltiples de genes	38
9.3. Inferencia Filogenéticas	39
9.3.1. Inferencia Filogenética con ITS2	40
9.3.2. Inferencia filogenéticas ND4	42
9.3.3. Inferencia con Evidencia Combinada.....	44
9.4. Posibles híbridos.	45
9.5. Inferencias filogenéticas y Definición de Especie	46
9.6. Correlación de asociación de taxa en un mapa de unidades morfoestructurales	46
9.7. Comparación de Estudios de Poblaciones de <i>T. dimidiata</i>	48
10. DISCUSIÓN	50
10.1. Composición nucleotídica	50
10.1.1. ITS2.....	50
10.1.2. ND4.....	50
10.2. Inferencia filogenética.....	51
10.2.1. Topologías obtenidas con ITS2.....	51
10.2.2. Topologías obtenidas con ND4.....	54
10.2.3. Topologías obtenidas con Evidencia Combinada	56

10.3.	Híbridos.....	57
10.4.	Inferencias filogenéticas y Definición de Especie	58
10.5.	Estadísticos de la matrices.....	59
10.5.1.	Efecto de selección.....	59
10.5.2.	Seudogenes.....	60
10.5.3.	Sitios segregantes	60
10.5.4.	Recombinación.....	61
10.5.5.	Copias múltiples de genes que no han completado su evolución concertada	61
10.6.	Correlación de asociación de taxa en un mapa de unidades morfoestructurales	62
11.	CONCLUSIONES	64
12.	RECOMENDACIONES	66
13.	BIBLIOGRAFÍA.....	67
14.	ANEXOS.....	75
14.1.	Recetas para elaboración de MMx para cada cebador.	75
14.2.	Distribución de <i>Triatoma dimidiata</i>	75
14.3.	Distribución de las muestras en el estudio	76
14.4.	Tabla de Secuencias del Genbank.....	77
14.5.	Evidencia de Evolución paralela en el código genético	78
14.6.	Alineamiento secuencias de ITS2.	79
14.7.	Estructura secundaria de ITS2 de taxa de triatominos	83

2. RESUMEN

El complejo de especie de *Triatoma dimidiata* es un grupo de importancia epidemiológica debido a la distribución de los miembros de dicho complejo y a su relación con la transmisión del parásito *Trypanosoma cruzi* causante de la enfermedad de Chagas. Muchos estudios se han realizado sobre la dinámica ecológica y relaciones filogenéticas de *T. dimidiata* con relación a los demás miembros de la subfamilia Triatominae. No obstante, la información obtenida ha sido parcial, debido a muestreos pobres o a la utilización de herramientas no adecuadas.

En el presente estudio se utilizaron dos marcadores para el estudio de las relaciones filogenéticas del complejo de especies de *T. dimidiata*. Estos marcadores consistieron en uno nuclear del ADN ribosomal (Espaciadores Intergénicos Transcritos del ADN ribosomal 2; ITS2) y uno mitocondrial (Nicotina deshidrogenasa subunidad 4; ND4) pretendiendo de esta manera tener herramientas más completas para el estudio de la sistemática del complejo. Se observó que el marcador nuclear de ITS2 es eficiente en la recuperación de la filogenia de grupos más lejanos o con más tiempo de divergencia como lo son las relaciones entre especies de diferentes complejos. Sin embargo, al ser utilizado para grupos de especies hermanas o dentro del complejo de *T. dimidiata* el marcador mostró poseer variación intragenómica lo cual puede complicar la interpretación de las filogenias obtenidas. Incluso se llegó a observar, ciertos individuos de dicho complejo en posiciones que no son las esperadas, sugiriendo que pueden ser relaciones paralogas o posibles híbridos.

Por otro lado el ND4 parece ser un buen marcador para estudiar diferenciación a nivel de especies hermanas o dentro del complejo de *T. dimidiata*. Los datos no revelaron la existencia de saturación, ni se observan indicios que indiquen la presencia de pseudogenes de ADN mitocondrial. La existencia de recombinación en el ADN mitocondrial ya reportado para otras especies de artrópodos, pero principalmente en humanos, podría estar sugiriendo la existencia de hibridación; sin embargo, otros estudios son necesarios para determinar su causa.

La unión de la información de ambos marcadores parece proporcionar una mejor resolución de la filogenia de dicho grupo y concilia la diferencia de información proporcionada por ambos marcadores moleculares. De manera general se observa la separación del complejo en cuatro grupos, uno principalmente formado por poblaciones de la península de Yucatán (poblaciones del norte de Guatemala y el sureste de México: península de Yucatán específicamente) que puede ser considerado como una especie diferente, incluso dentro del género *Meccus*; otro conformado por poblaciones del resto de México y *T. hegneri* de Cozumel que se mantiene unido a un tercer grupo conformado por los grupos de Lanquín y Quiche y un

cuarto conformado por las que podrían considerarse como *T. dimidiata* del resto de Centroamérica.

Sin embargo la observación en campo de *T. hegneri* conviviendo en el mismo nicho sin competencia con *T. dimidiata* y su poca diferenciación genética incluso menor que la observada para el grupo de la península de Yucatán sugiere que la identidad taxonómica de ésta debe ser revisada. Así mismo, se recomienda la realización de un muestreo más detallado de la península de Yucatán para resolver esta nueva pregunta sobre la filogenia de *T. hegneri* que directamente afecta las interpretaciones que sobre *T. dimidiata* se puedan realizar.

También se recomienda la utilización de otros marcadores moleculares, así como de otros marcadores morfológicos y el estudio de la evolución del código genético paralelo y la recombinación observados para el ADN mitocondrial para poder dar una respuesta más clara y definitiva sobre las relaciones filogenéticas del complejo de *T. dimidiata*. De esta forma el presente estudio manifiesta nuevos indicios de la complejidad de identidad taxonómica del complejo de especie de *T. dimidiata* a lo largo de toda su distribución. Se espera que la resolución de dicha complejidad sea de utilidad para la definición de estrategias más eficientes para el control del vector y por lo tanto de la enfermedad de Chagas, por lo cual se espera que las recomendaciones surgidas a partir del presente trabajo sean tomadas en consideración.

The specific *Triatoma dimidiata* complex is a group of epidemiological importance due to the distribution of the members of the mentioned complex and his relation with the transmission of the causative parasite of Chagas disease *Trypanosoma cruzi*. Many studies have focused on *T. dimidiata* ecological dynamics and phylogenetics relations with the other members of the Triatominae subfamily. Nevertheless, the answers have been partial, due to poor samplings or to the utilization of not adequate tools.

In the present study two molecular markers were used for the study of the phylogenetics relations of the species complex of *T. dimidiata*. These molecular markers consisted of one nuclear of the ribosomal DNA (ITS2) and one mitochondrial (ND4) trying to obtain better tools for the study of the complex systematic. It is observed that ITS2 nuclear marker is efficient in the recovery of the phylogeny of most distant groups or with more diversification time, like the relations between species of different complexes. However when it was used for groups of sister species or within *T. dimidiata* complex it shows intragenomic variation which can complicate the phylogenetic interpretation obtained, even with the observation of certain individuals that shows position not expected for them, suggesting paralogy relationship or possible hybrid.

On the other hand, ND4 seems to be a good marker to study differentiation to level of sister species or within the *T. dimidiata* complex. The data did not reveal the existence of saturation, nor are observed indications that should indicate the presence of pseudogenes in mitochondrial DNA. The existence of recombination in the mitochondrial DNA already reported for other species of arthropods, but principally in human, might be suggesting the existence of hybridization nevertheless other studies are necessary to determine his cause. The joining of both markers information seems to provide a better resolution of the above mentioned group phylogenies and reconciles the different information provided by both molecular markers. In a general way the separation of the complex is observed in four groups; one principally formed by populations of the Yucatán peninsula (populations of the north of Guatemala and the south-east of México), that could be considered like a different species, even inside the Meccus genus; other one shaped by populations of the rest of México and *T. hegneri* of Cozumel that is still joined to a third group of Lanquín and Quiché, Guatemala, and the four one shaped by those who might be considered to be the real ones *T. dimidiata* of the rest of Central America.

Nevertheless the observation in field of *T. hegneri* coexisting in the same niche without competition with *T. dimidiata* and his little genetic differentiation even minor that the observed for the group of the Yucatán peninsula suggests that the taxonomic identity of this one must be revised. Likewise it is recommends the accomplishment of a most detailed sampling of the Yucatán peninsula to solve this new question on the phylogeny of *T. hegneri* that directly influenced the interpretations that on *T. dimidiata* could be realized.

Also, is recommended the utilization of other molecular markers, as well as other morphologic markers. The study of the evolution of the genetic parallel code and the recombination observed for the mitochondrial DNA could be able to give a clearer and definitive response on the phylogenetic relations of the *T. dimidiata* complex. In this form the present study shows new indications of the complexity of taxonomic identity of *T. dimidiata* along all his distribution. It hopes that the resolution of the above mentioned complexity is of utility for the definition of most efficient vector control strategies and therefore of Chagas's disease for which it hopes that the recommendations arisen from the present work could be taken in consideration.

3. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es considerada la cuarta causa de mortalidad por enfermedades infecciosas en América Latina, que provoca 43000 muertes por año (Ayau 1998, Guhl 1999) y ha demostrado tener un gran impacto médico, social y económico a nivel latinoamericano (Schofield 2000). En Centroamérica, la seroprevalencia de infección estimada para El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua es de 7.0%, (Guhl 1999) lo cual representa aproximadamente dos millones de personas infectadas. Éste es un número elevado si se considera que representa únicamente cuatro países de toda Latinoamérica (Guhl 1999). La enfermedad se encuentra asociada con la pobreza y las malas condiciones de vivienda, que proporcionan el ambiente favorable para que el vector, un insecto triatomino, habite entre las grietas, el polvo, hojas de palmeras y las piedras que conforman las casas en el área rural.

En América, el género del triatomino más importante transmisor del parásito *Trypanosoma cruzi* que ocasiona la enfermedad de Chagas es *Triatoma*. Siendo *Triatoma dimidiata* la especie más importante por su distribución en Mesoamérica (Lent y Wygodzinsky 1979, Zeledón 1981, Schofield 2002). Actualmente se desarrollan programas de control de los vectores en los diversos países mesoamericanos donde suele encontrarse. Sin embargo, *T. dimidiata* ha presentado ciertos problemas para su erradicación, ya que unos meses después de efectuado el rociamiento ésta vuelve a aparecer en las casas (Nakagawa et al. 2003a, Nakagawa et al. 2003b).

Con el fin de comprender su dinámica poblacional y la fuente de reinfestación en las viviendas, se han elaborado diversas investigaciones de su estructura poblacional en Mesoamérica. Aunque estas investigaciones han dado respuesta a muchas de las preguntas surgidas acerca de la estructuración poblacional de *T. dimidiata*, también han dado origen a otras inquietudes, especialmente en lo referente a la ubicación taxonómica dentro de la agrupación conocida como *T. dimidiata*, a la cual se ha llegado a reconocer como un complejo de especies en posible proceso de especiación (Bustamante et al. 2004, Calderón et al. 2004, Landaverde 2004, Menes 2004).

Se han utilizado diferentes marcadores moleculares para el estudio de la estructura poblacional de los vectores de la enfermedad de Chagas. En el caso de *T. dimidiata*, se han realizado algunos estudios filogenéticos, sin embargo, éstos han sido pocos y no se han utilizado poblaciones silvestres de *T. dimidiata*, las cuales, a causa de su hábitat y por razones epidemiológicas y filogenéticas pueden brindar importante información que nos ayude a comprender la estructuración poblacional de esta especie y de especies relacionadas. Los Espaciadores Intergénicos Transcritos del ADN ribosomal –ITS- han demostrado ser una herramienta útil para el estudio de sistemática y

filogenia en diversos organismos, entre los que se cuentan a los triatominos (Bargues et al. 2000, Marcilla et al. 2001, Curran et al. 2004).

Existen en la región mesoamericana otras especies de triatominos con variable grado de importancia epidemiológica para la transmisión de *T. cruzi*, agente etiológico la Enfermedad de Chagas. Estas especies presentan también interesantes traslapes en su distribución geográfica con respecto a *T. dimidiata*. El estudio de estas especies, y la utilización de un grupo externo formado por especies y géneros cercanos, algunos de la tribu Triatomini, podría ayudar a comprender mejor las relaciones filogenéticas existentes dentro del mismo y ayudaría a establecer fronteras genéticas para separar a distintas especies e incluso poblaciones de estos insectos.

Por todo lo anterior se planteo la comparación genética por medio de Espaciadores Intergénicos Transcritos 2, del ADN ribosomal (ITS2) y Nicotina Deshidrogenasa Subunidad 4 del ADN mitocondrial (ND4), de varias poblaciones de *T. dimidiata*, algunas especies dentro del género *Triatoma* entre los que se encuentran las siguientes; Complejo Dimidiata; *T. dimidiata* (Latreille, 1811), *Triatoma hegneri* (Mazzotti, 1940). Complejo Protracta: *Triatoma nitida* (Usinger, 1939), *Triatoma ryckmani* (Zeledón, 1972). Complejo sin definir: *T. mexicana* (Herrich-Shaeffe, 1848). Género *Meccus*: *M. pallidipenis* (Stål, 1872) y *M. longipenis* (Usinger, 1939) y una especie utilizada para orientar el árbol *Dipetalogaster máxima* (Uhler, 1894) (Carcavallo et al. 1999).

4. ANTECEDENTES

4.1. Planteamiento del Problema

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana, es una de las parasitosis más importantes tanto a nivel de morbilidad como económico en América Latina; está distribuida desde México hasta Argentina. Se ubica como la tercera enfermedad infecciosa de importancia en la región, después del SIDA y la tuberculosis. Por si sola supera a las demás enfermedades parasitarias (Schofield 2000, WHO 2002). La enfermedad de Chagas es un importante problema de salud pública en la región, debido a las condiciones de pobreza y desconocimiento de las personas afectadas acerca de la enfermedad.

Rhodnius prolixus es el vector con mayor capacidad vectorial de la enfermedad de Chagas en Centroamérica y esta no se compara con el *Triatoma dimidiata* (Paz-Bailey et al. 2002). Para 2009 Guatemala fue el primer país de centro América en erradicar a *R. prolixus* y con eso disminuir drásticamente la mayor parte de las transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas (IPCA 2009). Sin embargo algunas poblaciones de *T. dimidiata* han demostrado tener una alta tasa de dispersión de *T. dimidiata* como vector tal es el caso de las poblaciones de Yucatán, México (95%, (Guzman-Marin et al. 1991)), Jutiapa, Guatemala (86%, (Tabaru et al. 1998)) y Sonsonate, El Salvador (89%, (OPS 2004)) y en otras regiones de Centro América, donde este vector se encuentra ampliamente distribuido. Este insecto encuentra un ambiente favorable en las grietas de las paredes de adobe y bajareque, en sectores pobres del área rural; sin embargo, también se le ha encontrado en áreas urbanas en grandes ciudades como Tegucigalpa y Guayaquil y en el Estado de México (Lyman et al. 1999, Solís-Mena et al. 2000, Martínez-Perez et al. 2002, Ramsey 2003).

El control del vector ha presentado algunos problemas, ya que se le ha encontrado dentro de las viviendas varios meses después del rociamiento con piretroides de efecto residual. Existen diversas hipótesis sobre el origen de estos insectos transmisores reinfestantes, no obstante, no se conoce la procedencia exacta de los mismos. Si se conoce la procedencia de los mismos se puede proponer estrategias de control del vector. *T. dimidiata* también se caracteriza por una variabilidad conductual, pudiéndose encontrar grupos donde los triatomos son altamente domésticos y la procedencia de infestación puede ser residual y otros donde los triatomos no entran fácilmente a la vivienda humana. La poca claridad de la identidad taxonómica dificulta la realización de inferencias sobre la dinámica poblacional de estos diferentes grupos, ya que diversas especies incluidas dentro

del complejo de *T. dimidiata* podrían tener diferentes conductas epidemiológicas y por lo tanto el control debe ser diferente para cada una. Por esto la clasificación de los grupos dentro del complejo de especie de *T. dimidiata* es necesario pues ayudará a interpretar los patrones de similitud entre los grupos o especies diferentes, sus interacciones ecológicas y su distribución geográfica de una forma más precisa, con lo cual se podrían obtener estrategias de control mucho más efectivas (Dorn et al. 2007).

4.2. Concepto de Especie.

La especie es la base del estudio de los organismos vivos. Pero su denominación es un concepto muy problemático que ha originado mucha discusión desde hace muchos siglos. Existen básicamente dos corrientes: El nominalismo y el realismo.

4.2.1. Los conceptos nominales de especie.

El nominalismo tuvo sus raíces en el siglo XIV con William Ockam. Esta doctrina señalaba que no existía ninguna relación entre el término y los individuos a los que éste se refería, es decir, sólo existían los individuos. Niega realidad objetiva de los conceptos de clase y otorga realidad solo a los individuos que componen dicha clase. Linneo y John Roy, por su parte, afianzaron la idea del carácter discreto y de la posesión de atributos objetivos de las especies, que permitían su delimitación todo enmarcado en el sentido fijista.

Darwin fue uno de sus máximos defensores, postula que no existen las especies, solo los individuos concretos, y que la especie no es más que una abstracción hecha "para entendernos" al momento actual y carente de significado en el tiempo. Es una corriente filosófica muy relacionada con las ideas fijistas de las especies. Entre estos se encuentran: Concepto morfológico, concepto fenético, concepto pragmático y concepto paleontológico.

El concepto morfológico de especie. -Cain, 1954-

Postula que las especies se pueden definir en base a **caracteres taxonómicos tipo** que representan la esencia de cada especie. Por tanto, basta con tomar un ser vivo, describirlo, y todos los que concuerden con esa descripción serán de su misma especie, siendo de distintas especies aquellos que difieran. Este concepto duro hasta que la evolución se convirtió en el paradigma científico de la Biología actual.

El concepto biológico de especie. -Dobzhansky, 1935 y Mayr, 1942-.

“Conjunto de poblaciones que real y potencialmente pueden reproducirse entre sí, pero que están aisladas de otros grupos similares”.

- ✓ Su deficiencia es que está basada en el "aislamiento" entre especies, algo muy aceptado en teoría pero con numerosísimas excepciones en la práctica.
- ✓ Presenta problemas con especies de distribución espacial o temporal amplia, y con organismos de reproducción asexual. Así como también con fósiles.

4.2.2. Conceptos Realistas.

Se fundamentan en la existencia de variación genética, con aislamiento reproductivo y bajo la influencia de los mismos factores de selección natural. Según los taxónomos evolutivos las especies son entidades reales de la naturaleza y constituyen unidades de evolución. Entre los estos se encuentran: Concepto biológico, concepto agámico, concepto evolutivo, concepto de selección, concepto ecológico, concepto de cohesión, entre otros.

De esta manera existen dos conceptos que resultan adecuados para la definición del concepto de especie de *T. dimidiata*. Estos son el Concepto de Especie de Selección Slobodchikoff, 1976 y el Concepto de Especie de Cohesión Templeton, 1989, quedando de la siguiente forma:

4.2.3. Concepto de Especie propuesto.

Sistema de individuos y poblaciones genéticamente similares, que se mantienen como una **unidad cohesiva** a causa de un conjunto de **presiones de selección**, que balancean las fuerzas impuestas por factores **ambientales, mutación o recombinación génica**.

Una unidad cohesiva puede ser definida como un **“grupo inclusivo de organismos, que tienen el potencial para intercambio genético y/o demográfico”**.

Al unir estos dos conceptos de especies se enlazan las fuerzas de selección que moldean a la especie con los factores ambientales y genéticos, que son parte de ellas. Se ha observado que en *T. dimidiata* la formación de especies puede estar siendo influenciado por presiones de selección, entre las que pueden mencionarse, selección estabilizadora y selección disruptiva (Dujardin et al. 2009)

Por otro lado el principal defecto del concepto de especie de selección era la definición de una Unidad Cohesiva. El concepto de especie de cohesión de Templeton, definido

varios años después, permite llenar ese vacío, así como también considera y explica como una especie puede en muchos casos hibridizar y sin embargo seguir manteniendo su estatus de especie. De esta manera, la definición de la unidad cohesiva que se considerará como especie, depende del mantenimiento de un grupo con relaciones reticuladas, que no solo poseen intercambio genético sino que además se encuentran sometidos a las mismas variables ecológicas (Llorante Bousquets y Luna Vega 1994).

4.3. Información General sobre Subfamilia Triatominae

Los triatominos son una subfamilia de hemípteros (chinchas verdaderas) caracterizados por su hábito hematófago. Están distribuidos en América donde se conocen más de 100 especies, algunas de las cuales son transmisoras del parásito que provoca la enfermedad de Chagas. Por su comportamiento y fisiología similares, todas las especies tienen la capacidad de ser portadoras del protozoo *Trypanosoma cruzi*. Sin embargo, condiciones como la capacidad de adaptación del vector al hábitat humano y el alto grado de antropofilia que éste posea, lo pueden convertir en un vector efectivo de la enfermedad de Chagas en humanos (Lent y Wygodzinsky 1979). Las especies de mayor importancia epidemiológica son las que colonizan fácilmente las viviendas de los humanos y viven en grietas de las paredes de casas rurales, de donde salen para alimentarse de los ocupantes en reposo, principalmente durante la noche (Schofield y Dujardin 1997).

Se caracterizan por presentar un aparato bucal que consiste en un labio segmentado en forma de canoa, que en los fitófagos no alcanza el primer par de coxas mientras que en los hematófagos es largo y recto. Son considerados insectos paurometábolos, es decir, de metamorfosis incompleta con base en transformaciones graduales de las formas de huevo, ninfas de cinco estadios a las formas adultas (Zeledón 1981, Zeledón y Rabinovich 1981).

El flagelado causante de la enfermedad es transmitido principalmente por insectos de los géneros *Triatoma* y *Rhodnius*, al depositar sus deyecciones con *Trypanosoma cruzi* sobre mucosas y áreas sensibles y expuestas de la piel (Lent y Wygodzinsky 1979, Ayau 1998). Ésta afecta principalmente el corazón, causando miocardiopatía y destrucción del tejido muscular y nervioso, aunque en menor proporción también puede afectar el aparato digestivo y toda víscera hueca. Con el SIDA se presenta con mayor frecuencia un cuadro en el sistema nervioso central (Wendel et al. 1992, Tay Zavala et al. 1994, Ayau 1998, Salazar et al. 2007).

Los estadios ninfales son morfológicamente similares al adulto y comparten los mismos hábitos alimenticios y nichos ecológicos, por lo que se considera que a partir del segundo estadio poseen el mismo potencial en la transmisión del parásito (Beaty y Marquardt 1997).

4.4. *Triatoma dimidiata*

4.4.1. Características Morfológicas:

T. dimidiata es un complejo de especie altamente variada, en cuanto a su talla, la extensión de las manchas oscuras presentes en el corión, el grado de oscurecimiento de la membrana y especialmente el tamaño de la cabeza y los ojos, esto hace difícil la identificación de la especie (Zeledón 1981).

Desde el comienzo de la descripción de la especie se detallaron varias subespecies como *T. dimidiata maculipennis* Stål, 1859 (norte, especímenes mexicanos) y *T. dimidiata capitata* Usinger, 1941, (sur, especímenes colombianos) lo que indica que siempre se tuvieron problemas para su aceptación como variedades, especies o subespecies (Dorn et al. 2007)

Lent y Wygodzinsky (1979) midieron varios especímenes empleando los mismos caracteres morfológicos utilizados entre 1941 y 1944 por Usinger para tratar de establecer si las variedades establecidas como *T. dimidiata maculipennis* y *T. dimidiata capitata* correspondían a especies o subespecies (Usinger 1944). No pudiendo lograr una clara diferenciación, encontraron que los especímenes mexicanos de *T. dimidiata maculipennis* poseen una cabeza más ancha en comparación con los especímenes de Colombia de *T. dimidiata capitata*. A la vista de estos resultados Lent y Wygodzinsky (1979) no aceptaron ninguna clasificación que separara a las variedades de *T. dimidiata*, aduciendo que en realidad existen diversas formas debido a la gran variabilidad que presenta la especie. También se ha encontrado que el tamaño de individuos criados en el laboratorio es menor que el de los encontrados en las viviendas humanas, sus alrededores y en ecotopos silvestres (Zeledón y Rabinovich 1981).

Cabe mencionar que en los triatominos se da una diferenciación morfológica más rápida que el establecimiento de barreras reproductivas o genéticas. Esto hace suponer que la morfología revela cambios ocasionados más ante nichos ecológicos específicos que por ancestros comunes, por lo cual se debe tomar con cuidado los criterios basados en morfología de análisis filogenéticos en Triatominae (Dujardin et al. 1999).

4.4.2. Biología

Figura 1. Ejemplares Adultos de *T. dimidiata*.



Izquierda: ejemplar de América central.
Foto tomada por: M. menes y M. García.
Propiedad de Lenap.



Derecha: Ejemplar de Cozumel.
Foto tomada por: P. Landaverde

Estos organismos son atraídos por la luz, (especialmente los machos) hacia ámbitos principalmente domésticos y peridomésticos. Realizan vuelos cortos debido a que la mitad de las alas son queratinizadas por lo que la dispersión se puede llevar a cabo por medio de transporte pasivo, llevados en mercancía o madera por parte del hombre (Schofield 2000). Su tamaño es muy variable a lo largo de su distribución y según (Lent y Wygodzinsky 1979). Variaciones en la coloración es uno de los factores que han sido importantes en la diferenciación de las poblaciones de *T. dimidiata*. Un ejemplo son las diferencias encontradas en especímenes de adultos y ninfas de Cozumel y Lanquín, así como otros ejemplares de cuevas, en contraste con los triatominos del resto de la distribución (Figura 1 y 2).

Figura 2. Ninfas de chinche del 4to estadio de *T. dimidiata*.



Izquierda: Triatomino doméstico. Derecha: Triatomino de Lanquín.
Foto tomada por: M. Menes y M. García. Propiedad de Lenap.

4.4.3. Ecotopos

Se refieren al tipo de hábitat de *T. dimidiata*, que pueden ser:

Silvestre

Los vectores se encuentran frecuentemente en ambientes naturales como bosques y selvas. Se alimentan de sangre de mamíferos, especialmente zari güeyas (*Didelphys*

marsupialis). Suelen encontrarse en refugios de armadillos (*Xenarthra*), en palmeras, árboles viejos y huecos, cuevas de murciélagos, montículos de piedra, en ruinas Mayas (Carcavallo et al. 1999, Schofield 2000, Zeledon et al. 2001, Monroy et al. 2003).

Peridoméstico

Son los que se encuentran cerca o alrededor de casas rurales en gallineros, perreras, chiqueras, entre otras. Se alimentan de animales domésticos (perros, gatos, gallinas) (Lent y Wygodzinsky 1979).

Intradoméstico

Se les llama así a los organismos que se encuentran dentro de las viviendas, cerca de los lugares donde duermen las personas que habitan la casa o animales domésticos que viven en el interior de la misma, y que finalmente llegan a alimentarse de humanos. Las ninfas tienden a cubrirse con partículas de polvo (Lent y Wygodzinsky 1979).

4.5. Distribución de *T. dimidiata*

T. dimidiata posee un amplio ámbito de distribución geográfica, desde México (Campeche, Colima, Chiapas, Estado de México, Guanajuato, Hidalgo, Guerrero, Jalisco, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Quintana Roo, San Luis Potosí, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán) pasando por Belice, Guatemala, El Salvador, Honduras, Nicaragua, Costa Rica, Panamá, en algunas provincias de Venezuela, Colombia y Ecuador, extendiéndose hasta el norte de Perú. La altitud varía del nivel del mar hasta 1,700 metros sobre el nivel del mar (Lent y Wygodzinsky 1979, Zárte y Zárte 1985, Salazar et al. 1988, Schofield 1994, Magallón-Gastélum et al. 1998, Carcavallo et al. 1999, Ramsey et al. 2000, Vidal-Acosta et al. 2000, Escorza et al. 2001, Harris et al. 2002, López Cardenas et al. 2002, Martínez-Perez et al. 2002, López Cardenas et al. 2005, Salazar et al. 2005, Cruz-Reyes y Pickering-López 2006) (Anexo 14.2).

4.6. Condición epidemiológica de *T. dimidiata* en México y Centroamérica

Centroamérica es definida, geológicamente, por su geografía física como el área terrestre y de plataforma continental que se extiende desde el istmo de Tehuantepec, en México, hacia el este y sureste (entre las coordenadas 18° 09'15"N, 94° 32'28"O y 16° 12'52"N, 94° 45'37"O) hasta las tierras bajas de Atrato en Colombia (5° 33'16"N y 76°

30'03"O). Se la puede dividir en dos grandes provincias, debido a su estructura geológica: una septentrional, llamada "América Nuclear" constituida por la parte más vieja de la misma formada por parte del continente norteamericano hasta el límite central de Nicaragua (12° 30'N 83°36'59"O). La otra es la América Central Meridional, que abarca desde la porción sur de Nicaragua, hasta las tierras bajas de Atrato en Colombia (5° 33'17" y 76° 30'03"O) (Dengo 1968). Sin embargo deber aclararse que políticamente, la definición de Centroamérica comprende el área comprendida a partir de Guatemala hasta Panamá.

Situación epidemiológica en los países donde se distribuye:

México es considerado como el país latinoamericano con la mayor diversidad de triatomíneos, llegándose a encontrar hasta 35 especies y subespecies del género *Triatoma*, aunque hasta el día de hoy solo se ha observado que 13 de ellas presentan un riesgo para la transmisión del parásito al hombre (Lent y Wygodzinsky 1979). El conocer los datos epidemiológicos sobre la enfermedad es difícil debido a la falta de conocimiento del diagnóstico de la enfermedad.

Se estima que hay 1.564,800 personas infectadas con *T. cruzi* en la República Mexicana. Debe prestarse mucha atención a la aparición de un alto porcentaje de infestación en aéreas urbanas sin infestación y con alturas mayores de los 2000 msnm (estado de México y Distrito Federal) (Guzman-Bracho 2001, Ramsey 2003). Las estimaciones independientes de las tres principales formas de transmisión de la Enfermedad de Chagas para la República Mexicana indican que 96% de la transmisión ocurre a través del vector.

Tanto en América Central como en los países andinos se encuentran dos vectores de importancia epidemiológica debido a su convivencia con el hombre: *R. prolixus*, que se encuentra circunscrita a ciertas áreas domésticas de Mesoamérica, y *T. dimidiata*, que tiene una amplia distribución.

En Guatemala *T. dimidiata* se encuentra en 21 de los 22 departamentos del país, en condiciones domésticas, peridomésticas y silvestres. La zona oriental del país, es el área de mayor endemicidad, presentando índices de infestación domiciliar entre 12 y 45 % (WHO 2002).

En El Salvador *T. dimidiata* es el vector más importante debido a que presenta una amplia distribución en el territorio con una condición principalmente domiciliar en todos los departamentos del país. Posee un índice de colonización intradomiciliar del 47.1% y un índice de dispersión del 64.8%. En Honduras es el vector más importante debido a que muestra una distribución amplia y continua, se encuentra en 16 de los 18 departamentos con un índice de infestación del 25% y uno de dispersión en áreas centrales del 56%.

En Nicaragua presenta una amplia distribución geográfica con situación doméstica y peridoméstica en áreas rurales y urbanas, con altos índices de infestación y colonización.

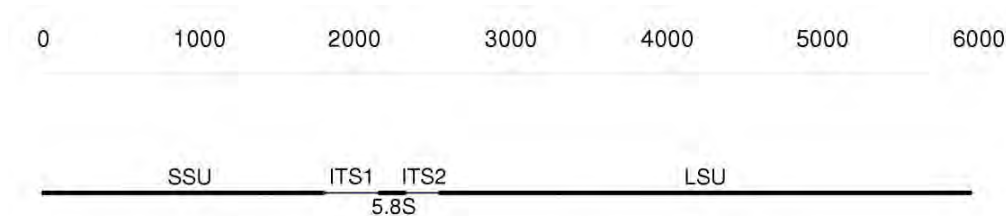
En Costa Rica es el único vector de importancia epidemiológica, posee una amplia distribución y un índice de infestación domiciliar entre 26.0 y 44.0 % (OPS 2002).

4.7. Uso de marcadores moleculares para el estudio de sistemática

4.7.1. ADN ribosomal

Los ITSs son familias multigénicas arregladas en tándem que presentan usualmente bloques repetitivos (Almeyda-Artigas et al. 2000), cuya unidad de repetición pueden ser microsatélites entre 1 y 5 pares de bases y los cuales pueden ser usados como marcadores polimórficos para la diferenciación de poblaciones entre especies cercanas (Jarne y Lagoda 1996). Se les localiza entre las unidades del ribosoma corta y larga tal como se observa en la figura 3. La comparación de las secuencias de ADN ribosomal ha probado ser útil en el estudio filogenético y de relaciones en formas cercana y distantes, además de poseer la característica de ser eficientes para estudios de sistemática. Los Espaciadores Intergénicos Transcritos (ITS) han demostrado presentar regiones variables (Jarne y Lagoda 1996)

Figura 3. Posición de los ITS en el ADN ribosomal.



Estudios realizados con comparación de secuencias, parsimonia y análisis de máxima similitud indican que el ITS- 2 es un marcador útil para resolver relaciones a nivel supra específico, específico, sub específico y poblacional en Triatominae (Bargues et al. 2008).

Los dos marcadores ribosomales (ITS-1 y ITS-2) son útiles para resolver afiliaciones de taxa cercanamente relacionados que han divergido en un tiempo relativamente reciente (menos de 50 millones de años atrás) (Marcilla et al. 2001).

Las secuencias de ITS usualmente tienen el mismo largo en diferentes especies del mismo género, se han encontrado diferencias pronunciadas en el largo de los ITS relacionado con la presencia de microsatélites (Almeyda-Artigas et al. 2000).

La región de estas repeticiones más apropiada para comparaciones a nivel género y especie es el ITS2, que presenta una longitud típica de 200 a 400 pares de bases en especies de *Drosophila* (Young y Coleman 2004).

4.7.2. ADN Mitocondrial (Nicotina Deshidrogenasa Subunidad4 -ND4-)

El ADN mitocondrial permite estudiar la relación familiar de los organismos del linaje materno en animales. En trabajos anteriores se ha observado estudios con poblaciones de *T. dimidiata* procedentes de México, Guatemala y Honduras por medio de variación de la secuencia de ADN mitocondrial, utilizando tres fragmentos de genes: la gran subunidad ribosomal de ARN (16S rRNA), la subunidad 4 de la NADH deshidrogenasa (ND4) y la subunidad b de la citocromo oxidasa (Cytb). En este trabajo se encontró información que indicaba la presencia de grupos geográficamente definidos, sugiriendo que *T. dimidiata* es un complejo de especies (*Monteiro, com pers*)(Harris et al. 2002).

En otro estudio donde se compararon poblaciones de *T. dimidiata* procedentes de diez países desde México hasta Ecuador, se utilizaron los marcadores de ADN mitocondrial, NADH deshidrogenasa subunidad 5 (ND5). Se encontró una asociación de las poblaciones de Honduras y Ecuador, lo cual reforzaría la teoría de una posible introducción artificial de individuos de *T. dimidiata* procedentes de Honduras a través del comercio marítimo en ambas poblaciones. Los análisis genéticos en combinación con análisis morfométricos ayudaron a apoyar la idea de un ancestro de *T. dimidiata* mesoamericano y no sudamericano (Solís-Mena 2000).

5. JUSTIFICACIÓN

La ubicación taxonómica de las diferentes poblaciones de *T. dimidiata* ha sido desde un inicio compleja tal como se ha mencionado anteriormente. Ya que según la clasificación de Usinger (1944) y sus posteriores correcciones por Lent y Wygodzinsky esta ha pasado de ser subespecies a ser consideradas como una misma especie, a pasar de nuevo a ser considerada como un complejo de especie. La correcta ubicación taxonómica de una especie de vector de una enfermedad, tiene repercusiones en el control de la misma. Para el caso de *T. dimidiata* se han publicado diferencias significativas en cuanto a los resultados de control químico de poblaciones de triatomíneos en áreas aleatorias. Un ejemplo es el caso de Zacapa y Jutiapa en Guatemala, siendo la primera fácilmente controlada, mientras que la segunda no se ha logrado controlar (Hashimoto et al. 1996, Nakagawa et al. 2003b).

Estudios recientes acerca de la genética poblacional de *T. dimidiata* en Mesoamérica han mostrado patrones en la estructura poblacional que indican que aparentemente ha existido aislamiento para algunas poblaciones y un proceso de diferenciación de las mismas (Bustamante et al. 2004, Calderón et al. 2004, Landaverde 2004, Menes 2004). Estos patrones muestran una diferenciación de las poblaciones tanto a nivel morfológico como molecular (índice de distancia genética de Nei = 0.0151 a 0.3455) en dos bloques uno al norte y otro al sur similar al señalado por Usinger (1944). Sin embargo, también se ha observado asociaciones de algunas poblaciones comprendidas en el grupo del norte junto con algunas del grupo al sur sugiriendo la existencia de especies híbridas posiblemente resultantes al existir flujo genético, lo cual parece verse reforzado ante la existencia de índices de flujo migratorio $-Nm > 1.1$ con RAPD-PCR- entre diversas poblaciones de *T. dimidiata* de Mesoamérica e incluso entre algunas poblaciones silvestres y domésticas (Landaverde 2004, Menes 2004).

Debido a las preguntas surgidas luego de estudiar la dinámica y estructuración de los grupos de *T. dimidiata* de México, Centroamérica y Colombia con técnicas como RAPD-PCR y morfometría se plantea necesario el estudio de las relaciones filogenéticas de estos grupos que son considerados como un complejo de especie. Este estudio debe ser dentro de los grupos de lo que es considerado según Lent y Wygodzinsky (1979) como una misma especie *T. dimidiata*, pero que según los últimos estudios tanto a nivel molecular como morfológico está siendo considerado como especies diferentes o subespecies. Con esto se pretende comprender el proceso por el cual las especies de estos insectos triatomíneos, en especial del complejo de *T. dimidiata* se relacionan y de esta manera entender como cada una se mueve hacia el hábitat doméstico. Así como proponer estrategias de control de las distintas especies, entender el proceso de domesticación e impedir que otras especies relacionadas puedan llegar a domiciliarse.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo General

- Determinar las relaciones filogenéticas de diversas poblaciones de *Triatoma dimidiata*.

6.2. Objetivos Específicos

- Analizar las relaciones genéticas entre poblaciones de *T. dimidiata* y siete especies de Triatomíneos, a partir de secuencias de las regiones de ITS-2 y ND4.
- Analizar y comparar las secuencias obtenidas para cada población, especie y cada marcador para la obtención de datos que puedan ser utilizados en el análisis filogenético.
- Elaborar un árbol filogenético para visualizar las relaciones ancestro descendiente entre las diversas especies y poblaciones estudiadas por medio de máxima parsimonia y análisis de distancia.

7. HIPÓTESIS

El complejo de *Triatoma dimidiata* está conformado por diversos grupos diferenciados que pueden ser considerados como especies diferentes.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Materiales

8.1.1. Universo de Trabajo

Se trabajó con 3 taxa y sus poblaciones domésticas y silvestres de triatominos del complejo de especies de *T. dimidiata* y 6 especies como grupo externo del cual una, *T. hegneri* es del complejo Dimidiata (Carcavallo et al. 2000). Una del complejo *Protracta*: *T. nitida*. Una que no está definida en ningún complejo *T. mexicana*. Dos especies del complejo *Phyllosoma*, del género *Meccus*: *M. longipenis*, y *M. pallidipenis*. Y una especie perteneciente a la tribu Triatomini, todas procedentes de la región Mesoamericana comprendida por México, Guatemala, El Salvador, Honduras, Nicaragua, Costa Rica y Panamá.

Las poblaciones domésticas y silvestres fueron escogidas con base en su distribución y el ecotopo presente en cada sitio con el fin de evitar que se presente algún resultado producto de un artefacto de muestreo.

Algunos especímenes se encuentran ingresados a la colección de referencia que posee el Laboratorio de Entomología y Parasitología –LENAP– de la Escuela de Biología, de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Otros especímenes fueron proporcionados por el laboratorio de Biología de Parásitos de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Las demás poblaciones fueron obtenidas por medio de colectas en diversas regiones de Mesoamérica, Colombia y Ecuador. Una vez obtenidos los especímenes se procedió a cortar las patas, de donde se extrajo el ADN. Se seleccionaron entre 4 y 6 individuos por población. Los grupos con los cuales se trabajo, son los siguientes (Tabla 1, Anexo 14.3 para la ubicación de las poblaciones):

Tabla 1. Lista de especies utilizadas

#	Especie	Clasificación.	Nombre Sps.	Lugar +		Clave*	Latitud	Longitud
sps 1	Genero <i>Triatoma</i>	Complejo dimidiata	<i>Triatoma dimidiata sps1</i>	Yucatán	México	TdMxYc00	20° 42' 51.26" N	89° 05' 39.62" O
				Peten.	Guatemala	TdGtPP00 (palmera) TdGtPCH0 (Chultun) TdGtPLz0 (Trampa Luz) TdGtPSI0 (San Luis)	17° 03' 22.06" N	89° 23' 02.68" O
sps2	Genero <i>Triatoma</i>	Complejo dimidiata	<i>Triatoma dimidiata sps2</i>	Lanquín	Guatemala	TdgLqH10	15° 34' 02.94" N	89° 58' 40.90" O
				Lanquín	Guatemala	TdGtLq00	15° 34' 02.94" N	89° 58' 40.90" O
sps3	Genero <i>Triatoma</i>	Complejo dimidiata	<i>Triatoma dimidiata sps3</i>	Tuxpan.	México	TdMVTx00	20° 56' 44.66" N	97° 24' 20.68" O
				Quiche.	Guatemala	TdGtQc00	15° 10' 36.61" N	90° 56' 32.14" O
				Lachuá	Guatemala	TdGtLc00	15° 56' 12.64" N	90° 37' 50.40" O
				El Tule, Comapa y La Brea, Jutiapa.	Guatemala	TdGtJT00 (EL Tule) TdGtJB00 La Brea (Comapa) TdGtJC00	14° 19' 60.00" N	89° 41' 00.00" O
				Izabal	Guatemala	TdGtIz00	15° 29' 51.55" N	88° 51' 52.91" O
				La Primavera	El Salvador	TdESPr00	14° 03' 10.00" N	89° 37' 20.00" O
				Intibucá,	Honduras	TdHnIt00	14° 19' N	88° 09' O
				Copán	Honduras	TdHnCp00	14° 56' 12.02" N	88° 51' 54.73" O
				Rio San Juan	Nicaragua	TdNcRJ00	11° 12' 08.26" N	84° 31' 19.99" O
				Carazo	Nicaragua	TdNcCr00	11° 43' 38.90" N	86° 12' 57.06" O
				Costa Rica	Costa Rica	TdCRHr00	9° 59' 30.94" N	84° 07' 12.06" O
				Panama	Panama	TdPnSf00	8° 31' 06.46" N	81° 04' 44.88" O
				Boavita.	Colombia	TdCoBc00	6° 19' 57.50" N	72° 35' 15.03" O
				Ecuador	Ecuador	TdEcsp00	1° 49' 52.46" S	78° 11' 00.26" O

#	Especie	Clasificación.	Nombre Sps.	Lugar +		Clave*	Latitud	Longitud
			<i>T. dimidiata</i> híbrido	Cozumel	Mexico	ThdMCoz0	20° 21' 57.96" N	86° 59' 41.28" O
Sps4	Genero <i>Triatoma</i>	Complejo dimidiata	<i>T. hegneri</i> .	Cozumel	Mexico	ThMxCz00	20° 21' 57.96" N	86° 59' 41.28" O
Sps5			<i>T. mexicana</i>	Guanajuato**	Mexico	TnMxYc00	21° 01' 09.36" N	101° 15' 41.24" O
Sps6		Complejo Protracta	<i>T. nitida</i> .	Chiquimula	Guatemala	TnGtCh00	14° 45' 05.40" N	89° 28' 27.18" O
			<i>T. ryckmani</i>	Progreso	Guatemala	TrGtPg00	14° 56' 27.71" N	90° 04' 31.52" O
Sps7	Genero <i>Meccus</i>	Complejo Phyllosoma	<i>M. longipennis</i>	Jalisco	Mexico	MlMxJl00	20° 09' 14.47" N	103° 54' 51.84" O
Sps8			<i>M. pallidipennis</i> .	Oaxtepec, Morelos	Mexico	MpMxOM00	18° 54' 25.41" N	98° 58' 12.96" O
Sps9	Triatomini		<i>Dipetalogaster maxima</i>	Baja California sur	Mexico	DmMxBC00	22° 53' 25.92" N	109° 55' 00.25" O

Taxa con sus respectivas poblaciones, origen, ecotopo, clave en la imagen y coordenadas. +En LUGAR, en algunas ocasiones los nombres corresponden a departamentos o estados y en otros a municipios, dependiendo de la importancia del lugar de muestreo. Existen otros taxa que no fueron agregados en esta tabla, que fueron obtenidas del Genbank, pero que están en los análisis (Anexo 14.4)

**Población reportada por (Salazar, 2007).

*La nomenclatura escogida para CLAVE, esta compuesta por 8 letras y fue designada como sigue: Las dos primeras letras corresponden al género y/o especie; Td = *T. dimidiata*, Th = *T. hegneri*, Tm = *T. mexicana*, Tn = *T. nitida*, Tr = *T. ryckmani*, Ml = *M. longipennis*, Mp = *M. pallidipennis*, Dm = *Dipetalogaster maxima*. Las dos letras siguientes corresponden al país; Mx = México, Gt = Guatemala, ES = El Salvador, Hn = Honduras, Nc = Nicaragua, CR = Costa Rica, Pn = Panamá, Co = Colombia, Ec = Ecuador. El tercer par de letras corresponden con el sitio donde se muestreo; Yc = Yucatán, PP = Petén en Palmera, PCH = Petén en Chultún, PLz = Petén en trampa de Luz, Lq = Cuevas de Lanquín, Tx = Tuxtán, Qc = Quiché, JT = Jutiapa en El Tule, TC = Jutiapa en Comapá, TB = Jutiapa en La Brea, Iz = Izabal, Pr = La Primavera, It = Intibuca, Cp = Copán, Cr = Carazo, Hr = Heredia, Sf = Santa fe, Bc = Boyacá, Sc = Súcre, Cz ó Coz = Cozumel, Ch = Chiquimula, Pg = El Progreso, Jl = Jalisco, OM = Oaxtepec, Morelos, BC = Baja California, Sp = no se sabe el lugar.

8.2. Procedimiento

8.2.1. Colecta de Material Biológico

Los ejemplares colectados se encuentran introducidos en una base de datos, de la colección de referencia del Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología –LENAP– y en la colección del Laboratorio de Biología de Parásitos de la Universidad Nacional Autónoma de México (LBP-UNAM). Esta base de datos se encuentra clasificada según país, y especie de triatominos.

Estos pasan por un proceso de determinación de infección con *Trypanosoma cruzi* y posteriormente se procede a identificarlos y colocarlos en un frasco de plástico en donde se introduce al individuo con alcohol glicerinado al 5%. Para el procesamiento de muestras se corta las patas para extraer el ADN.

El material fue colectado por diferentes instituciones, de la siguiente manera¹:

- **MÉXICO**: Colectadas por el personal del Laboratorio de Biología de Parásitos de la Facultad de Medicina, de la Universidad Autónoma de México (LBP-UNAM) y por Bióloga Landaverde con financiamiento del Instituto de Ecología, de la Universidad Nacional Autónoma de México (IE-UNAM).
- **GUATEMALA**: Colectadas por el personal del Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología (LENAP) de la Universidad de San Carlos de Guatemala (USAC).
- **EL SALVADOR**: Ministerio de Salud (Curso sobre colecta de Vectores de la Enfermedad de Chagas).
- **NICARAGUA**: Personal del Ministerio de Salud de Nicaragua (MINSa)
Pertenecentes a los Sistemas Locales de Atención Integral de Salud (SILAIS).
- **COSTA RICA**:
Colectadas por el Instituto de Biología de Costa Rica (INBio).
- **PANAMÁ**: Ministerio de Salud, Curso sobre colecta de Vectores de la Enfermedad de Chagas.
- **COLOMBIA**: Ministerio de Salud (Curso sobre colecta de Vectores de la Enfermedad de Chagas).

¹ Ver mapa de distribución de poblaciones en Anexo 2.

- **ECUADOR:** Ministerio de Salud (Curso sobre colecta de Vectores de la Enfermedad de Chagas).

8.2.2. Extracción de ADN

Se tomaron las muestras de las triatominos a estudiar, de la siguiente manera:

- Adultos y 5to Estadio: 2 ó 3 patas.
- 4to y 3er estadio: 3 patas.
- 2do estadio: 4 patas.
- 1er estadio: el individuo entero.

Lavar primero con 500 µl etanol y luego con agua.

El ADN se aisló según instrucciones para el Kit DNeasy® Blood & Tissue (QIAGEN, Austin, Texas)

8.2.3. Amplificación por PCR

La amplificación de los fragmentos se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) según Marcilla et. al., (2001) para ITS-2 y según las condiciones señaladas por Lyman et. al., (1999). Los cebadores que se emplearon fueron:

ITS-2 Forward 5'-CTAAGCGGTGGATCACTCGG-3'
Reverse 5'-GCACTATCAAGCAACACGACTC-3' (Marcilla et al. 2001)

ND4. Forward 5'-GGCGCCTCAACATGAGC(C/T)CT-3' modificado de Simon et. al., (1994)
Reverse 5'-ATTGTTGTCATGGTAATGAC-3' Tdmt47 (Dotson et al. 2001)

8.2.4. Amplificación

- En tubos eppendorf estériles se hace las mezclas para los dos diferentes marcadores moleculares.

Receta de mezcla para amplificar ITS-2 y ND4.

Se elaboró para ambos marcadores una solución de 25 µl con los reactivos y concentraciones finales, según anexo 14.1.

- El ciclo del programa de amplificación para ITS2, es el presentado por (Almeyda-Artigas et al. 2000).

- El ciclo del programa de amplificación para ND4, es el presentado por (Lyman et al. 1999, Monteiro et al. 2000).
- Las amplificaciones por PCR fueron comprobadas en geles de agarosa-TBE al 1%, teñidos con bromuro de etidio y fotografiados con luz UV.

8.2.5. Secuenciación de ADN

Los amplicones resultantes fueron enviados a secuenciar a High-Throughput Genomics Unit de la Universidad de Washington, con reacciones en ambos sentidos de la cadena.

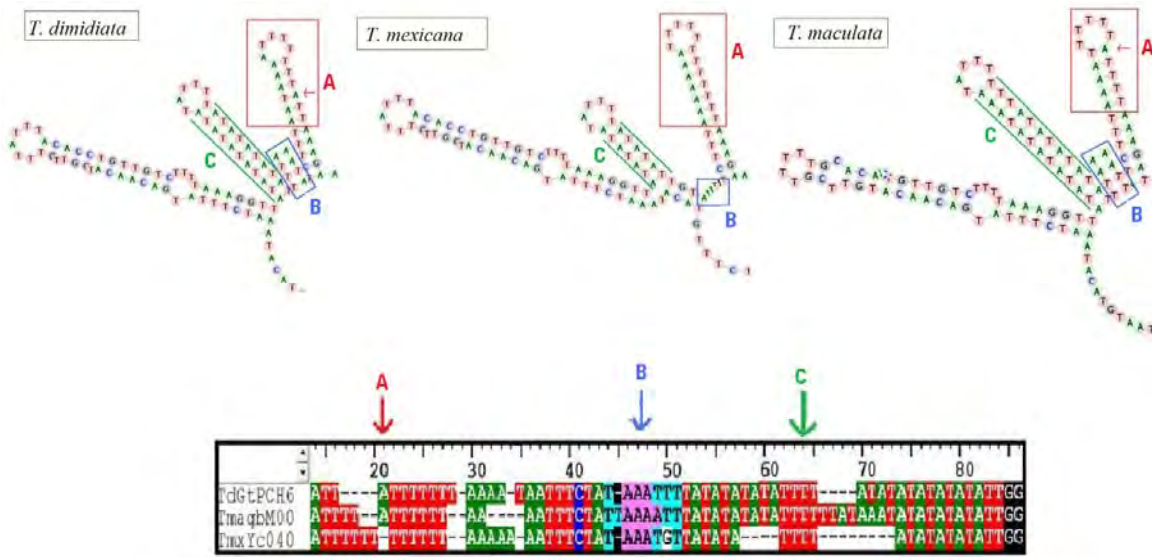
8.3. Análisis de Datos

8.3.1. Alineación ITS2

Los ITS son marcadores que poseen mucha variabilidad y en muchas ocasiones es muy difícil lograr un buen alineamiento y este puede ser muy subjetivo. Para resolver esto se utilizaron las reglas de alineamiento de Borsch (2003). Posteriormente para darle un soporte a la alineación que se realizó, se utilizó la estructura secundaria de la secuencia que contiene el extremo 5.8S y el ITS2. De esta manera con base a la estructura secundaria (Figura 5) se determinó qué microsatélites eran más variables, y si se trataba de uno solo o de varios (Anexo 14.7). Para ello se utilizaron los programas Bioedit Ver7.0.9.0 (Hall 1999) y 4Sale 1.5 (Seibel et al. 2006, Seibel et al. 2008) para alinear manualmente las secuencias obtenidas para ITS2, modificando de acuerdo a los microsatélites encontrados (Figura 4). De esta forma, se observaron las estructuras secundarias formadas por cada secuencia (Anexo 14.7), para detectar donde se encontraban las partes más variables que presentaran cambios en microsatélites. En algunas ocasiones para secuencias muy difíciles de alinear se utilizó Clustal W para ubicar motivos y posteriormente fue alineado con el procedimiento anterior.

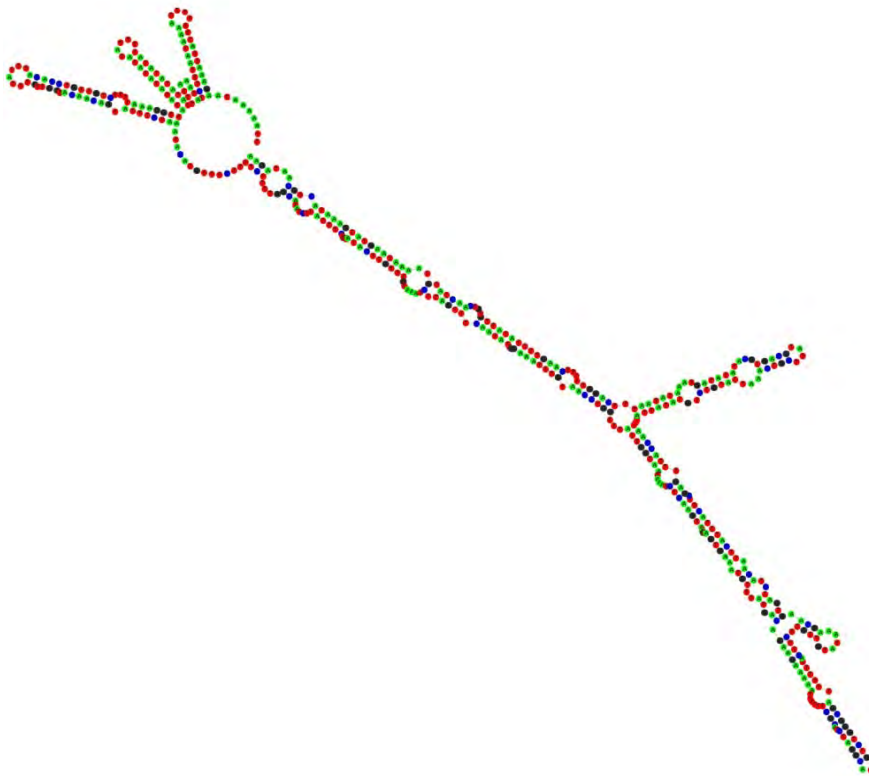
Ya obtenida la alineación en base a estructura secundaria, se le realizó codificación de gaps y microsatélites según el método de Simmons y Ochoterena (2001) y Ochoterena (2008). Se realizó la codificación de microsatelites a mano, para los microsatélites y la compleja para gaps mediante el programa IndelCoder v1.4 (Müller 2006).

Figura 4: Ejemplo de estructura secundaria



Ejemplo de cómo la estructura secundaria ayudó a determinar la presencia de microsatélites mono nucleótidos o de varios nucleótidos.

Figura 5: Estructura secundaria de ITS2 para *Triatoma dimidiata*.



La estructura secundaria corresponde a una población en Guatemala. Sin embargo, es la estructura secundaria más repetida en los datos.

8.3.2. Alineación ND4

Se verificó por medio de secuencias de proteínas y una secuencia del genbank el marco de lectura y si la secuencia de la proteína correspondía a la reportada para ND4 con DNAsp v4.10.9 (Rozas et al. 2003). La alineación de esta secuencia no presentó problemas por lo cual no se colocaron gaps para respetar el marco de lectura de la proteína, para manejar las secuencias se utilizó Bioedit Ver7.0.9.0 (Hall 1999).

Abascal et al. (2006), descubrió que en algunos insectos el código genético de algunos codones para ciertos aminoácidos tiende a tener un cambio incluso de una especie cercana a otra, lo cual podría provocar un exceso de variabilidad genética al análisis. Sin embargo, debido a su alta tasa de mutación y a que dicho evento puede contener información filogenética, ya que está relacionado a cambios en taxa específicos es altamente recomendable para el estudio de especies tan cercanas como el Complejo de *T. dimidiata*.

Para determinar si el marcador presenta codones con dicho cambio paralelo del código genético se hizo una breve revisión del cambio de proteínas de una especie a otra, por medio del programa GenDecoder v1.6 (Anexo 14.5) (Abascal et al. 2006). No se encontró un cambio del código genético en el gen de ND4 según lo reportado por el autor ya mencionado, sin embargo se recomienda un estudio más detallado para determinar si existe algún otro patrón, lo anterior implica otra clase de análisis que escapan al alcance del presente estudio.

8.3.3. Estadísticos de las matrices

8.3.3.1. Test de neutralidad

Para determinar si las secuencias, se encontraban bajo efecto de selección o si seguían el modelo de neutralidad, se estimó la D de Tajima y el test de Fu y Li por medio de DNAsp v4.10.9 (Rozas et al. 2003).

Para ello se realizaron dos pruebas por separado:

En la primera se colocaron todas las secuencias que correspondían a los taxa que no presentaban ningún problema en la posición de los individuos en las topologías.

En la segunda se colocaron las secuencias que correspondían a los taxa de los individuos que presentaban una posición no esperada en las topologías. Con esto se esperaba determinar si alguno de los dos grupos de secuencias estaban siendo influenciadas por algún tipo de selección ya sea negativa o positiva.

8.3.3.2. Sitios segregantes

Se buscaron los sitios segregantes con dos, tres y cuatro variantes para cada posición en cada una de las matrices por medio de DNAsp v4.10.9 (Rozas et al. 2003). El fin de comparar las matrices de cada uno de los marcadores es determinar si existe algún efecto de saturación, que pueda provocar la aparición de caracteres que provoquen falsas homologías entre diversas terminales.

8.3.3.3. Recombinación

Se utilizaron análisis con DNAsp v4.10.9 (Rozas et al. 2003) y RDP3 (Recombination Detection Program). RDP es un programa que permite el acceso a siete métodos exploratorios para la detección de señal recombinante. Sólo se utilizaron cuatro métodos, debido a que los demás son usados para matrices pequeñas de menos de 20 secuencias. Los métodos y condiciones para RDP3, fueron las siguientes:

- ✓ De forma general solo se cambia el tipo de secuencia a analizar, sea lineal o circular y se marcan los análisis que se desean ejecutar.
- ✓ RDP (Martin y Rybicki 2000); condiciones preestablecidas, solo se modifica el valor de porcentajes de identidad de la secuencia de 80% a 90% ya que de esta forma solo se reconoce la recombinación intraespecífica.
- ✓ GENECONV (Sawyer 1989); condiciones preestablecidas, y en el caso de ITS2 se trata cada indel como un polimorfismo.
- ✓ MAXCHI (Maynard Smith 1992); se cambia la ventana a tamaño variable para que de esta forma se ajuste a los cambios que pueda existir en la matriz.
- ✓ CHIMAERA (Posada y Crandall 2001); se cambia la ventana a tamaño variable para que de esta forma se ajuste a los cambios que pueda existir en la matriz

8.3.4. Análisis Filogenéticos

Homología primaria y secundaria con TNT v1.1 (Goloboff et al. 2000, Goloboff et al. 2003).

TNT es el último programa de NONA creado con nueva tecnología de búsqueda para la realización de análisis de parsimonia, donde se puedan evaluar las hipótesis de homología primaria y secundaria. Se utilizaron las siguientes condiciones:

- Las diferentes búsquedas se realizaron con pesos implicados con los valores pre-establecidos, entre las búsquedas con nueva tecnología se escogió:

- Búsqueda sectorial; al azar y restringida, que fueron calculados con adiciones múltiples de secuencias y modificado con TBR.
- Búsqueda de matraca; las fases de perturbación y el número de iteraciones usados, fueron las preestablecidas.
- Búsqueda de tree-drifting; los arreglos subóptimos aceptados y el número de ciclos usados fueron los preestablecidos.

Búsqueda de Tree fusing; el número de rondas establecidas fue de 3, empezando con el mejor árbol y fusionando múltiples árboles óptimos.

Todas estas búsquedas fueron realizadas simultáneamente con 20 adiciones al azar de secuencias. Luego de obtenido el árbol se realizó un consenso estricto y un consenso de mayoría, para observar si se conservaban los clados formados.

Distancia y máxima parsimonia con PAUP4b (Swofford y Selander 1997).

Por medio de PAUP se realizaron análisis de parsimonia así como también análisis de distancias que permitan observar la extensión de los brazos de las terminales de acuerdo al número de mutaciones en común.

Parsimonia: Se realizaron búsquedas heurísticas, con caracteres con igual peso, con 1000 replicas adicionales al azar, reteniendo 100 árboles en memoria, con TBR. Aunque se realizaron análisis para ITS2 de las matrices con y sin gaps, y con codificación de la matriz y codificación de gaps, solo se discuten los elaborados con la información de la codificación de gaps compleja, ya que TNT no podía aceptar el formato resultante de dicha codificación.

Distancia: Se generó un árbol de distancia, se elaboró primero un árbol obtenido con el modelo evolutivo GTR+I y Neighbor-joining (árbol no mostrado) para observar si existe atracción de ramas largas.

Se elaboraron todos los análisis para las dos matrices de ITS2 y ND4. Se construyó una tercera matriz, donde se usaron solo los individuos de los que se habían obtenido secuencias de ADN para ambos marcadores y se le llamo de Evidencia combinada.

9. RESULTADOS

9.1. Composición nucleotídica y longitud de secuencias

9.1.1. ITS2

Longitud del alineamiento. El tamaño del alineamiento con todos los taxa es de 546 nucleótidos incluidos los gaps. El total de taxa incluidos es de 115 individuos.

El tamaño de alineamiento para el complejo *T. dimidiata* más el grupo externo más cercano que es *T. hegneri* es de 507 nucleótidos.

El tamaño de alineamiento solo para el complejo de *T. dimidiata* es de 499 nucleótidos.

Porcentaje de AT y GC

Tabla 2: Porcentaje de nucleótidos para los diferentes alineamientos obtenidos.

Porcentajes	Todos los taxa incluidos	Complejo <i>Triatoma dimidiata</i> + <i>Triatoma hegneri</i> .	Complejo de <i>Triatoma dimidiata</i>
A	32.60%	32.52%	32.50%
T	43.60%	43.50%	43.50%
G	13.10%	13.26%	13.30%
C	10.60%	10.72%	10.70%
AT	76.20%	76.00%	76.00%
GC	23.80%	24.00%	24.00%

Se observa que los porcentajes de AT para los diferentes alineamientos presenta un sesgo hacia una mayor proporción de los mismos.

9.1.2. ND4

Longitud del alineamiento. En este caso al no existir inserciones y deleciones durante el alineamiento la longitud es la misma para todas las secuencias. La longitud del alineamiento fue de 615 nucleótidos y 205 aminoácidos.

Tabla 3: Porcentaje de Bases

A	19.30%
T	55.50%
G	17.00%
C	8.10%
AT	74.80%
GC	25.20%

ND4 presenta una proporción mayor de AT de forma similar a la observada para ITS2.

9.2. Estadísticos de las matrices

9.2.1. Test de neutralidad

Para determinar si las secuencias se encontraban bajo efecto de selección se utilizó un D de Tajima y Fu and Li test.

Tabla 4. Valores de los test de neutralidad para ambos marcadores.

		Tajima's D	Fu and Li's D* test statistic	Fu and Li's F* test statistic
ITS2	Todas las	-2.34535	-4.97954	-4.56702
	secuencias	** , P < 0.01	** , P < 0.02	** , P < 0.02
	Solo Area con	-1.37389	-1.3333	-1.49837
	paralogia	Not significant, P > 0.10	Not significant, P > 0.10	Not significant, P > 0.10
ND4		-1.2887	-2.57271	-2.39407
		Not significant, P > 0.10	*, P < 0.05	*, P < 0.05

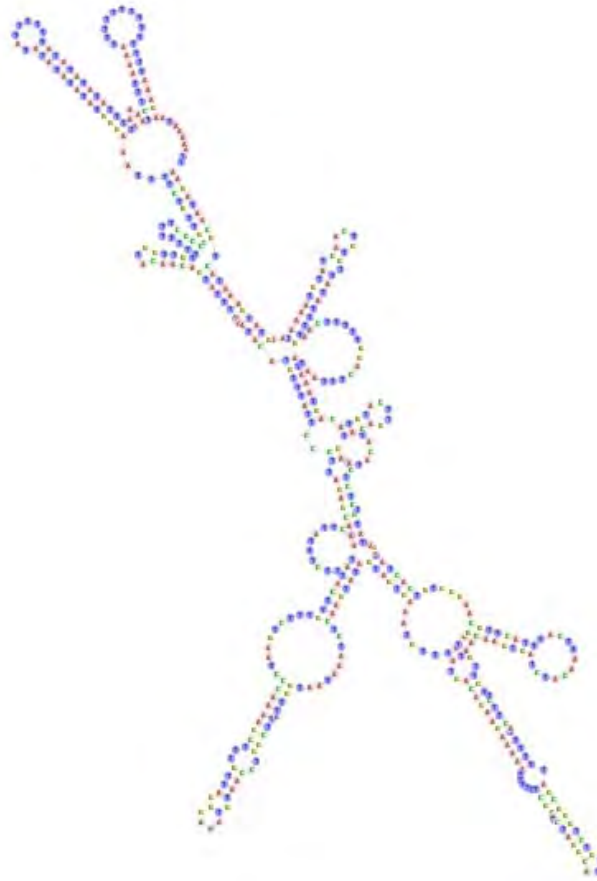
En negrilla se encuentra la única prueba que salió no significativa para un valor negativo de neutralidad.

Los resultados sugieren que los taxa de triatomino podrían haberse visto sujetos a algún proceso de selección o a una expansión demográfica. Sin embargo los graficos de mismatch, no mostrados, no presentan la distribución esperada para una expansión demografica.

9.2.2. Seudogenes

Se utilizó principalmente la estructura secundaria para determinar la presencia de pseudogenes (Figura 6). Sin embargo, hay ciertos pseudogenes que aunque no se deforman en la estructura secundaria tienen una tasa de mutación mayor que el resto de los individuos por lo que también se consideró la presencia de ramas largas en individuos, con mayores tasas de mutación. En general, todos los que fueron determinados como pseudogenes se retiraron del análisis. Solo los terminales de la especie *T. ryckmani* en la que todos presentaron una estructura secundaria sospechosa, similar a un pseudogen se dejó en el análisis. Al parecer, recuperan información filogenética similar a la que se ha encontrado con otros marcadores tanto moleculares como morfológicos, sin embargo mucho cuidado debe tomarse con respecto a la información que los mismos están proporcionando.

Figura 6. Seudogen



Estructura secundaria de un pseudogen de *Triatoma hegneri*.

9.2.3. Sitios segregantes

Tabla 5. Tabla de sitios segregantes

	SS (2)	PS(2)	SS (3)	PS(3)	SS (4)	PS(4)
ITS2	76	63	12	25	1	3
ND4	59	78	4	38	0	4

Polimorfismo observado para cada secuencia. SS = Sitios con variante de copia única (Singleton variable sites) y PS = Sitios parsimonicamente informativos (Parsimony informative Sites), en paréntesis el número de variantes para cada caso.

Este análisis se realizó para observar si podía existir saturación sugerida por la presencia de muchos sitios con más de dos variantes. La secuencia de ND4 presentó 4 sitios variables frente a 12 del ITS2, para 3 variantes únicas y ningún sitio variable

para 4 variantes únicas, mientras los ITS2 mostraron 1. De esta manera se puede asumir que la matriz de ND4 está mucho más limpia de la existencia de saturación. Sin embargo estos valores son pocos, por lo que puede descartarse el efecto de saturación que cause atracción de terminales que no tienen relación filogenética.

9.2.4. Recombinación

Tabla 6. Tabla con número de eventos de recombinación

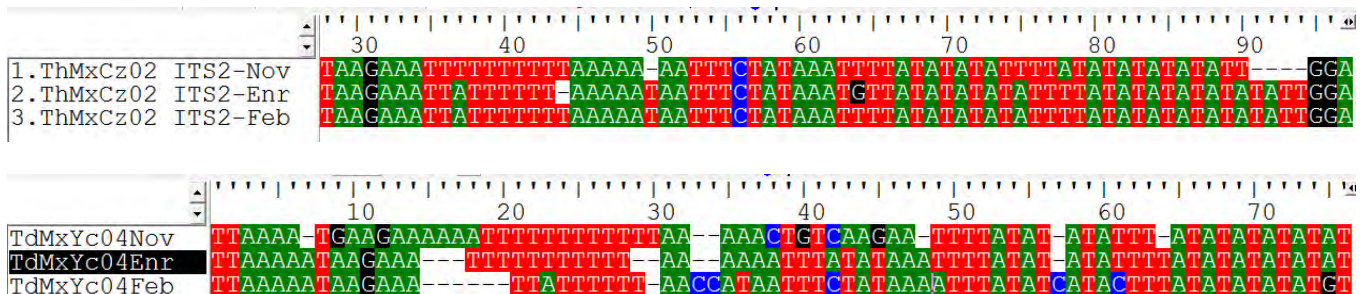
	DNAsp		RDP	
	# de pares de sitios con cuatro sitios gameticos	Rm	eventos unicos	Señal de recombinacion
ITS2	395	21	2	2
ND4	1080	32	12	3

Estos análisis fueron elaborados con dos diferentes programas. El primero en DNAsp tiende a sobreestimar los eventos de recombinación. Por eso se utilizó el segundo programa con RDP (Recombination Detection Program). Rm= Número mínimo de eventos de recombinación.

Se utilizaron dos programas debido a que con DNAsp se utiliza el cálculo de cuatro sitios gaméticos y con esto se tiende a sobreestimar los eventos recombinantes. RDP (Recombination Detection Program) es un programa que tiene análisis mucho más precisos. Aún con este análisis se encontró señal de recombinación para ND4 en una proporción mayor que ITS2.

9.2.5. Copias múltiples de genes

Figura 7. Variabilidad dentro de un mismo individuo.



Diferentes formas de la secuencia de *Triatoma hegneri* y un individuo de la península de Yucatán de *T. dimidiata* mostrando la variabilidad que puede existir para los ITS2 dentro de un individuo

Se observa en la figura 7, como dentro de un mismo individuo se encontró variabilidad genética. Las secuencias corresponden a tres diferentes amplificaciones tomadas de una misma alícuota de ADN, de un mismo individuo. Se observa que a pesar de ser el mismo individuo se encuentra variabilidad interna dentro del gen ITS2.

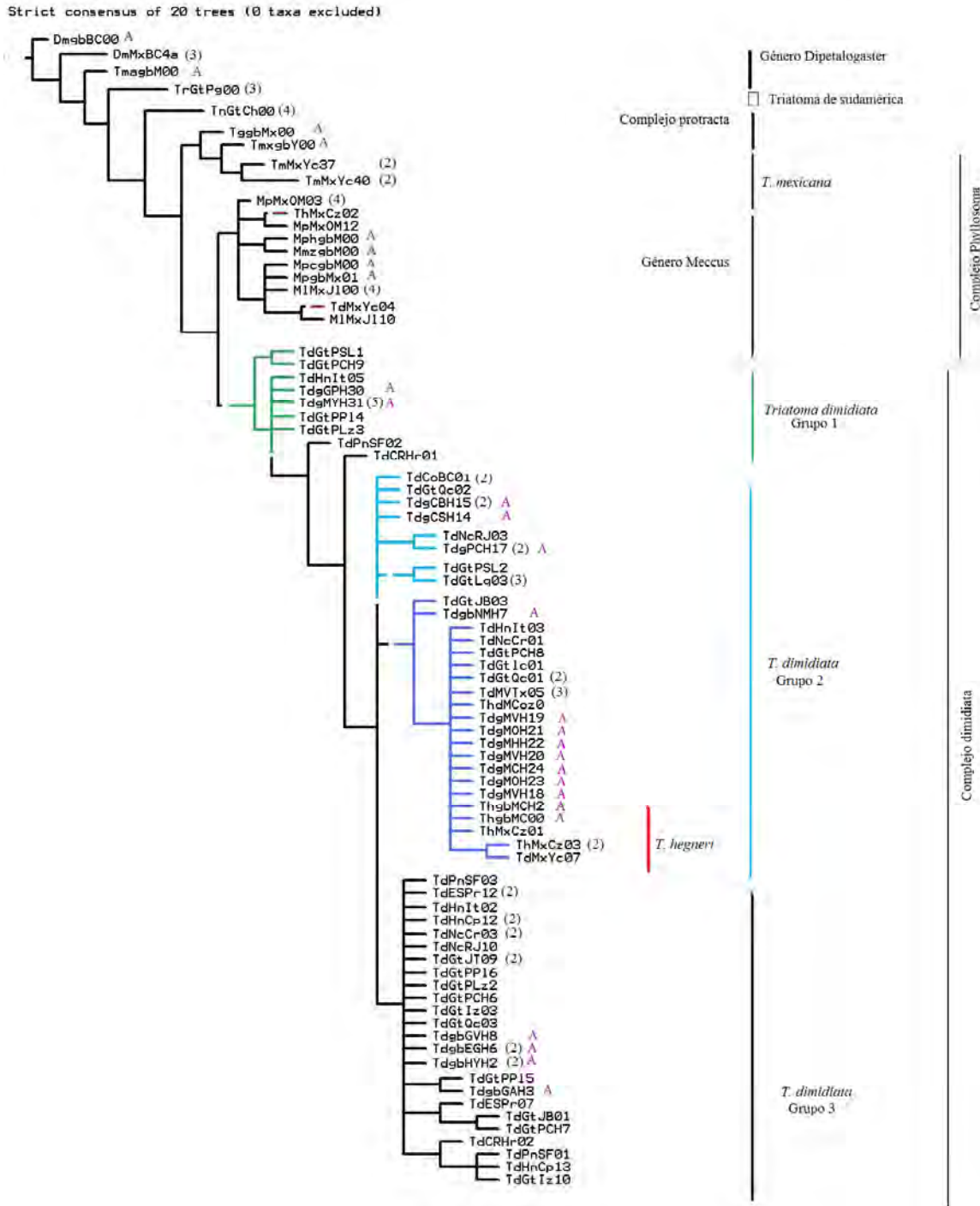
9.3. Inferencia Filogenéticas

Los árboles de distancia obtenidos con PAUP, permitieron la determinación de individuos con ramas largas y por lo tanto con tasas de mutación mucho más altas que el resto de individuos. De esta manera y por medio de la estructura secundaria se detectaron pseudogenes. Algunos de los individuos con tasas de mutación muy altas y estructuras secundarias deformadas fueron retirados del análisis. Las filogenias obtenidas tampoco eran muy diferentes de las presentadas con TNT, sin embargo, la resolución obtenida con esta técnica aún sigue siendo mejor.

El análisis de parsimonia por medio de PAUP recuperó en su mayor parte árboles muy bien resueltos. Sin embargo la longitud de los árboles, tendió a ser mayor en PAUP que en TNT, por lo cual se prefirieron las topologías obtenidas con TNT que tenían árboles con menor longitud. Asimismo, PAUP, fue el único programa que permitió la obtención de filogenias con codificación compleja de gaps. Sin embargo, la codificación de gaps demostró que bajaba el Índice de Consistencia, por lo cual se puede inferir que se está introduciendo ruido en el análisis al introducir gaps complejos, ya que quizá la mayor parte de estos no tienen realmente información filogenética. Las filogenias son muy parecidas a las obtenidas con TNT, sin embargo, este último permite una mejor observación de todos los árboles obtenidos así como una mejor observación de los mismos.

9.3.1. Inferencia Filogenética con ITS2

Figura 8. Árbol de ITS2



Árbol construido con parsimonia en TNT con codificación de microsátelites en el alineamiento pero sin codificar gaps. Los números a la par de los terminales indican que dichas ramas fueron colapsadas pues estaban integradas por individuos idénticos. A. Secuencias obtenidas por Bargues. (Ver Anexo 14.4 ver datos específicos de los taxa) La nomenclatura escogida está compuesta por 8 letras y fue designada como sigue: Las dos primeras letras corresponden al género y/o especie. Las dos letras siguientes corresponden al país. El tercer par de letras corresponden con el sitio donde se muestreo, y los últimos dos números corresponden al individuo, tal como se indica en la Tabla 1.

Estadísticos de los Árboles

Tabla 7. Estadísticos de los Árboles para ITS2

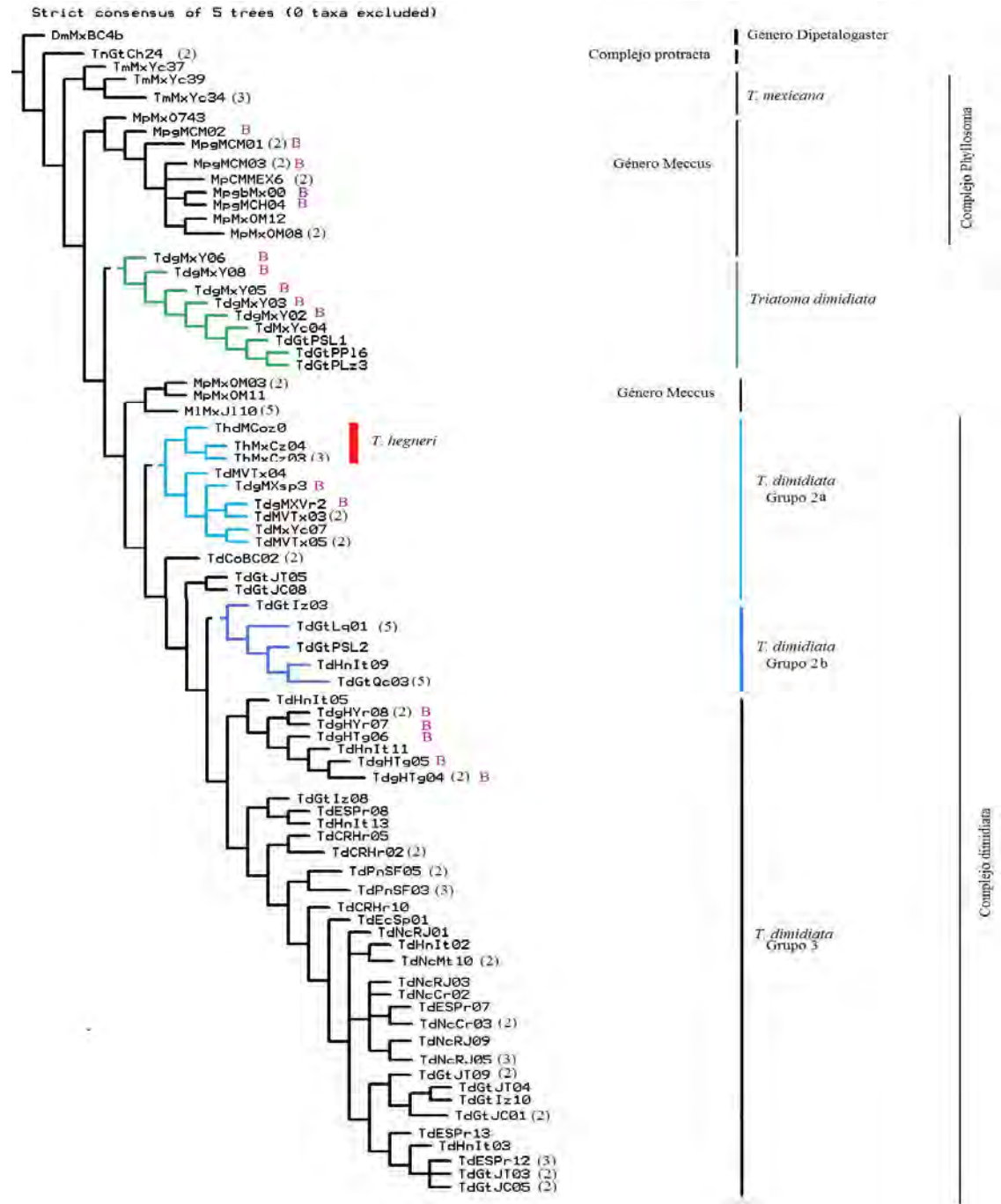
	NONA			Paup		Codifica Alineacion y gaps
	sin codificar	sin gaps	Codifica Microsat	Codifica Gaps	sin gaps	
Arboles obtenidos	524	1000	100			
Longitud	533	452	448	731	453	687
Ci	0.74	0.74	76	0.7168	0.7483	0.6754
Hi	0.26	0.26	24	0.2832	0.2517	0.3246
Ri	0.88	0.87	87	0.8836	0.8789	0.8808

Tabla conteniendo estadísticos de los árboles para ITS2 en Winclada y Paup. En esta se prueba se realiza, primero análisis con Winclada de NONA con las siguientes características: las alineaciones sin codificación de Gaps pero sin retirarlos, sin Gaps, donde solo se codifico los microsátélites en la alineación y se incluyen gaps. Luego se realizan pruebas con PAUP con las siguientes características: alineaciones con codificación de gaps, sin gaps, alineación con codificación de microsátélites y gaps.

En general puede observarse una mejor resolución para el marcador de ITS2 para grupos de especies no hermanas y géneros. Un caso que resulta interesante de analizar es una de las *T. hegneri* colectadas en Cozumel que sale muy externa junto a una *T. dimidiata* de Yucatán y el resto se une con las secuencias de esa misma especie publicadas por Bargues en el genbank, dentro de *T. dimidiata* como se observa en su trabajo (Bargues et al. 2008). Esta especie colectada en Cozumel que a simple vista es identificada como *T. dimidiata*, parece tratarse de un híbrido, debido a los patrones de coloración. Sin embargo al ser determinadas por medio de una clave taxonómica de especies de triatomíneos por Monroy, es identificada como *T. dimidiata*. Al realizársele los análisis genéticos se le encuentra unida con otras *T. dimidiata*. El grupo de la península de Yucatán y algunas de Petén se agrupan juntas en un grupo separado de *T. dimidiata*, pero dentro del complejo (Figura 8).

9.3.2. Inferencia filogenéticas ND4

Figura 9. Árbol de ND4



Árbol construido con parsimonia en TNT con codificación del alineamiento pero sin codificar gaps. Los números a la par de los terminales indican que dichas ramas fueron colapsadas pues estaban integradas por individuos idénticos. B. Secuencias proporcionadas por Harris, K.D. y Beard, C.B. (Ver Anexo 14.4 para ver datos específicos de los taxa). La nomenclatura escogida está compuesta por 8 letras y fue designada como sigue: Las dos primeras letras corresponden al género y/o especie. Las dos letras siguientes corresponden al país. El tercer par de letras corresponden con el sitio donde se muestreo, y los últimos dos números corresponden al individuo, tal como se indica en la Tabla 1

Estadísticos de los Árboles

Tabla 8. Estadísticos de los Árboles de ND4

	Winclada		Paup	
	proteina	nucleotido	proteina	nucleotido
Arboles obtenidos	1000	168		
Longitud	441	1027	442	1027
Ci	0.82	0.44	0.6493	0.4489
Hi	0.18	0.66	0.3507	0.5511
Ri	0.93	0.82	0.8605	0.8336

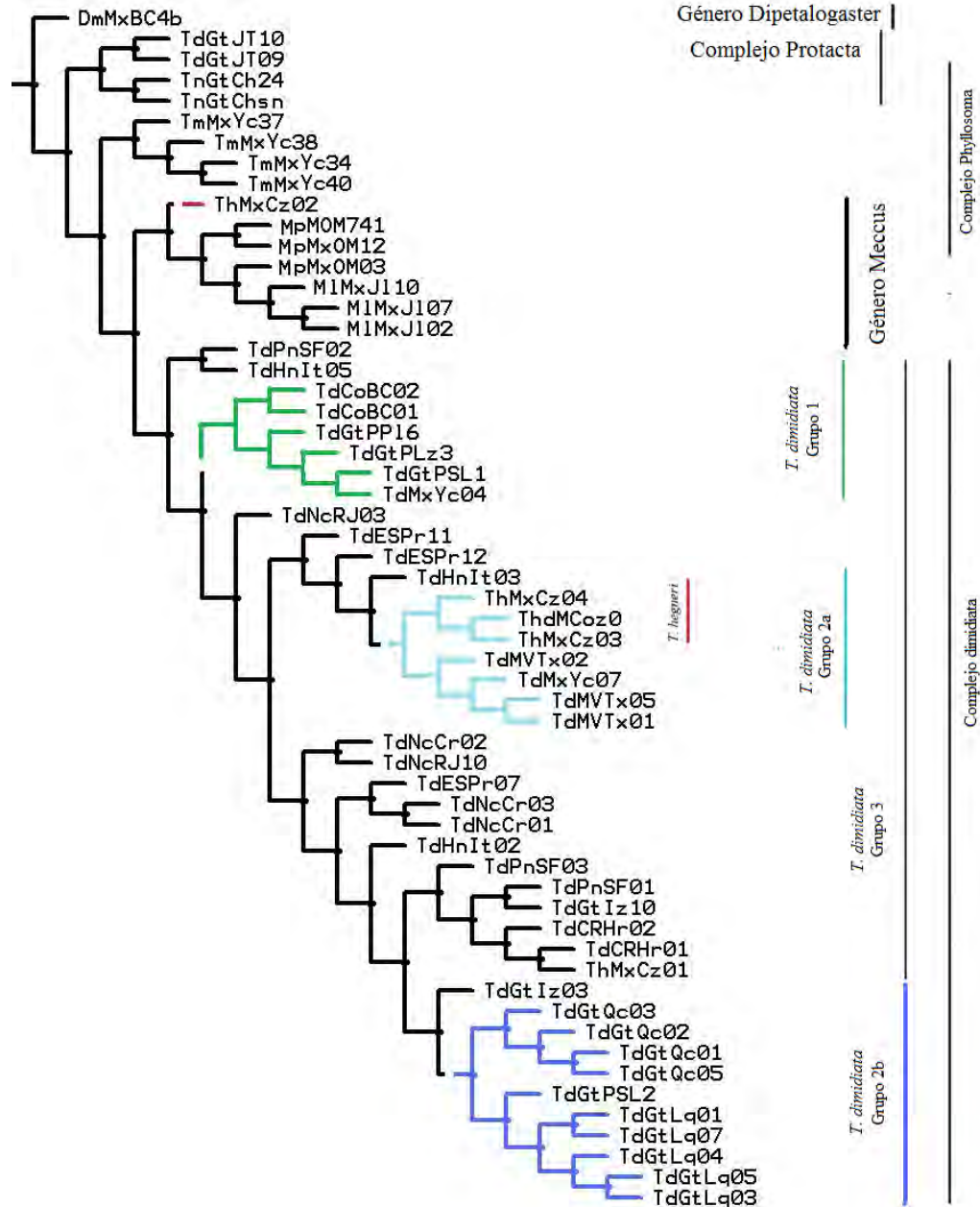
Tabla conteniendo valores de soporte para ND4 en Winclada y Paup. En este caso solo se realizaron análisis con las secuencias normales y posteriormente traducidas a proteína, para demostrar que un mayor valor de CI no significa mejor resolución.

En general para ambos marcadores por separado se puede observar una separación de una población de El Tule, Jutiapa del resto de triatominos TdGtJT05. Sin embargo para ND4 se observa también la separación de otra población de Jutiapa, Comapa TdGtJC08. Esto es importante pues podría sugerirnos cierta relación entre procesos de infectividad y la variación genética encontrada para los triatominos.

ND4 presenta una topología con mas definición en cuanto a la separación de los que se consideran ser diferentes especies para el complejo de *T. dimidiata*. Además, su mayor tasa de mutación lo hacen ideal para el estudio de especies tan cercanas como el complejo de especie de *T. dimidiata*. La mayoría de los triatominos de la península salen en un grupo externo entre *M. pallidipennis* y *T. mexicana*. Seguido se observa otro grupo de poblaciones de Colombia y Jutiapa, que están fuera de donde se esperaría encontrarseles. Inmediatamente vienen las *M. longipennis*. Después en otro grupo vienen todas las *T. hegneri* unidas a *T. dimidiata* de Lanquín y *T. dimidiata* de Quiche. Después un bloque compuesto por chinches del grupo de *T. dimidiata* sin conflicto (Figura 9).

9.3.3. Inferencia con Evidencia Combinada

Figura 10. Árbol de ITS2 y ND4



Único árbol obtenido por medio de parsimonia en TNT con codificación del alineamiento pero sin codificar gaps. Solo se observan los individuos que estaban en común para ambos marcadores. La nomenclatura escogida está compuesta por 8 letras y fue designada como sigue: Las dos primeras letras corresponden al género y/o especie. Las dos letras siguientes corresponden al país. El tercer par de letras corresponden con el sitio donde se muestreo, y los últimos dos números corresponden al individuo, tal como se indica en la Tabla 1

Estadísticos de los Árboles

Tabla 9. Estadísticos de los Árboles de Evidencia Combinada

Evidencia Total	NONA		Paup	
	sin codificación de gaps	sin codificación de gaps	Codifica gaps	
Arboles obtenidos	312			
Longitud	1124	1124	1273	
Ci	0.57	0.5552	0.5538	
Hi	0.43	0.4448	0.4462	
Ri	0.45	0.7211	0.7206	

Tabla conteniendo valores de soporte con la evidencia total en Winclada y Paup. En este caso se unieron los individuos en común para ambos marcadores. El análisis se realizó con Winclada sin codificación de gaps. Luego se realizó en PAUP sin codificación de gaps y con codificación de gaps.

En los árboles de evidencia combinada con ambos marcadores, la definición de algunos de los grupos observados por los marcadores por separado se encuentra menos marcada y cambia la posición de algunos clados. Pero esto quizá se deba a que está utilizando menor cantidad de individuos por población y especie y grupos de especie. Sin embargo, se puede observar que los individuos de Petén, Yucatán y algunas poblaciones de Colombia, se encuentran como el clado más diferenciado. Posteriormente se agrupan *T. hegneri* junto a grupos de Veracruz. En este caso el grupo tres se encuentra previo al grupo 2b. Sin embargo, la ubicación de los individuos en cada grupo se logra conservar y finalmente se observa al grupo 2b conformado por individuos de Lanquín con terminales del centro de Guatemala, de Quiché. Se observa a *T. hegneri* como grupo externo, sin embargo siempre posee relación con grupos de México, Veracruz y Colombia. (Figura 10).

9.4. Posibles híbridos.

Como se ha mencionado anteriormente, con el marcador ITS2, se observa la aparición de taxa que se observan en posiciones diferentes a la ubicación taxonómica original. Al realizar otras secuenciaciones de los mismos individuos se ha encontrado que los mismos poseían copias variables del segmento. Tal es el caso de *T. hegneri* de Cozumel -Thmxcz02- y *T. dimidiata* de Yucatán - TdMxYc04- (figura 8). Esto puede estar sugiriendo la presencia de posibles híbridos. Sin embargo no debe descartarse la posibilidad de copias múltiples no homogenizadas.

9.5. Inferencias filogenéticas y Definición de Especie

Según la definición de especie considerada en el presente trabajo, y los grupos observados para ambos marcadores, puede mencionarse de la existencia de por lo menos cuatro grupos que pueden ser considerados como especies diferentes. Estos son:

Grupo 1: Individuos de Yucatán y Petén.

Grupo 2a: Individuos de Veracruz, Colombia y *T. hegneri*.

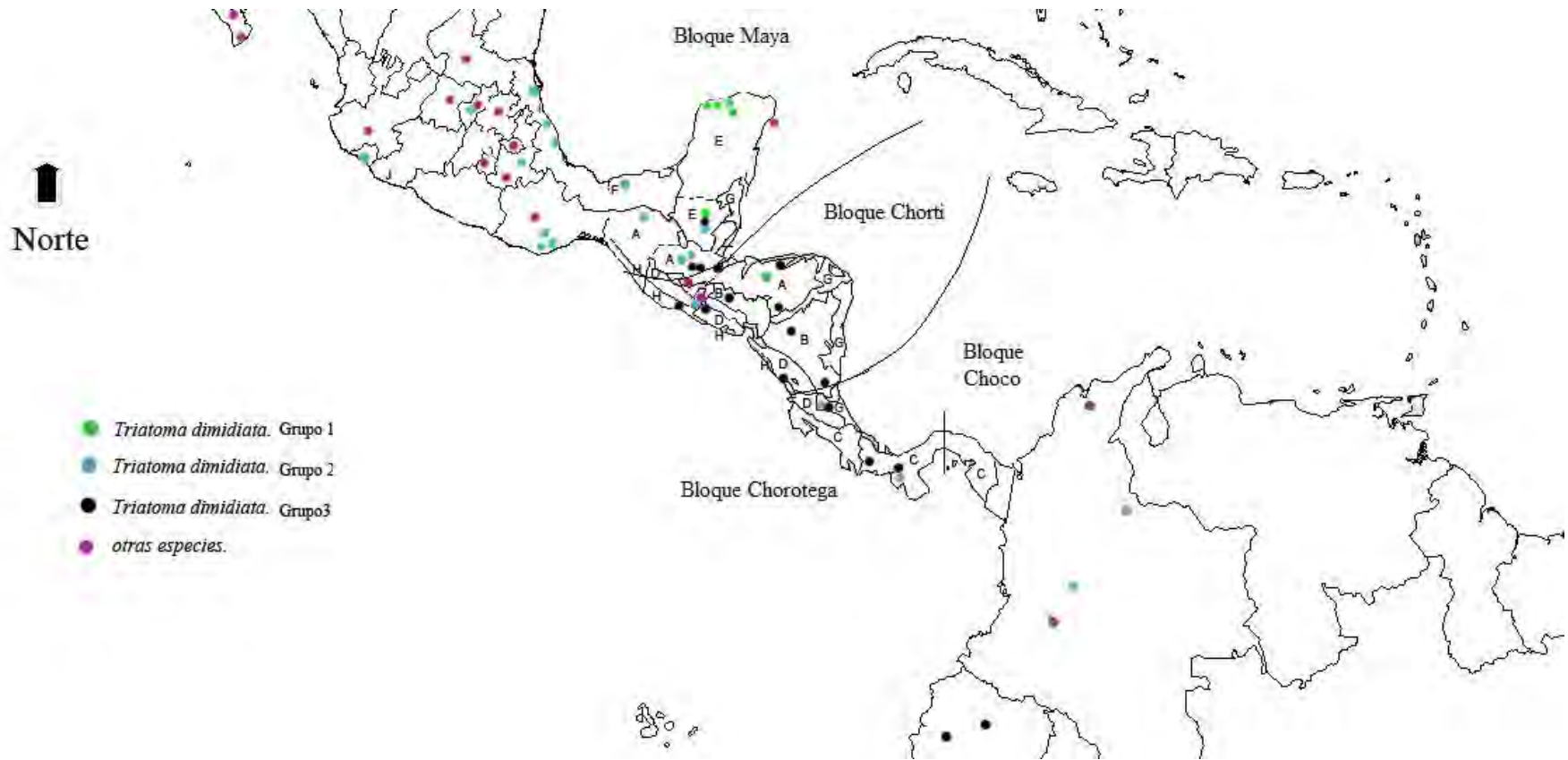
Grupo 2b: Posible grupo de individuos intermedios. Lanquín, Honduras, Quiche.

Grupo 3: Resto de Centroamérica.

9.6. Correlación de asociación de taxa en un mapa de unidades morfotectónicas

No se realizó un análisis más preciso ya que simplemente se quería verificar si existía alguna asociación de los grupos en base a unidades morfotectónicas para cada marcador. Sin embargo a simple vista se puede observar que no existe ninguna relación con ningún marcador para ninguna unidad morfotectónicas, ni para los bloques geológicos presentes en Centro América

Figura 11. Mapa con la ubicación de las poblaciones de *T. dimidiata*.



Se observa la posición de las diferentes taxa utilizadas, los colores indican los grupos en los cuales se agruparon en la inferencia filogenética. Unidades morfotectónicas: A. Sierras de Norteamérica central. B. Sierras y Cadenas volcánicas. C. Sistema Montañoso del Sur de América central. D. Cadena Volcánica del Pacífico y Depresión de Nicaragua. E. Tierras Bajas del Petén y Península de Yucatán. F. Planicie costera del Golfo de México. G. Planicie Costera del Caribe. H. Planicie Costera del Pacífico.

9.7. Comparación de Estudios de Poblaciones de *T. dimidiata*

Aspecto	(Bargues, 2008)	(Dorn, marzo 2009)	(Landaverde, 2009)
Utiliza ITS2	Sí	Sí	Sí
Utiliza otro marcador mitocondrial.	No	Sí CytB	Sí ND4
Unidades o taxa usadas para ITS2	64 para un total de 137 triatominos y 13 especies	29 para un total de 53 triatominos para ITS2 para dos especies.	32 para un total de 117 triatominos de 9 especies. (más individuos por unidad de muestreo)
Unidades o taxa usadas para ND4	-----	12 para un total de 24 triatominos para ND4 para dos especies.	22 para un total de 115 triatominos de 8 especies (más individuos por unidad de muestreo)
Grupo externo	<i>T. hegneri</i> especie hermana. Doce especies más de Triatominos de toda Latinoamérica.	<i>T. pallidipenis</i> . (<i>M. pallidipennis</i>)	<i>T. hegneri</i> especie hermana. Seis especies más, solo de la región mesoamericana.
Análisis filogenético	ML	MP con PAUP ML Análisis bayesianos	MP con TNT Distancia
Análisis filogeográfico	median joining network	median joining network	-----
Grupos formados en ITS2	4	4	4
Grupos formados en ND4	----	3	4 con mayor resolución.
Tamaño secuencia ITS2	497	499	546
Alineación	<i>Clustal-W</i>	Clustal W	A mano en base a estructura secundaria y se probó codificación de gaps y de motivos según Ochoterena (Ochoterena 2009)
MICROSAT	((AT)5TTT(AT)7)	((AT)5TTT(AT)7)69% (AT)4TTT(AT)5-6	((AT)5TTT(AT)7)69.23% (AT)3-5 TTT3-5(AT)5-7
AT%	75.25-76.85	75-76%	76.20%
Se observa posible hibridación o copias múltiples no homogenizadas	Hace mención teóricamente de híbridos logrados entre <i>T. hegneri</i> . (RE Ryckman, unpublished)	Dorn lo menciona para un individuo de Veracruz, Nuevo Haplotipo H34, sin embargo no da ninguna conclusión sobre él.	Sí entre individuos de <i>T. hegneri</i> y <i>T. dimidiata</i> . Se debe verificar que no se trate en realidad de paralogía debida a copias múltiples no homogenizadas, ITS2 no sirve para esta verificación.

Estatus taxonómico T. hegneri	Menciona que tres mutaciones de diferencia entre haplotipos con <i>T. d. Maculipennis</i> , no soporta su estatus como especie independiente. Th18 y Th28 presentes en isla.	-----	Debe ponerse bajo análisis su identidad taxonómica por medio de un mejor muestreo, otros marcadores y datos morfológicos. Pocos nucleótidos de diferencia entre <i>T. hegneri</i> y <i>T. dimidiata</i> . De 5 a 7 diferencias, 0.9615-1.35%.
Separacion de lanquin	Sí	Sí	Se une a San Luís Petén cueva, secuencias idénticas, mismo haplotipos H10. (89.5 Km) diferencia de uno o dos nucleótidos 0.3846%.
Taxa de península de Yucatán	Por lo menos dos una unida a <i>T. hegneri</i> es <i>T. d. Maculipennis</i> y otra de poblaciones de Petén y Yucatán <i>T.sp aff dimidiata</i> .	Por lo menos dos una unida a <i>T. hegneri</i> es <i>T. d. Maculipennis</i> y otra de poblaciones de Petén y Yucatán <i>T.sp aff dimidiata</i> .	Por lo menos dos una unida a <i>T. hegneri</i> es <i>T. d. Maculipennis</i> y otra de poblaciones de Petén y Yucatán <i>T.sp aff dimidiata</i> . Tres si se demuestra que <i>T. hegneri</i> es una especie independiente, necesario mas muestreo.
Taxa isla Cozumel	<i>T. hegneri</i> mas no hace mención si fenotipos son diferentes	-----	<i>T. hegneri</i> , por lo menos dos diferentes fenotipos
Recombinacion para marcador mitocondrial	-----	No reportado	si observado
Calidad de la matriz	No reportado	No reportado	Menos cantidad de sitios segregantes para ND4 que para ITS2 lo que significa que hay menos riesgo de homoplasia en ND4 a pesar de la recombinación.
Haplotipos observados para ITS2	31	39	51
Haplotipos observados para ND4	-----	No especifica	85

10.DISCUSIÓN

10.1. Composición nucleotídica

10.1.1. ITS2

El sesgo nucleotídico es similar al encontrado en otros estudios AT=76.0%, (Bargues et al. 2008). Mientras que el tamaño de la secuencia final es ligeramente superior al reportado por la misma autora ya que en este trabajo llega a ser de 546 nucleótidos (Tabla 2). De igual forma se observa la presencia del microsatélites (AT) 4-5 TTT (AT) 5-7 en las posiciones 53 A 82, sin embargo existen otros microsatélites no tan elaborados también presentes en la secuencia en posiciones 283 y 289, microsatélites (GAA)2 AAA3-6 (T)6-8. Posición 290 a 302 (T) 5-8. (T) 2-3 380 a 382. Posición 397 (T) 4-10 (ATT)1-2 (AT)2. Posición 484, microsatélites TTTTTTTT (TA)2-4 TTT, entre otros.

En este punto es importante señalar que el mayor tamaño de la secuencia observada en este alineamiento puede deberse a un alineamiento de algunos microsatélites de forma diferente a los reportados por (Bargues et al. 2008), sin embargo esto no puede concluirse debido a que no se posee la matriz elaborada por esa autora. La alineación elaborada en el presente trabajo se observa en el anexo 14.6.

10.1.2. ND4

La composición nucleotídica encontrada para estas especies en ND4 es algo similar a la encontrada para un marcador muy cercano -ND1- en donde el porcentaje de AT era del 68% (Bargues et al. 2008), en este trabajo se observa para ND4 de 74% para AT (Tabla 3). De hecho el sesgo hacia AT incluso llega a ser 1% menor al ser comparado con el encontrado en todas las secuencias de ITS2. De esta forma se observa que al menos en cuanto sesgo nucleotídico estos dos marcadores de diferente origen, uno nuclear y otro mitocondrial, no son muy diferentes y por lo tanto no presentan barreras en cuanto a la disminución o una tasa diferente de transiciones y transversiones dentro de cada marcador más que el que presenta cada marcador.

La mayor cantidad de mutaciones se encuentran en la 3ra posición del codón, sin embargo existen en otras posiciones, lo que aparentemente provoca que el cambio del codón no sea silencioso. Sin embargo, no se pueden adelantar hipótesis sobre la existencia de cambios no silenciosos, pues Abascal et. al., (2006b) reportó que para esta especie existen cambios en el código genético de ciertos codones que dan origen a

mismos aminoácidos con codones diferentes (anexo 14.5). Existen cambios específicos como por ejemplo el cambio de Valina por Alanina en la posición 34 del alineamiento con aminoácidos (238 del cambio de nucleótidos), lo cual se debe a un cambio en la segunda posición dentro del codón. Este cambio que tiene mayor grado de aparición en el complejo triatoma podría ser uno de los factores determinantes que causa la separación de dicho complejo.

Otro punto importante de señalar es que estos aminoácidos podrían estar sujetos a presión de selección por lo cual podrían ser buenos indicadores de relación de los individuos con alguna presión selectiva de capacidad de infección con *T. cruzi*, de invasión a domicilio o de resistencia a insecticida, como ha sido observado recientemente para el insecto vector de la malaria *Anopheles gambiae* (Mylène Weill et al. 2008).

Estos fenómenos han sido observados de forma diferencial en diversos grupos de *T. dimidiata*, en donde existen vectores con mayor presencia domiciliar como poblaciones de Jutiapa en Guatemala y de Matagalpa en Nicaragua, otras con mayor presencia solo en bosque sin invadir el domicilio como poblaciones en Petén y Quiché en Guatemala (Dorn et al. 2007), y otras con gradientes como en la península de Yucatán en México (Dumonteil et al. 2002). Por lo cual un análisis más detallado de estos cambios en los codones del ADN mitocondrial debería ser realizado, pues no sólo nos indican una diferenciación en cuanto a sus relaciones filogenéticas sino también los agentes que han podido influir en esta separación filogenética, información que en este caso serían de mucha utilidad para el control del vector. Sin embargo, los alcances de este estudio escapan a la realización de estos estudios, por lo cual podrían recomendarse para estudios más detallados.

10.2. Inferencia filogenética

10.2.1. Topologías obtenidas con ITS2

Aunque se observan algunos individuos con ramas un poco más largas que el resto, éstos no presen posiciones anormales o diferentes a los demás miembros del grupo al cual pertenecen por lo cual puede asumirse que la mayor tasa de variación que estos individuos presentan en relación con los demás no está afectando su asociación en las topologías y que puede deberse a variación interna de dicho individuo.

Sin embargo, aunque la topología de los árboles elaborados con las diferentes técnicas, puede variar levemente. Al hacer una comparación exhaustiva de los

diferentes métodos de análisis (neighbor-joining, parsimonia) se observa que la aparición de los taxa en los clados es constante de uno a otro análisis y las topologías se repiten. Los árboles mas resueltos como se menciona en resultados fueron los obtenidos con TNT.

Lo que se observa a grandes rasgos en todas las técnicas de análisis es que *T. hegneri* tiende a separarse en dos grupos uno constituido por un individuo que se ubica en el grupo externo junto a otra *T. dimidiata* de Yucatán. El resto de *T. hegneri* se unen al grupo dentro de *T. dimidiata* como se observa en el trabajo de (Bargues et al. 2008). Esto nos puede estar indicando que *T. hegneri* es una especie con altos índices de individuos híbridos que quizá poseen mayor movilidad o están en mayor porcentaje al ser los más obtenidos en estos análisis, más adelante se discutirá específicamente sobre este tema. La especie colectada en Cozumel considerada híbrido de *T. dimidiata* y que sale unida a las esta especie podría ser una muestra de la existencia de hibridación. Cabe mencionar que la mayoría de los individuos que se obtuvieron muertos eran ninfas, aunque para la amplificación se utilizaron en mayor cantidad de adultos, obtenidos de otras colectas. Los adultos obtenidos fueron identificados por Monroy, sin embargo con las ninfas solo se asumió que al encontrarse en nidos de *T. hegneri* correspondían a la misma especie. Se observa en el árbol filogenético construido para ITS2 (figura 5) que la mayoría de los individuos de *T. hegneri* se asociaban con el supuesto híbrido. Esto sugiere que es probable que algunas de las ninfas encontradas puedan poseer no solo información genética similar sino también una morfología, sin embargo un estudio donde puedan tenerse familias de estos triatomos es recomendable.

Muestras posteriores sin embargo sugieren que quizás no se trate de un proceso de hibridación entre especies diferentes, sino, de una mala definición desde el inicio, de las especies en la península de Yucatán, causado quizá por un muestreo deficiente. Esto parece ser sugerido pues al muestrear adultos se pudo observar un gran número de aparentes *T. dimidiata* conviviendo en el mismo nicho que las *T. hegneri* sin presentar ningún tipo de competencia (Monroy, Com pers) y a la similitud genética que poseen estos dos con las chinches de Veracruz en México. De esta manera, podría estarse observando que *T. hegneri* es una especie que presenta mucha plasticidad y que el color y otras características usadas para diferenciarla de las aparentes *T. dimidiata* en realidad son caracteres homoplásticos. En estudios anteriores realizados con ITS2 en la península de Yucatán, principalmente en Campeche se han encontrado diferencias en las

poblaciones de triatomos procedentes de bosque tropical y de distribución costera (Tamay-Segovia et al. 2008). Esta diferenciación a nivel molecular encontrada en individuos de la península y la observación de la variación morfológica versus variación molecular encontrada para *T. hegneri* en Cozumel, podría estarnos sugiriendo que es necesaria una revisión de la identidad taxonómica de *T. hegneri* junto a estos taxa o la existencia de mucho polimorfismo por parte de *T. dimidiata* en la península de Yucatán.

Se puede observar un grupo formado por varios individuos de *T. dimidiata* de la península de Yucatán, compuesto por algunos individuos de Petén y de Yucatán. Este grupo incluso llega a observarse con ND4 muy diferenciado y separado por el grupo *Meccus* lo cual podría demostrar que las poblaciones de Yucatán y Petén son en realidad otra especie con reciente separación.

Por otro lado, los individuos obtenidos de Lanquín no se separaron del grupo considerado como *T. dimidiata*. El grupo al cual están unidas compuesto por individuos de cueva de San Luis, Petén en Guatemala, sugiera que algún tipo de migración existe entre los triatomos de las cuevas de esa región. Veracruz también aparece unido al grupo de Lanquín y se observa como un grupo diferenciado ya que en su base tiene a *T. hegneri* que se encuentra separando a *T. dimidiata* prácticamente en dos grupos. El grupo en el cual está incluido *T. hegneri* a su vez puede estar separado en dos grupos el primero anteriormente mencionado, formado por poblaciones de *T. dimidiata* de Petén y Yucatán y el segundo por una mezcla de poblaciones del centro norte, Quiché, y las otras poblaciones de México entre las cuales está incluida Lanquín.

Algo que llama la atención es la observación de diversas poblaciones de toda Centroamérica, tanto de Jutiapa como Honduras, Nicaragua y Costa Rica que tienden a aparecer mezcladas con los grupos anteriores mientras el resto de individuos de las mismas poblaciones conservan una posición en el tercer grupo de poblaciones del resto de Centroamérica. Esto podría ser un indicativo de que el marcador molecular utilizado no es útil para la diferenciación intraespecífica ya que aunque recupera una filogenia muy clara para los grupos externos, a nivel Intraspecies o de especie muy cercana no logra separar a los grupos.

Principalmente en este punto es necesario enfatizar que este marcador demostró por medio del análisis del alineamiento y de sus índices de consistencia que contrario a lo que Bargues (2008) señala, posiblemente no sea un buen marcador para el análisis de relaciones filogenéticas en triatomos a nivel intraespecie. Por otro lado es posible que

la definición de motivos a codificar aún necesite mayor trabajo y que se deber hacer una revisión más detallada de lo mismo.

ITS2 es un marcador que ha demostrado poseer problemas de paralogía principalmente en plantas (Gernandt et al. 2001, Ochieng et al. 2007). Sin embargo, diversos autores lo señalan como un buen marcador para estudios en insectos, en especial para estudios filogenéticos (Bargues et al. 2000, Young y Coleman 2004, Coleman 2007).

En el presente trabajo se ha observado paralogía. Para determinar si se trata en efecto del problema señalado en diversas investigaciones en plantas pero aún no detectado en insectos, se consideraron los diversos aspectos que pueden causar la paralogía:

- × Hibridización.
- × Mal alineamiento.
- × Mal secuenciación.
- × Muestreo incompleto.
- × Efecto de selección.
- × Seudogenes
- × Copias múltiples de genes que no han completado su evolución concertada.
- × Homoplasia
- × Recombinación

Estos aspectos serán analizados uno a uno más adelante, por ahora se sigue con el resto de resultados observados.

10.2.2. Topologías obtenidas con ND4

ND4 presenta mucho menos problema en la topología observada. Esto se debe a que sin importar la técnica y programa que se utilice, la topología tiende a ser prácticamente la misma de una herramienta de análisis a la otra. Al realizar un análisis de distancia con PAUP se pudo observar las ramas del árbol se pudo encontrar que individuos con ramas largas no existían y en realidad la tasa de mutación de todos los individuos es casi similar. De esta manera puede descartarse el efecto de saturación y la posible existencia de pseudogenes o copias nucleares del ADN mitocondrial.

Se observa que la topología es mucho más clara en la separación de los grupos que se consideran como diferente especie en *T. dimidiata* (figura 8). El primer grupo que ha sido nombrado como grupo 1 compuesto por las poblaciones de Petén y Yucatán

se encuentra separado y unido al grupo del género *Meccus*. El segundo grupo está formado por poblaciones principalmente del resto de México y *T. hegneri*, a la cual esta última se encuentra fuertemente unida. En este marcador a diferencia de ND4 no se logra separar un cuarto grupo conformado por terminales de Lanquín. El tercer grupo al que llamaremos, grupo 2a, se encuentra formado por una mezcla de poblaciones de Lanquín, Jutiapa, Colombia y Quiche que representan el centro de América Central.

Mas-Coma y Bargues, (2009) reporta que las altas tasas de variación dentro del ADN mitocondrial hacen que se observen grupos monofiléticos mucho más rápido y evidentes que con marcadores nucleares, por lo cual es ideal para el estudio de especies hermanas o de grupos en conflicto como los complejos de especie (Mas-Coma y Bargues 2009).

La observación de la separación de los triatominos de la península tal como se observan en las figuras 5 y 6 nos sugiere que tal como se ha indicado por medio de otros estudios tanto fenéticos como genéticos {Marcilla, 2001 #686; Schofield, 2000 #329; Bustamante, 2004 #442; Calderón, 2004 #821; Fernández, 2005 #450; Panzera, 2006 #496} existen básicamente tres especies dentro del complejo *T. dimidiata* el primero conformado por los individuos de la península de Yucatán: Yucatán, Quintana Roo y Petén. El segundo conformado por individuos de Lanquín que aparentemente tienen cierta correlación con individuos silvestres de Quiche. Y el tercero conformado por el grupo de *T. dimidiata* que abarca desde México hasta Panamá y Ecuador. En este caso Ecuador se une a poblaciones de la región mesoamericana, tal como había sido reportado en otros estudios (Solís-Mena 2000, Solís-Mena et al. 2000) en este estudio se observan unidas a poblaciones de Nicaragua.

Por otro lado, se observa un grupo de poblaciones conformado por Colombia y algunas poblaciones de Jutiapa (un individuo de Comapa y un individuo de El Tule) en Guatemala. Esta es la primera vez que se observa esta separación para las poblaciones colombianas y las de Jutiapa, por lo cual debe tomarse con cuidado. Al parecer podría haber cierta relación en el grado de domiciliación y la separación de estos dos grupos ya que las poblaciones de Jutiapa, tienden a mostrar altos índices de invasión en la vivienda y Colombia posee exclusivamente individuos domiciliados. La observación de este grupo podría mostrar una característica, que indica que el marcador podría ser útil en los estudios del grado de invasión de los vectores al domicilio. Tal como ha sido observado para *Anopheles gambiae* donde se encontró una relación entre un cambio

silencioso en el código y su aumento a la resistencia a insecticidas (Mylène Weill et al. 2008).

Como se mencionó anteriormente, sería interesante hacer una mejor revisión del código genético de cada grupo y como este puede o no estar relacionado con algún grado de infectividad, de invasión al domicilio o resistencia al domicilio.

Por otro lado, en la tabla 8 se observa como el índice de consistencia es mucho más bajo que el observado para el marcador nuclear de ITS2 (CI=0.45). Este índice se ve aumentado al realizar el análisis solo para proteínas (CI=65-82). Sin embargo, la resolución en los árboles es débil, pues se observa un árbol con dos clados sin definición taxonómica al realizarse con proteínas. A pesar de lo señalado por algunos autores (Chung-Ping y Danforth 2004, Mas-Coma y Bargues 2009) sobre la deficiencia del ADN mitocondrial de presentar menores índices de consistencia al compararse con ADN nuclear, es precisamente su alta tasa de variación la que lo hace eficiente para el estudio del complejo de especie de *T. dimidiata* y lo que le da una resolución más clara a la topología observada quizás resultado de la variación en la evolución paralela del código genético que se observa en diversos invertebrados entre ellos *T. dimidiata* tal como lo señala Abascal et. al., (2006).

10.2.3. Topologías obtenidas con Evidencia Combinada

Como se esperaba el árbol resultado de la unión de ambos marcadores, recupera mucho de la información de ambos (figura 10). En cuanto a los estadísticos de árboles, debe mencionarse que estos también quedan en un punto intermedio tal como se observa en la tabla 9.

De esta manera se observa el grupo de las poblaciones de Petén y Yucatán separado del resto de poblaciones de *T. dimidiata* teniendo como separación al género *Meccus*, tal como fue observado en las topologías por separado. Sin embargo al unir ambos marcadores puede observarse una mayor asociación de *T. mexicana* con dicho grupo. Esta unión de *T. mexicana* con las poblaciones de la península, principalmente de la Petén ya había sido observada con análisis de genitalia (Van-Tuylen 2007). Se debe agregar que a este grupo también se haya unido la población de Lanquín, separándose de esta forma del resto de poblaciones de *T. dimidiata*. Esto marca una diferencia de la asociación de esta población con los marcadores por separado, donde

aunque se le encontraba en un grupo que se observaba diferenciado, aún era parte del grupo de *T. dimidiata*.

Sin embargo, en otros estudios tanto de morfometría de alas y cabezas como de morfometría de huevos se ha encontrado que Lanquín se diferencia del resto de poblaciones de *T. dimidiata* y tiende a asociarse con el género *Meccus* (Van-Tuylen 2007, Díaz Morales 2008).

De esta forma se puede concluir que la separación de las poblaciones de *T. dimidiata* de Yucatán (taxa de Petén y Yucatán) como diferenciada es una señal filogenética fuerte que nos indica que en efecto se trata de otra especie.

En general se puede señalar que la información genética está indicando que existen individuos híbridos en *T. hegneri* tal como lo señala el ITS2. Sin embargo, la falta de corroboración de esta separación en ND4 y su separación del grupo de *T. dimidiata* también nos podría estar indicando que se debe a la presencia de copias múltiples en ITS2 que no han alcanzado a homogeneizarse, como ya ha sido señalado por otros autores (Liston 1999) y contrario a lo que señala Mas-Coma y Bargues, (2009).

Sin importar el estatus que presente *T. hegneri* se observa de forma clara la separación de las poblaciones de Yucatán y Petén como otra especie, lo cual se corrobora con ambos marcadores y se recupera en la evidencia total. Ahora bien la identidad del grupo al cual pertenece esta nueva especie está aún por comprobarse, porque al parecer al reunir la evidencia de ambos marcadores se encuentra muy relacionado con *T. mexicana* que a su vez se encuentra cercanamente relacionada con el grupo *Protracta*, lo cual es corroborado por análisis de morfometría de huevos y genitalia (Van-Tuylen 2007, Díaz Morales 2008). Sin embargo, al observar los marcadores por separado, se ve unido al género *Meccus*. De esta forma sería interesante poder agregar los valores de otros análisis para observar como el total de información influencia la filogenia de estas especies.

10.3. Híbridos.

Como se ha mencionado anteriormente, se observa la aparición de individuos que se ubican en posiciones diferentes a las esperadas, es decir en grupos intermedios o fuera de ellos, tal es el caso de *T. hegneri* de Cozumel 2 -Thmxcz02- y *T. dimidiata* de Yucatán 4 - TdMxYc04- (figura 5 y 9). Además de observarse también la presencia de copias variables de la secuencia de ITS2 dentro de los individuos. Esto puede estar sugiriendo la presencia de posibles híbridos. Esto es particularmente visible para ITS2, sin embargo la naturaleza

de las copias que conforman los ITS y los antecedentes que posee sobre la existencia de copias múltiples muy variables entre sí debido a la falta de una evolución concertada, no permite tener mayor certeza que se trate en realidad de la presencia de híbridos. Muchos autores han reportado la presencia de híbridos en miembros del grupo phyllosoma (Martínez et al. 2006) y más recientemente dentro del complejo de especie de *T. dimidiata* (Monroy com. pers). Por lo cual podría considerarse que esta variación encontrada en los individuos y su ubicación diferente, se debe a la hibridación. Sin embargo para poder confirmar estos datos es necesario el uso de otros marcadores moleculares sin problemas de copias múltiples.

10.4. Inferencias filogenéticas y Definición de Especie

Que cada grupo es nueva especies pues están bajo presiones de selección diferentes y forman grupos que se aíslan con reticulaciones internas.

Grupo 1: Individuos de Yucatán y Petén.

Grupo 2a: Individuos de Veracruz, Colombia y *T. hegneri*.

Grupo 2b: Posible grupo de individuos intermedios. Lanquín, Honduras, Quiche.

Grupo 3: Resto de Centroamérica.

De lo anteriormente mencionado, se pueden tener algunas conclusiones. Una de ellas es que el grupo formado por el grupo 1 ya puede ser determinado como una especie diferente, ya que hay suficiente evidencia tanto morfológica como molecular para separarlo como una especie diferente. Bargues et. al., (2008) incluso la nombra ya como *T. sp. aff. dimidiata*. El nombre que esta nueva especie reciba deber ser analizado pues según el marcador de ND4 incluso llega a encontrarse dentro de otro género diferente al de *Triatoma*, pudiéndose encontrar con los miembros de *Meccus*. De esta forma esta especie podría ser nombrada como *Meccus dimidiata* y ser contemplada dentro del complejo phyllosoma.

Por otro lado los individuos del grupo 2 también se diferencian del complejo de especie de *T. dimidiata*, pero en este caso, la inclusión de la especie hermana de *T. hegneri*, despierta atención en cuanto a que una revisión más detallada de la identidad taxonómica de esta especie debe realizarse. Para ello, no solo un mejor muestreo es necesario, sino también la búsqueda de mejores marcadores. De esta forma, este grupo que se separa en otro conformado por taxa de Lanquín y el resto

de Centroamérica, para los cuales aun no es muy clara la separación fuera de este grupo, podría aplicarse el nombre de *T. maculipennis*. Sin embargo es posible que en realidad surjan más de dos especies de este grupo que depende en buena manera de un mejor muestreo.

El tercer grupo conformado por individuos del resto de Centroamérica, podrían corresponder a los verdaderos *T. dimidiata* o dependiendo de las respuestas que se den en un mejor muestreo para resolver al grupo anterior, este grupo podría surgir como *T. capitata*.

10.5. Estadísticos de la matrices

Regresando a los problemas encontrados para ITS2 que se habían mencionado en dicha sección y se habían dejado para ser discutidos posteriormente, vemos que algunos de esas posibles causas solo se pueden descartar al analizar algunos datos en la matriz.

El primer factor mencionado que podría estar provocando la paralogía observada es la hibridación. Descartar este factor es un poco difícil, sin embargo, el hecho de que aunque se hayan encontrado organismos con características intermedias entre *T. dimidiata* y *T. hegneri* el hecho de que la observación de individuos en posiciones no esperadas no se haya recuperado en ND4 no permite apoyar la existencia de hibridación. Diversos híbridos se han reportado para otras especies de triatomos, por lo cual la posibilidad de que se esté observando la hibridación de *T. hegneri* y *T. dimidiata* no se debe descartar (*Paz María Salazar com pers*). Más estudios son necesarios para indicar si se observa la influencia de hibridación.

Como se mencionó en el inciso de alineamiento, este fue puesto a evaluación por medio del uso de la estructura secundaria obteniendo mejores resultados en la resolución de la filogenia. Sin embargo, la observación de individuos en posiciones que sugieren paralogía, sigue presente. De esta forma se puede descartarse una mala alineación como causante.

10.5.1. Efecto de selección

La tabla 4 muestra los valores de diversos test para probar la neutralidad de las matrices. En ellas se puede observar que al contemplar el total de los individuos para ambas matrices existe una significancia negativa para los test lo que puede estar indicando que más que el efecto de selección se está observando un evento de expansión demográfica para los grupos. Sin embargo, para asegurar esto último sería necesario

realizar análisis con más loci. Más específicamente al realizar la prueba solo para los taxa donde se encuentra el individuo que presenta una posición no esperada (es decir los individuos de *T. hegneri* y *T. dimidiata* de Yucatán), se observó que no presentaba un valor significativo, por lo cual el efecto de selección sobre dicha área puede ser descartado. De esta forma los datos estarían sugiriendo que estos individuos pueden ser considerados como copias de genes múltiples sin homogenizar que han perdido su función y por tal razón no se encuentran sujetos a ningún tipo de selección, mientras el resto de los individuos si la presentan.

10.5.2. Seudogenes

Como se mencionó también en el inciso de alineación, se pudo detectar la presencia de Seudogenes (figura 6). No obstante al analizar su presencia en el árbol de ITS2 se comprobó que algunos de estos lograban recuperar la filogenia por lo cual puede descartarse el influencia de Seudogenes sobre la topología del árbol al menos para el caso de *T. rickmani*, sin embargo otras extracciones y análisis más detallado de la estructura es necesario, para determinar si en realidad estos no están causando algún cambio en la información filogenética. Sin embargo, algunos autores señalan que pueden existir algunos seudogenes que no han perdido la estructura secundaria, como en el caso de copias múltiples que presentan cierta tasa de divergencia al ser comparados con las copias verdaderas del gen, pero que si han perdido la funcionalidad por lo cual pueden presentar problemas en la recuperación de la topología verdadera (Bailey et al. 2003). De esta manera debe tenerse precaución en las conclusiones que se puedan obtener de los datos ya que podrían estarse observando el efecto de copias múltiples y no de verdaderas relaciones filogenéticas. De esta manera la hipótesis de la existencia de hibridización entre las especies debe ser tomada con precaución.

10.5.3. Sitios segregantes

Para descartar que existiera un efecto de saturación que no fuera detectado por medio de otras técnicas pero que pudiera estar causando asociaciones de individuos que sugirieran la existencia de paralogía. Se realizó un análisis de los sitios polimórficos (Tabla 5). Se realizó para ambas matrices y se pudo comprobar que ambas matrices tenían pocos cambios en las variables de tres y cuatro nucleótidos. En particular ND4 puede considerarse como una matriz limpia que posee más sitios con información parsimoniosa que sitios de 3 y 4 variables. ITS2 tiende a presentar valores incluso tres

veces mayores que el ND4 pero al ser un marcador no codificante se espera que en cierta forma exista una alta tasa de sustitución. Al analizar las ramas largas se encontró que precisamente los individuos con mayores tasas de sustitución eran los que tenían una estructura secundaria de pseudogen y estos recuperan información filogenética, por lo que puede esperarse que en realidad se trate de copias múltiples sin homogenizar que están causando las relaciones paralogas.

10.5.4. Recombinación

Se realizó un análisis para ver si la cantidad de recombinación era tanta para ITS2 que pudiera apoyar la existencia de la paralogía. Sin embargo, al examinar ambas matrices se encontró que NxD4 presentó mucha mayor cantidad de recombinación que el ITS2 (Tabla 6). Esto incluso al repetirse el análisis con un programa que fuera más eficiente para dicho análisis (RDP). De esta manera puede descartarse el efecto de la recombinación en la observación de la paralogía. Sin embargo, el hallazgo de recombinación en ND4 es algo que aunque ya no puede ser cubierto por este trabajo se recomienda pueda ser abordado más adelante. La existencia de recombinación para ADN mitocondrial ya había sido observado anteriormente para alacranes (Gantenbein et al. 2005), por lo cual puede considerarse que es otra de las características diferenciales que existe en el código mitocondrial de los insectos y podría estar sugiriendo la existencia de híbridos dentro de las especies estudiadas, sin embargo no puede llegarse a ninguna conclusión con los datos y análisis realizados y se necesita de una mayor cantidad de estudios.

10.5.5. Copias múltiples de genes que no han completado su evolución concertada

Esta es uno de los factores más difíciles de poner a prueba y no se ha podido demostrar su ausencia en los datos. Se secuenciaron nuevos productos de PCR de dos individuos cuya relación se observaba como una paralogía en la filogenia con ITS2 (*T.hegneri* y *T.dimidiata* de Yucatán). Se realizaron tres diferentes secuenciaciones para cada individuo pudiéndose encontrar que cada una tenía variantes muy divergentes al ser comparadas (Figura 7). La variación interna encontrada para cada uno de estos individuos puede ser un indicio de la existencia de copias múltiples en las secuencias de ITS2 que no han logrado llegar a homogeneizarse. Diversos trabajos realizados con anterioridad, en plantas (Gernandt et al. 2001), como en insectos (Rich et al. 1997,

Onyabe y Conn 1999, Beebe et al. 2000, Álvarez y Hoy 2002) así como otros invertebrados (Hugall et al. 1999, Harris y Crandall 2000) han demostrado la existencia de variación intragenómica dentro de las secuencias de ITS2, posiblemente ocasionado por copias múltiples no homogenizadas que incluso llegan a tener diferenciación mucho mayor a la observada dentro de poblaciones muy diversificadas. Incluso se reporta que algunos insectos pueden tener hasta 700 copias de ADN ribosomal (Collins y Paskewit 1989).

Debido a esta información previa y a la variación observada dentro de estos individuos, no puede descartarse el efecto de copias múltiples de genes no homogeneizadas. Sin embargo este fenómeno no se puede diferenciar de la variación intragenómica que se podría observar por una hibridación entre especies y subespecies. De esta manera debe tomarse con mucho cuidado la interpretación de los resultados obtenidos ya que no puede asegurarse si estos son resultado de hibridación entre especies o simplemente ruido introducido por una evolución concertada inconclusa a nivel de especies cercanas.

10.6. Correlación de asociación de taxa en un mapa de unidades morfotectónicas

Al observar la forma como se agruparon los taxa y como se distribuyen en los mapas, no se puede encontrar ningún patrón. A diferencia de lo observado anteriormente donde datos de morfometría parecían tener cierta relación en su agrupación con unidades morfotectónicas, en el presente análisis, no se encuentra ningún tipo de relación con las mismas. Los datos de ITS2 tienen una distribución casi azarosa, por lo cual es difícil determinar algún patrón (Figura 9). Mientras que para el marcador ND4 aunque no se le observa ninguna correlación con las unidades morfotectónicas si parece presentar una separación relacionada con los bloques geológicos donde se ubican las poblaciones. Es decir un grupo de *T. dimidiata* el grupo 1 se ubica en el bloque Maya, mientras que el grupo 2a se ubica dentro del bloque continental de México. El Grupo 2b se encuentra principalmente disperso en el bloque Chortí con algunas poblaciones dentro del bloque maya y finalmente el grupo 3 se distribuye totalmente en el resto de Centroamérica, Bloque Chorotega y Choco.

Una posible causa es que aparentemente los datos morfológicos están recibiendo mayor influencia de las condiciones ecológicas donde se encuentran. De esta forma, la selección que actúa sobre los taxa para crear la variación que los separa como

diferentes especies, podría estar influenciado por el ambiente. El hecho de que los datos genéticos no concuerden con los resultados observados con datos morfológicos puede deberse a lo encontrado por Dujardin (Dujardin et al. 1999) que menciona que los datos morfológicos al parecer tienden a evolucionar a un ritmo más rápido. Recientemente el mismo autor menciona que incluso pueden existir diferentes tipos de selección sobre los taxa de *T. dimidiata* que provocan su separación y que la misma recae sobre información epigenética en el genoma. Esta información no es detectada por medio del estudio de marcadores individuales y es posiblemente la causa de la diferencia de información obtenidas con datos moleculares versus datos morfológicos (Dujardin et al. 2009). Aunque aquí solo se hace una leve aproximación estudios más profundos serían recomendados en particular para el marcador ND4.

11. CONCLUSIONES

- ✓ El cambio en el alineamiento realizado en base a la estructura secundaria modificó los microsatélites observados pudiendo obtener información filogenética de los mismos.
- ✓ Al codificar motivos, entre ellos microsatélites, los índices de consistencia tendieron a disminuir lo cual podría estar relacionado con una disminución en la sobreestimación de los eventos evolutivos presentes en la filogenia.
- ✓ Se observó que la estructura secundaria de los ITS2 de triatomíneos consistió en un tallo largo con cuatro dominios, con excepciones para *T. mexicana* con tres dominios y *T. ryckmani* cuya estructura cambió mucho y se sospecha como un pseudogen.
- ✓ ND4 ha demostrado ser un marcador efectivo para la definición de especies cercanas y variación a nivel intraespecífico a pesar de poseer índices de consistencia menores, pero posee mayor resolución de filogenias.
- ✓ Las topologías observadas con ITS2, ND4 y evidencia combinada apoyan la designación de los grupos Yucatán, Petén como una especie diferente y la asocian con el género *Meccus*, tal como ha sido observado para genitalia.
- ✓ Se observan cuatro grupos principales dentro del complejo de especie de *T. dimidiata*, los cuales pueden ser considerados como especies diferentes. Algunas en particular como el grupo de *T. hegneri* con las poblaciones de Veracruz, necesitaran más muestreo y análisis para su determinación, pero ya es posible su separación como *T. maculipennis*.
- ✓ Se observa la convivencia sin competencia de *T. hegneri* y *T. dimidiata* y sin variación molecular, dentro de la isla de Cozumel lo cual sugiere se revise la descripción como nueva especie para *T. hegneri*.
- ✓ El polimorfismo encontrado en la península de Yucatán para *T. dimidiata* sugiere que podría tratarse de más de una taxa conformando el complejo de especie o simplemente de plasticidad para la especie; No obstante, mayor cantidad de estudios y muestreos es necesario para determinar que fenómenos se están dando en la península.
- ✓ Se observa diferenciación de los grupos de Lanquín y San Luis en Petén en Guatemala; esto podría indicarnos que existe movilidad entre cuevas de este grupo diferenciado.
- ✓ *T. hegneri*, puede presentar individuos híbridos que se asocian con *T. dimidiata* sin embargo esto no puede ser aseverado ya que hay otros factores que pueden estar influenciando en la aparición de individuos en posiciones no esperadas como copias múltiples de genes que no se han homogenizado.

- ✓ El sesgo nucleotídico observado para ambas matrices es similar, por lo cual puede descartarse que haya alguna influencia de este factor sobre las mismas.
- ✓ La matriz de ND4 presenta pocas variables de sitio de 3 y ninguna de 4, lo cual le da soporte como una matriz sin posible influencia de saturación mutacional.
- ✓ Se observó mayor cantidad de eventos recombinantes para ND4 que para ITS2, evento ya observado en alacranes con anterioridad.
- ✓ Los factores que no pudieron ser descartados y que por lo tanto pueden influenciar sobre la topología observada son hibridación, recombinación y copias múltiples de genes.
- ✓ Se observa la existencia de polimorfismo en ITS2 dentro de un mismo individuo lo cual parece apoyar la hipótesis de la existencia de copias múltiples que no han sido homogenizadas y causantes de paralogía.
- ✓ La utilización de ITS2 para estudios filogenéticos a nivel de especies muy cercanas no es recomendada pues es difícil diferenciar cual es la causa de paralogía.
- ✓ No se logró observar una correlación entre la distribución de los haplotipos y las unidades morfotectónicas, esto puede deberse a lo mencionado por Dujardin de la existencia de relaciones epigenéticas que permiten que los cambios morfológicos se den rápidamente mientras los genéticos no sean evidentes.

12.RECOMENDACIONES

- ✓ La revisión más detallada de la presencia de copias múltiples de genes y de pseudogenes tanto en ITS2 y ND4, para evitar el problema de falsa señal filogenética proporcionada por los mismos.
- ✓ Seguir analizando la evolución de ITS2 para la posterior codificación de Gaps y motivos (SSRs, STRs, reversiones, etc.) de forma más eficiente.
- ✓ El análisis de la evolución paralela del código genético mitocondrial que existe en *Triatoma dimidiata* y si existe alguna posible relación con su capacidad de resistencia a insecticidas, grado de invasión a la vivienda humano y grado de infección con *Trypanosoma cruzi*.
- ✓ El estudio de la distribución de los grupos encontrados por técnicas más eficientes como filogeografía.
- ✓ La realización de un mayor muestreo de la península de Yucatán, ya que esta parece ser un área compleja de hibridización y especiación.
- ✓ La búsqueda de otros marcadores moleculares más eficientes para el estudio de las relaciones filogenéticas de los miembros del complejo de *T. dimidiata*.

13. BIBLIOGRAFÍA

- Abascal, F., D. Posada, R. Zardoya. 2006.** GenDecoder: Genetic code prediction for metazoan mitochondria. *Nucleic Acids Research* 34: W389-W393.
- Almeyda-Artigas, R. J., M. D. BARGUES, S. Mas-Coma. 2000.** ITS-2 rDNA sequencing of *Gnathostoma* species (Nematoda) and elucidation of the species causing human gnathostomiasis in the Americas. *Journal of Parasitology* 86: 537-544.
- Álvarez, J. M., M. Hoy. 2002.** Evaluation of the Ribosomal ITS2 DNA sequences in Separating Closely Related Populations of the Parasitoid *Ageniopsis* (Hymenoptera: Encyrtidae). *Annals of the Entomological Society of America* 95: 250-256.
- Ayau, O. 1998.** Enfermedad de Chagas. Experiencias Personales y revisión Bibliográfica.
- Bailey, D. C., T. Carr, A. Harris, C. Hughes. 2003.** Characterization of angiosperm nrDNA polymorphism, paralogy, and pseudogenes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: 435-455.
- BARGUES, M., A. Marcilla, J. Ramsey, J. Dujardin, C. Schofield, S. Mas-Coma. 2000.** Nuclear rDNA-based Molecular Clock of the Evolution of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), Vectors of Chagas Disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 567-573.
- BARGUES, M. D., D. Klisiowicz, F. Gonzalez-Candelas, J. Ramsey, C. Monroy, C. Ponce, P. M. Salazar-Schettino, F. Panzera, F. Abad-Franch, O. Sousa, C. Schofield, J. P. Dujardin, F. Guhl, S. Mas-Coma. 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: e233.
- Beaty, B. J., W. C. Marquardt. 1997.** The Biology of Disease Vectors. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene* 56: 630.
- Beebe, N., R. D. Cooper, D. Foley, J. Ellis. 2000.** Populations of the south-west Pacific malaria vector *Anopheles farauti* s.s. revealed by ribosomal DNA transcribed spacer polymorphisms. *Heredity* 84: 244-253.
- Borsch, T., Hilu KW., Quandt D., Wilde V., Neinhuis C. & Barthlott W. 2003.** Noncoding plastid trnT-trnF sequences reveal a well resolved phylogeny of basal angiosperms. *Journal of Evolution and Biology*. 16: 558-576.
- Bustamante, D. M., C. M. Monroy, M. Menes, A. Rodas, P. M. Salazar-Schettino, G. Rojas, N. Pinto, F. Guhl, J. P. Dujardin. 2004.** Metric variation among geographic populations of the Chagas vector *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) and related species. *J Med Entomol* 41: 296-301.
- Calderón, C., P. Dorn, S. Melgar, J. Chávez, A. Rodas, R. Rosales, C. Monroy. 2004.** A preliminary assessment of genetic differentiation of *Triatoma dimidiata*, (Hemiptera: Reduviidae) in Guatemala by RAPD-PCR. *J. Med. Entomol.* 41: 882-887.

- Carcavallo, R., I. Girón, J. Jurberg, H. Lent. 1999.** Atlas de Chagas disease Vectors in the Americas, pp. 1217. In Fiocruz [ed.], Río de Janeiro, Brazil.
- Carcavallo, R., J. Jurberg, H. Lent, F. Noireau, C. Galvão. 2000.** Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Proposals for Taxonomic Arrangements. Entomología y Vectores, Río de Janeiro 7: 1-99.
- Coleman, A. 2007.** Pan-eukaryote ITS2 homologies revealed by RNA secondary structure. Nucleic Acids Research 35: 3322-3329.
- Collins, F. H., S. M. Paskewit. 1989.** Ribosomal RNA genes of the Anopheles gambiae species complex. Adv. Dis. Vector Res. 6: 1-28.
- Cruz-Reyes, A., J. Pickering-López. 2006.** Chagas disease in Mexico: and analysis of geographical distribution during the past 76 years A review. . mem Inst Oswaldo Cruz 101: 345-354.
- Curran, F., F. Driver, W. O. Ballard, R. J. Milner. 2004.** Phylogeny of *Metarhizium*: analysis of ribosomal DNA sequence data. Mycol res 98: 547-552.
- Chung-Ping, L., B. Danforth. 2004.** How do insect nuclear and mitochondrial gene substitutio patterns differ? Insights from Bayesian analyses of combined datasets. molecular Phylogenetics and Evolution 30: 686-702.
- Dengo, G. 1968.** Estructura Geológica, Historia Tectónica y Morfología de América Central. Agencia para el desarrollo internacional, México.
- Díaz Morales, L. M. 2008.** Morfometría de Opérculos y Huevecillos de Triatominos (Hemiptera: Reduviidae), como una Herramienta para la Diferenciación de Especies y Subespecies. Tesis de Licenciatura, pp. 79, Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Dorn, P., C. Monroy, A. Curtis. 2007.** *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811): A review of is diversity across its geographic range and the relationship among populations. . Infect Genet Evol 7: 343-352.
- Dotson, E. M., C. B. Beard. 2001.** Sequence and organization of the mitochondrial genome of the Chagas disease vector, *Triatoma dimidiata*. Insect Mol Biol 10: 205-15.
- Dujardin, J., J. Costa, D. M. Bustamante, N. Jaramillo, S. Catala. 2009.** Deciphering morphology in Triatominae: The evolutionary signals. In press, Acta Trop. doi:10.1016/j.actatropica.2008.09.026.
- Dujardin, J. P., P. Panzera, C. J. Schofield. 1999.** Triatominae as a model of morphological plasticity under ecological pressure. Mem Inst Oswaldo Cruz 94 Suppl 1: 223-8.
- Dumonteil, E., S. Gourbiere, M. Barrera-Perez, E. Rodriguez-Felix, H. Ruiz-Pina, O. Banos-Lopez, M. J. Ramirez-Sierra, F. Menu, J. E. Rabinovich. 2002.** Geographic distribution of *Triatoma dimidiata* and transmission dynamics of *Trypanosoma cruzi* in the Yucatan peninsula of Mexico. Am J Trop Med Hyg 67: 176-83.
- Escorza, A., P. M. Salazar, M. Cabrera, J. Gómez, M. Becerril, R. Ortíz, G. García de la Torre, M. Cruz, D. Martín del Campo, J. Vite. 2001.** Triatominos Hematófagos transmisores de *T. cruzi* en el estado de

- Hidalgo. . Gaceta Regional del Sistema de Investigación Ignacio Zaragoza SEP-CONACYT II 15: 5-7.
- Gantenbein, B., V. Fet, I. Gantenbein-Ritter, F. Balloux. 2005.** Evidence for recombination in scorpion mitochondrial DNA (scorpiones: Buthidae). Proc R. Soc. B. 272: 697-704.
- Gernandt, D., A. Liston, D. Piñero. 2001.** Variation in the nrDNA ITS of *Pinus* Subsection *Cembroides*: Implications for Molecular Systematic Studies of Pine Species Complexes. Molecular Phylogenetics and Evolution 21: 449–467.
- Goloboff, P., S. Farris, K. C. Nixon 2000.** TNT (Tree analysis using New Technology) (BETA) ver. 1.0. computer program, version By Goloboff, P., S. Farris, and K. C. Nixon, Tucumán, Argentina.
- Goloboff, P. A., J. S. Farris, K. C. Nixon. 2003. *Tree Analysis Using New Technology Version 1.0*** ã, Available from the authors and from <http://www.zmuc.dk/public/phylogeny>
- Guhl, F. 1999.** Control de la enfermedad de Chagas., pp. 12-27. In O. P. A. d. Salud [ed.], Memorias, Primer Encuentro Internacional sobre Enfermedad de Chagas en México, Universidad Simón Bolívar, México DF.
- Guzman-Bracho, C. 2001.** Epidemiology of Chagas disease in Mexico: an update. Trends Parasitol 17: 372-6.
- Guzman-Marin, E., M. Barrera-Perez, M. Rodriques-Felix, F. Escobedo-Ortegon, J. Zavala-Velazquez. 1991.** Indices entomológicos de *Triatoma dimidiata* en el estado de Yucatán. Rev. Biomed. 2: 20-29.
- Hall, T. A. 1999.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. . Nucl. Acids. Symp. Ser. 41. : 95-98.
- Harris, D., K. Crandall. 2000.** Intragenomic variation within ITS1 and ITS2 of freshwater crayfishes (Decapoda:Cambaridae). Mol Biol. Evol. 17: 284-291.
- Harris, K. D., J. M. Ramsey, R. Ordoñez, C. Cordon-Rosales, P. M. Salazar, F. A. Monteiro, E. M. Dotson, C. B. Beard. 2002.** Evidence of species complex in the Chagas disease vector *Triatoma dimidiata*., American Society of Tropical Medicine and Hygiene. *Unpublished Work*.
- Hashimoto, T., M. Mejía, A. Rodas, C. Monroy, Y. Tabaru. 1996.** Laboratory test of insecticidal efficacy against a vector of Chagas disease, *Triatoma dimidiata* (Hemiptera : Reduviidae). Med. Entomol. Zoo. 47: 238-245.
- Hugall, A., J. Stanton, C. Moritz. 1999.** Reticulate evolution and the origins of ribosomal internal transcribed spacer diversity in apomictic *meloidogyne*. Mol.Biol.Evol. 16: 157-164.
- IPCA. 2009.** Reunión de la Comisión Intergubernamental de la Iniciativa de los Países de Centroamérica para la Interrupción de la Transmisión Vectorial y Transfusional de la Enfermedad de ChagasIPCA. In O. P. Salud [ed.], Eliminación del vector *Rhodnius prolixus* en Guatemala. Febrero., San José, Costa Rica.

- Jarne, P., P. J. Lagoda. 1996.** Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 424-429.
- Landaverde, P. 2004.** Comparación de poblaciones silvestres y domésticas de *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) de México y Centroamérica por medio de la técnica de amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD-PCR). Tesis de Licenciatura., pp. 114, Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala, Guatemala.
- Lent, H., P. Wygodzinsky. 1979.** Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas disease. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 163: 123-520.
- Liston, A. R., William. Piñero, Daniel. Alvarez-Buylla, Elena. 1999.** Phylogenetics of *Pinus* (Pinaceae) Based on Nuclear Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer Region Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 11: 95-109.
- López Cardenas, J., F. González-Bravo, P. M. Salazar. 2002.** Distribución Espacial de Vectores de la Enfermedad de Chagas en el Estado de Guanajuato 1998-2000. *Acta Univ Guanajuato* 12: 64-69.
- López Cardenas, J., F. González-Bravo, P. M. Salazar, J. Gallaga-Solorzan, E. Ramírez-Barba, J. Martínez-Mendes, V. Sánchez-Cordero, A. T. Peterson, J. Ramsey. 2005.** Fine-Scale predictions of distributions of Chagas Disease vectors in the state of Guanajuato, México. *J Med Entomol* 42: 1068-1081.
- Lyman, D. F., F. A. Monteiro, A. A. Escalante, C. Cordon-Rosales, D. M. Wesson, J. P. Dujardin, C. B. Beard. 1999.** Mitochondrial DNA sequence variation among triatomine vectors of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg* 60: 377-86.
- Llorante Bousquets, J., I. Luna Vega [eds.]. 1994.** *Taxonomía Biológica, México.*
- Magallón-Gastélum, E., N. Magdaleno-Peñaloza, G. Kaatthain-Duchateau, F. Trujillo-Contreras, F. Lozano-Kasten, R. Hernández-Gutierrez. 1998.** Distribución de los vectores de la enfermedad de Chagas (Hemiptera:Reduviidae:Triatominae) en el estado de Jalisco, México. *Rev Biomed* 9: 151-157.
- Marcilla, A., M. D. Barges, J. M. Ramsey, E. Magallon-Gastelum, P. M. Salazar-Schettino, F. Abad-Franch, J. P. Dujardin, C. J. Schofield, S. Mas-Coma. 2001.** The ITS-2 of the nuclear rDNA as a molecular marker for populations, species, and phylogenetic relationships in Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vectors of Chagas disease. *Mol Phylogenet Evol* 18: 136-42.
- Martin, D., E. Rybicki. 2000.** RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinformatics* 16:562-563.
- Martínez-Perez, M., I. Medina, S. Alanís, A. Vences, I. Rojo, L. M. Díaz H. 2002.** Nivel de infestación por triatominos e índice de infección natural de *Trypanosoma cruzi* prevaleciente en los municipios de Tejupilco Amatepec Tlatlaya San Simón de Guerrero y Temascaltepec Estado de

- México. Gaceta Médica Secretaría de Salud del Estado de México Nueva Epoca Año 2, Enero-marzo.
- Martínez, F., G. C. Villalobos, A. M. Cevallos, P. de la Torre, J. P. Laclette, R. Alejandro-Aguilar, B. Espinosa. 2006.** Taxonomic study of the *Phyllosoma* complex and other triatomine (Insecta:Hemiptera:Reduviidae) species of epidemiological importance in the transmission of Chagas disease: Using ITS-2 and mt CytB sequences. *molecular Phylogenetics and Evolution* 41: 279-287.
- Mas-Coma, S., M. BARGUES. 2009.** Populations, hybrids and the systematic concepts of species and subspecies in Chagas disease triatomine vectors inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA. *Acta Tropica* 110 112-136.
- Maynard Smith, J. 1992** Analyzing the mosaic structure of genes. *J. Mol. Evol.* 34: 126-129.
- Menes, M. 2004.** Diferencias métricas entre poblaciones de *Triatoma dimidiata* Latreille (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) de México, Centro América y Colombia: Efecto de la procedencia geográfica y el ecotopo. Tesis de Licenciatura., pp. 99, Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Monroy, M. C., D. M. Bustamante, A. G. Rodas, M. E. Enriquez, R. G. Rosales. 2003.** Habitats, dispersion and invasion of sylvatic *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in Peten, Guatemala. *J Med Entomol* 40: 800-6.
- Monteiro, F. A., D. M. Wesson, E. M. Dotson, C. J. Schofield, C. B. Beard. 2000.** Phylogeny and molecular taxonomy of the Rhodniini derived from mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Am J Trop Med Hyg* 62: 460-5.
- Müller, K. 2006.** Incorporating information from length-mutational events into phylogenetic analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 38: 667-676.
- Mylène Weill, A., C. B. Berthomieu, V. Georges Lutfalla, N. P. Nègre, J.-P. Alexandre Philips, P. Leonetti, M. Raymond. 2008.** Insecticide resistance: a silent base prediction. *Current Biology* 14: R552-R553.
- Nakagawa, J., C. Córdón-Rosales, J. Juárez, T. Nonami. 2003a.** Impact of residual spraying on *Rhodnius prolixus* and *Triatoma dimidiata* in the department of Zacapa in Guatemala. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 277-281.
- Nakagawa, J., K. Hashimoto, C. Cordon-Rosales, J. Abraham Juarez, R. Trampe, L. Marroquin Marroquin. 2003b.** The impact of vector control on *Triatoma dimidiata* in the Guatemalan department of Jutiapa. *Ann Trop Med Parasitol* 97: 288-97.
- Ochieng, J., A. Muigai, G. Ude. 2007.** Phylogenetics in plant biotechnology: principles, obstacles and opportunities for the resource poor. *African Journal of Biotechnology* 6: 639-649.
- Ochoterena, H. 2009.** Homology in coding and non-coding DNA sequences: a parsimony perspective. , *Plant Systematic and Evolution*. (First on line).

- Onyabe, D., J. Conn. 1999.** Intragenomic heterogeneity of a ribosomal DNA spacer (ITS2) varies regionally in the neotropical malaria vector *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae). *Insect Mol Biol* 8: 435-442.
- OPS. 2002.** Iniciativa de Centroamérica y BÉlice para la Interrupción de la Transmisión Vectorial de la Enfermedad de Chagas por *Rhodnius prolixus*, disminución de la Infestación intradomiciliaria por *Triatoma dimidiata* y la Eliminación de la Transmisión Transfusional del *Trypanosoma cruzi*. Taller para el Establecimiento de Pautas Técnicas en el Control de *Triatoma dimidiata*., pp. 35. *In* O. P. d. I. Salud [ed.]. OPS/HCP/HCT, San Salvador, El Salvador.
- OPS. 2004.** Informe de la Iniciativa de Países de Centro América (IPCA) en la sexta región de la Comisión Intergubernamental OPS/DPC/CD/282/04, pp. 49. *In* O. P. d. Salud [ed.], PAHO, Tegucigalpa.
- Paz-Bailey, G., C. Monroy, A. Rodas, R. Rosales, Y. Tabaru, C. Davies, J. Lines. 2002.** Incidence of *Trypanosoma cruzi* infection in two Guatemalan communities. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 96: 42-52.
- Posada, D., K. Crandall. 2001.** Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: computer simulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA* 98 13757-13762.
- Ramsey, J., R. Ordoñez, A. Cruz-Celis, A. Alvear, V. Chavez, R. López, J. Pintor, F. Gama, S. Carrillo. 2000.** Distribution of domestic Triatominae and Stratification of Chagas Disease Transmission in Oaxaca, México. *Medical and Veterinary Entomology* 14: 19-30.
- Ramsey, J. M. 2003.** Control of Chagas Disease Vectors., pp. 123-128. *Salud Publica de México*.
- Rich, S., S. Rosenthal, S. Telford III, A. Spielman, D. Harlt, F. J. Ayala. 1997.** Heterogeneity of the internal transcribed spacer (ITS2) region within individual deer ticks. *Insect Mol Biol* 6: 123-129.
- Rozas, J., J. Sanchez-DelBarrio, X. Messeguer, R. Rozas. 2003.** DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *bioinformatics* 19: 1496-2497.
- Salazar, P. M., I. de Haro-Arteaga, T. Uribarren-Berrueta. 1988.** Chagas disease in México. *Parasitology Today* 4: 348-352.
- Salazar, P. M., I. de Haro-Arteaga, M. Cabrera. 2005.** Tres especies de Triatominae y su importancia como vectores de *Trypanosoma cruzi* en México. *Médecina (Buenos Aires)* 65: 63-69.
- Salazar, P. M., J. Rosales-Piña, G. Rojas-Wastavino, M. Cabrera-Bravo, M. Vences-Blanco, J. López Cardenas. 2007.** *Triatoma mexicana* (Hemiptera:Reduviidae) in Guanajuato México: house infestation and seasonal variation. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 803-807.
- Sawyer, S. A. 1989.** Statistical tests for detecting gene conversion. *Molecular Biology and Evolution* 6: 526-538.
- Schofield, C. 1994.** *Triatominae: Biology and Control*. Eurocommunica Publications, West Sussex, UK.

- Schofield, C. J. 2000.** Challenges of Chagas disease vector control in Central America, Global Collaboration for Development of Pesticides for Public Health. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP 1: 4-5.
- Schofield, C. J. 2002.** Taller para el establecimiento de Pautas Técnicas en el Control de *Triatoma dimidiata*, pp. 12-8. In OPS/HCD/HCT/214/02. [ed.], San Salvador.
- Schofield, C. J., J. Dujardin. 1997.** Chagas disease vector control in Central America. Parasitology Today 13: 141-144.
- Seibel, P., T. Muller, T. Dandekar, M. Wolf. 2008.** Synchronous visual analysis and editing of RNA sequence and secondary structure alignments using 4SALE. BioMed Central Research Notes: 91-98.
- Seibel, P., T. Muller, T. Dandekar, J. Schultz, M. Wolf. 2006.** 4SALE-A tool for synchronous RNA sequence and secondary structure alignment and editing. BioMed Central Bioinformatic: 498-505.
- Solís-Mena, S. 2000.** Genetic variability and morphometrics of *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) geographical populations. PhD Thesis . pp. 15, Infectious and Tropical Diseases. London School of Hygiene & Tropical Medicine, Londres.
- Solís-Mena, S., J. Patterson, F. Abad-Franch. 2000.** Studying the origin of Ecuadorian *Triatoma dimidiata* populations (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *not published*, The Trypanosome Evolution Workshop, University of Exeter/London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, UK.
- Swofford, D. L., R. B. Selander 1997.** Biosys-2 modifications by WC Black IV computer program, version 1 June 1997. By Swofford, D. L., and R. B. Selander, Fort Collins.
- Tabaru, Y., C. Monroy, A. Rodas, M. Meji'a, R. Rosales. 1998.** Chemical control of *Triatoma dimidiata* and *Rhodnius prolixus* (Reduviidae: Triatominae), the principal vectors of Chagas Disease in Guatemala. Med. Entomol. Zoo. 49: 87-92.
- Tamay-Segovia, P., R. Alejandro-Aguilar, F. Martínez, G. Villalobos, F. Zavala-Diaz de la Serna, P. de la Torre, J. P. Laclette, S. Blum-Domínguez, B. Espinoza. 2008.** Two *Triatoma dimidiata* Clades (Chagas Disease vector) Associated with different habitats in Southern Mexico and Central America. Am J Trop Med Hyg 78: 472-478.
- Tay Zavala, J., Coeditores:, M. Gutierrez Quiroz, M. Rodriguez Quintanilla, R. López Martínez, R. Romero Cabello. 1994.** Microbiología y parasitología Médicas. Mendez Editores, México.
- Usinger, R. 1944.** The Triatominae of North and Central America and the West Indies and their public health significance. Public Health Bulletin 228.
- Van-Tuylen, S. 2007.** Variacion de la genitalia externa de machos de *Triatoma dimidiata* Latreille (Hemiptera:Reduviidae:Triatominae).Tesis de Licenciatura., pp. 85, Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.

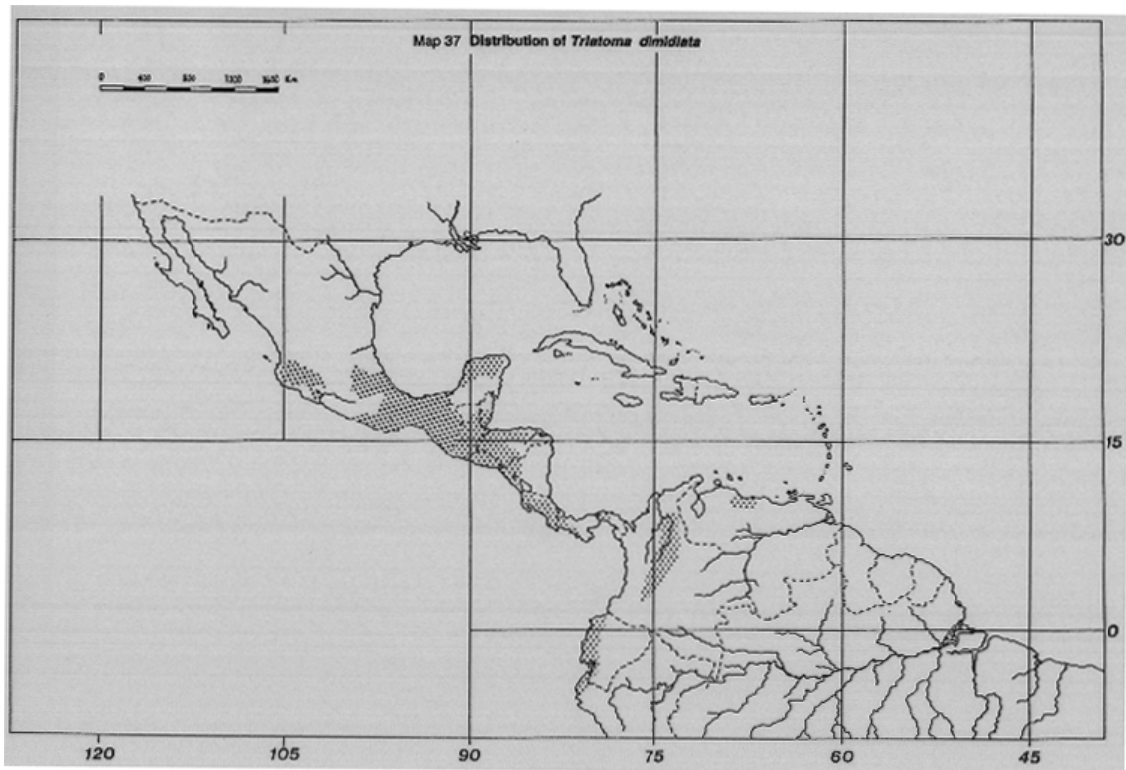
- Vidal-Acosta, V., B. Ibañez, S., C. Martínez-Campos. 2000.** Infección natural de chinches Triatominae con *Trypanosoma cruzi* asociadas a la vivienda humana en México. . Salud Pública de México 42: 496-503.
- Wendel, S., (editores), Z. Brener, M. Camargo, A. Rassi. 1992.** Chagas Disease (American Trypanosomiasis): Its Impact and Transfusion and Clinical Medicine. Editorial ISBT, Sao Paulo, Brazil.
- WHO. 2002.** Control of Chagas disease (Second Report). In WHO [ed.], WHO Technical Report Series 905. World Health Organization, Geneva.
- Young, I., A. Coleman. 2004.** The advantages of the ITS2 region of the nuclear rDNA cistron for analysis of phylogenetic relationships of insects: a *Drosophila* example. Molecular Phylogenetics and Evolution 30: 236-242.
- Zárate, L., R. Zárate. 1985.** A checklist of the Triatominae (Hemiptera:Reduviidae) of México. Int J Entomol 27: 102-127.
- Zeledon, R., J. A. Ugalde, L. A. Paniagua. 2001.** Entomological and ecological aspects of six sylvatic species of triatomines (Hemiptera, Reduviidae) from the collection of the National Biodiversity Institute of Costa Rica, Central America. Mem Inst Oswaldo Cruz 96: 757-64.
- Zeledón, R. 1981.** El *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) y su relación con la enfermedad de Chagas. Editorial Universidad Estatal a Distancia, San José, CR.
- Zeledón, R., J. E. Rabinovich. 1981.** Chagas' disease: an ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors. Annu Rev Entomol 26: 101-33.

14. ANEXOS

14.1. Recetas para elaboración de MMx para cada cebador.

		ITS2	1R _x			ND4	1R _x
Agua			15.4	Agua			16.0
Buffer	5X	1X	5.0	Buffer	5X	1X	5.0
MgCl ₂	50mM	3mM	2.0	MgCl ₂	50mM	3mM	2.0
dNTP	100mM	200uM*4	0.1	dNTP	100mM	200uM*4	0.2
CebF	100 pmol	40pmol	0.4	CebF	100 pmol	40pmol	0.1
CebR	100 pmol	40pmol	0.4	CebR	100 pmol	40pmol	0.1
Taq		1U	0.2	Taq		1U	0.1
ADN			1.5	ADN			1.5
Total			25.0	Total			25.0

14.2. Distribución de *Triatoma dimidiata*



Fuente: WHO, 2004

14.3. Distribución de las muestras en el estudio

Distribución de muestras de estudio. (Sps=Espece) Sps1: TdYucatán-Petén. Sps2: Td Lanquín Sps3:Td=Triatoma dimidiata Sps4:T. hegneri Sps5:T.mexicana. Sps6:T. nitida Sps7:T.longipennis Sps8: T. pallidipennis Sps9: Dipetalogaster máxima.

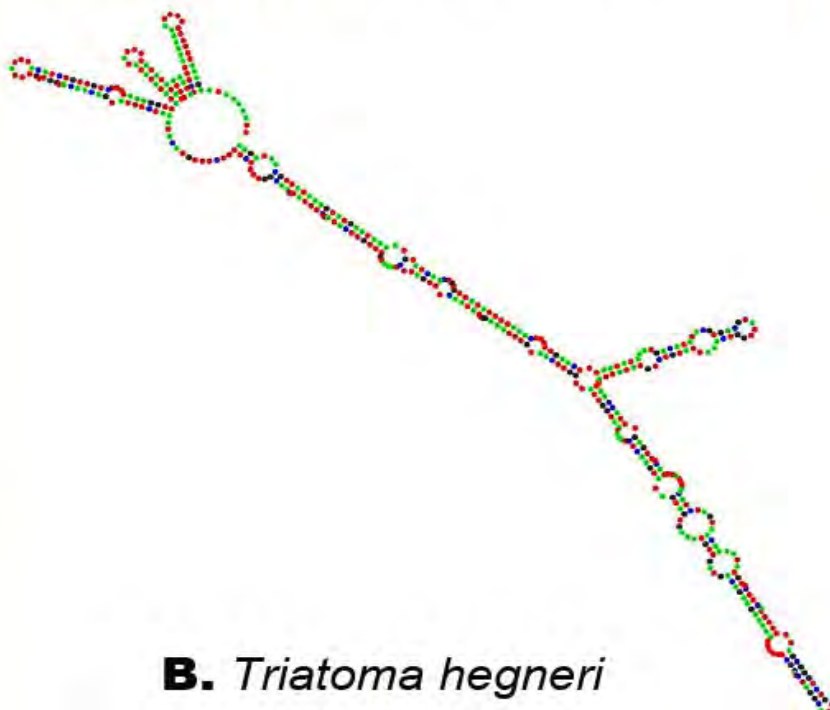
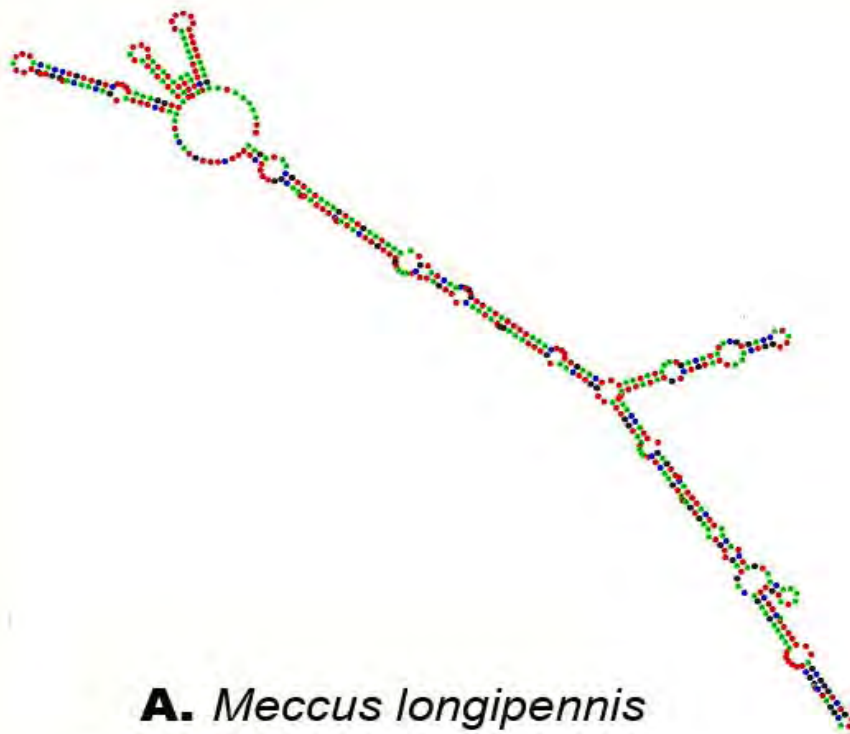


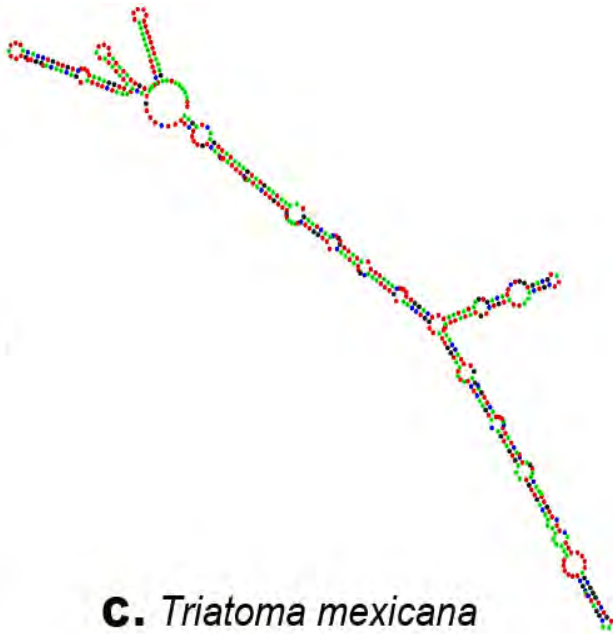
14.4. Tabla de Secuencias del Genbank.

	Especie	Lugar	País	N° de Ascension	Clave	Propocionadas por
ITS2	<i>T. maculipennis</i>	Santa Marta, Magdalena	Colombia	AJ582027	TmagbM00	Bargues,M.D.
	<i>T. gerstaeckeri</i>	Taichahuil, S.Luis Potosi	México	AM286734	TggbMx00	Bargues,M.D.
	<i>M.phyllosoma</i>	San Pedro Totolapan, Oaxaca. O El Camaron, Oaxaca	México	AJ286881	MphgbM00	Bargues,M.D.
	<i>M.mazzotti</i>	Oaxaca	México	AJ286885	MmzgbM00	Bargues,M.D.
	<i>M.pallidipennis</i>	Morelos	México	AM286729	TpMxOM00	Bargues,M.D.
	<i>M.bassolae</i>	Acatlán, Puebla	México	AM286724	MbgbMx00	Bargues,M.D.
	<i>T. nitida</i>	El Progreso	Guatemala	AM286733	TnGtCh00	Bargues,M.D.
	<i>T. dimidiata</i>	Quiche tdH4	Guatemala	AM286696	Tdgbsep4	Bargues,M.D.
	<i>T. dimidiata</i>	Yoro	Honduras	AM286701	TdgbHYH9	Bargues,M.D.
	<i>T. dimidiata</i>	Agua Zarca	Guatemala	AM286695	TdgbGAH3	Bargues,M.D.
	<i>T. dimidiata</i>	Yoro	Honduras	AM286694	TdgbHYH2	Bargues,M.D.
	<i>T. dimidiata</i>	Guayaquil	Ecuador	AM286697	TdgbEGH5	Bargues,M.D.
	<i>T. dimidiata</i>	Madriz	NICARAGUA	AM286699	TdgbNMH7	Bargues,M.D.
	<i>T. dimidiata</i>	PNV	Guatemala	AM286700	TdgbGVH8	Bargues,M.D.
	<i>T. dimidiata</i>	Sucre	Colombia	AM286706	TdgCSH14	Bargues,M.D.
	<i>T. dimidiata</i>	Chiriqui	Panamá	AM286708	TdgPCH16	Bargues,M.D.
	<i>T. dimidiata</i>	Boyaca	Colombia	AM286703	TdgCBH11	Bargues,M.D.
	<i>T. dimidiata</i>	Oaxaca	México	AM286715	TdMVAt18	Bargues,M.D.
	<i>T. dimidiata</i>	Hidalgo	México	AM286728	TmxgbY00	Bargues,M.D.
	<i>T. dimidiata</i>	Oaxaca	México	AM286715	TdgMOH23	Bargues,M.D.
<i>T. dimidiata</i>	Colima	México	AM286716	TdgMCH24	Bargues,M.D.	
<i>T. dimidiata</i>	Hidalgo	México	AM286714	TdgMHH22	Bargues,M.D.	
<i>T. dimidiata</i>	Oaxaca	México	AM286713	TdgMOH21	Bargues,M.D.	
<i>T. dimidiata</i>	Yucatán	México	FJ197150	TdgMYH28	Bargues,M.D.	
<i>T.hegneri h1</i>	Cozumel	México	AM286726	ThgbMC00	Bargues,M.D.	
<i>T.mexicana</i>	Hidalgo	México	AM286728	TMxYc000	Bargues,M.D.	
ND4						
	<i>M.pallidipennis</i>	yoro	Honduras	AF436860	TpgbMx00	Harris,K.D. and Beard,C.B.
	<i>M.pallidipennis</i>	yoro	Honduras	AF436860	TpgbMx00	Harris,K.D. and Beard,C.B.
	<i>M.pallidipennis</i>	yoro	Honduras	AF436860	TpgMCH04	Harris,K.D. and Beard,C.B.
	<i>M.pallidipennis</i>	yoro	Honduras	AF436860	TpCMMEX6	Harris,K.D. and Beard,C.B.
	<i>M. pallidipennis</i>	Yorito, Yoro	Honduras	AF436860	MpCMMEX9	Harris,K.D. and Beard,C.B.
	<i>M.pallidipennis</i>	yoro	Honduras	AF436860	TpgMCM03	Harris,K.D. and Beard,C.B.
	<i>T. dimidiata</i>	Mexico veracruz	México	AF454684	TdGtSR00	Harris,K.D. and Beard,C.B.
	<i>T. dimidiata</i>	Santa Rosa, Guatemala	Guatemala	AF454692	TdgGSR00	Harris,K.D. and Beard,C.B.
	<i>T. infestans</i>	---	Brazil	AF454700	TigbBr00	Harris,K.D. and Beard,C.B.
	<i>M. pallidipennis</i>	Yorito, Yoro	Honduras	AF436860	MpgMCM01	Harris,K.D. and Beard,C.B.
	<i>M. pallidipennis</i>	Yorito, Yoro	Honduras	AF436860	MpgMCH04	Harris,K.D. and Beard,C.B.
	<i>M. pallidipennis</i>	Yorito, Yoro	Honduras	AF436860	MpgbMx00	Harris,K.D. and Beard,C.B.
	<i>M. pallidipennis</i>	Colima	México	AF436861	MpgMCM02	Harris,K.D. and Beard,C.B.
	<i>T. dimidiata</i>	Veracruz	México	AF454684	TdgHTg01	Harris,K.D. and Beard,C.B.
	<i>T. dimidiata</i>	Yucatán	México	AF454698	TdgMxY03	Harris,K.D. and Beard,C.B.
	<i>T. dimidiata</i>	Veracruz	México	AF454684	TdgMXVr0	Harris,K.D. and Beard,C.B.
<i>T. dimidiata</i>	yoro	Honduras	AF454688	TdgHYr00	Harris,K.D. and Beard,C.B.	

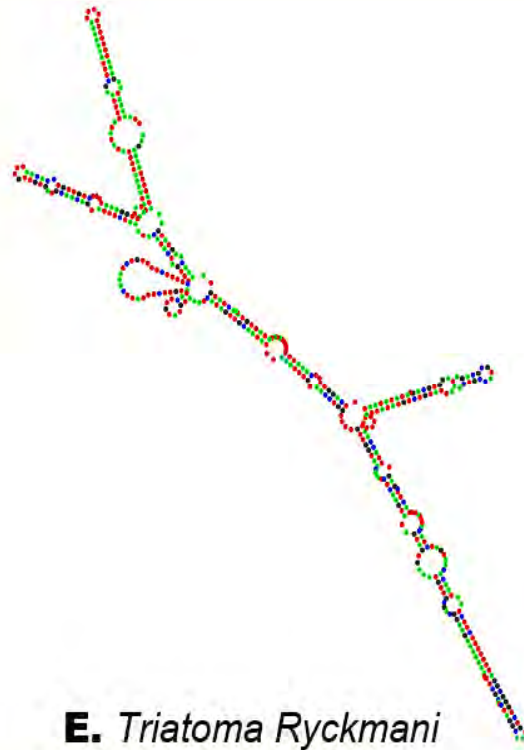
Tabla conteniendo la información de las secuencias obtenidas en Genbank para cada uno de los marcadores con su número de ascensión.

14.7. Estructura secundaria de ITS2 de taxa de triatominos





C. *Triatoma mexicana*



E. *Triatoma Ryckmani*



D. *Triatoma nitida*