

# Maestría en Biología PEDECIBA Subárea genética



Evolución cariotípica en Insectos Vectores de la  
Enfermedad de Chagas  
(Hemiptera, Reduviidae, Triatominae):  
Análisis del Cluster Ribosomal 45S

Lic. Sebastián Pita Mimbacas

Orientadora: Dra. Yanina Panzera Crespo  
Co-orientador: Francisco Panzera Arballo

Agosto 2013

# Agradecimientos



A mi familia por su incondicional apoyo y su cariño de siempre.

A mis tutores Yanina Panzera y Francisco Panzera quienes me guiaron en esta etapa tan importante, y además me transmitieron valores que me enriquecieron más allá de lo académico.

A mis amigos que siempre están y estarán para cuando los necesite, en las buenas y en las malas.

A los integrantes de la Sección Genética Evolutiva, quienes crean un excelente ambiente todos los días.

# Índice



Introducción.....	1
Enfermedad de Chagas.....	1
Ciclo de la enfermedad.....	2
Control de la enfermedad.....	3
Triatominos.....	6
Hábitats y hábitos.....	6
Ciclo de vida.....	6
Clasificación.....	7
Origen Evolutivo de la subfamilia Triatominae.....	9
Citogenética de triatominos.....	10
Objetivos.....	16
Objetivo general.....	16
Objetivos específicos.....	16
Hipótesis de trabajo.....	16
Materiales y métodos.....	17
Materiales.....	17
Métodos.....	17
Hibridación in situ fluorescente (FISH).....	17
Obtención de preparaciones citológicas.....	18
Obtención de la sonda.....	18
Marcaje de la sonda.....	18
Hibridación.....	18
Observación de la hibridación.....	20
Procesamiento de las imágenes.....	20
Resultados.....	21
Tribu Rhodniini.....	21
Tribu Bolboderini.....	21
Tribu Triatomini.....	22
Discusión.....	36
Comparación entre localización del cluster 45S y otros caracteres citogenéticos.....	36
Variación del cluster ribosomal, evolución y taxonomía.....	38
Tribu Rhodniini.....	38
Tribu Bolboderini.....	41

Tribu Triatomini.....	41
Género Dipetalogaster.....	42
Género Eratyrus.....	42
Género Mepraia.....	43
Género Panstrongylus.....	43
Género Triatoma.....	45
Variabilidad del cluster ribosomal en la tribu Triatomini.....	50
Dinámica de variación del cluster ribosomal 45S.....	52
Conclusiones.....	55
Perspectivas.....	56
Bibliografía.....	57
Publicaciones en revistas arbitradas.....	64

# Resumen



La subfamilia Triatominae incluye 145 especies, todas potenciales vectoras de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana causada por el protozooario *Trypanosoma cruzi*. Debido a que no existen vacunas ni tratamiento farmacológico eficaz contra el parásito, el combate contra la enfermedad se ha centrado principalmente en la erradicación de los vectores domésticos. Por ello el estudio de la biología de estos insectos es fundamental para garantizar el éxito de las campañas de erradicación.

Esta tesis comprende el estudio de la organización genómica de la subfamilia Triatominae mediante el mapeo cromosómico del cluster ribosomal 45S por Hibridación *In Situ* Fluorescente (FISH) en 71 especies, incluidas en ocho géneros diferentes. El análisis mostró que los triatominos presentan uno o dos loci ribosomales por genoma haploide, con cuatro patrones de localización diferentes: en un par autosómico; en el cromosoma X; en dos cromosomas sexuales o en un par autosómico y el cromosoma X. Esto representa una llamativa variabilidad en la localización del cluster ribosomal 45S, nunca antes revelada en el orden Hemiptera. En la mayoría de los casos, las especies emparentadas filogenéticamente comparten la misma localización del cluster ribosomal 45S. Sin embargo, en otros casos la posición del cluster puede cambiar entre especies muy cercanas. Esto estaría reflejando que los diferentes grupos de triatominos presentan tasas de diferenciación cromosómica diferentes.

Los resultados sugieren que el cariotipo ancestral de la familia constaría de 20 pares autosómicos y un sistema sexual simple XX/XY con el cluster ribosomal 45S localizado en un par autosómico. Además los resultados obtenidos permiten concluir que la localización del cluster ribosomal no está relacionada con variaciones en el sistema sexual o en el número de autosomas de las especies, ni tampoco con la presencia de heterocromatina constitutiva. Inclusive sugerimos que las fuerzas que gobiernan la evolución de la heterocromatina C y el cluster ribosomal 45S son distintas. Al igual que la variación excepcional en los patrones de bandeo C, las distintas localizaciones del cluster ribosomal 45S demuestran una gran dinámica en los genomas de las distintas especies de triatominos. Por lo que la hipótesis de homogeneidad cariotípica en triatominos carece de fundamentos a la luz de estos resultados.



La subfamilia Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), está integrada por insectos conocidos como vinchucas desde Ecuador hasta la Patagonia, chipo en Venezuela, pito en Colombia y barbeiro en Brasil, entre otros nombres comunes que se les atribuyen. Las 145 especies que conforman esta subfamilia son todas hematófagas, es decir, se alimentan de sangre de vertebrados. Excepcionalmente algunas especies tienen comportamientos predatorios sobre invertebrados (Schofield & Galvão 2009). La amplia mayoría de las especies posee una distribución americana, que abarca desde el sur de los Estados Unidos hasta el sur de Chile y Argentina.

El estudio de la biología de los triatominos se debe principalmente a su importancia epidemiológica, ya que todas las especies son potenciales vectores de la enfermedad de Chagas. Su hábito hematófago tiene como consecuencia la transmisión del parásito causante de la enfermedad, el *Trypanosoma cruzi*.

## Enfermedad de Chagas

Descrita por primera vez por el Dr. Carlos Chagas (1909), la enfermedad de Chagas o Trypanosomiasis americana es una enfermedad parasitaria endémica del continente americano, causada por el protozoario *Trypanosoma cruzi* (Euglenozoa, Zoomastigophora). Se estima que esta enfermedad afecta a 10 millones de personas (WHO 2012), desarrollándose en un contexto de gran pobreza, siendo catalogada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como “neglected disease” (enfermedad olvidada).

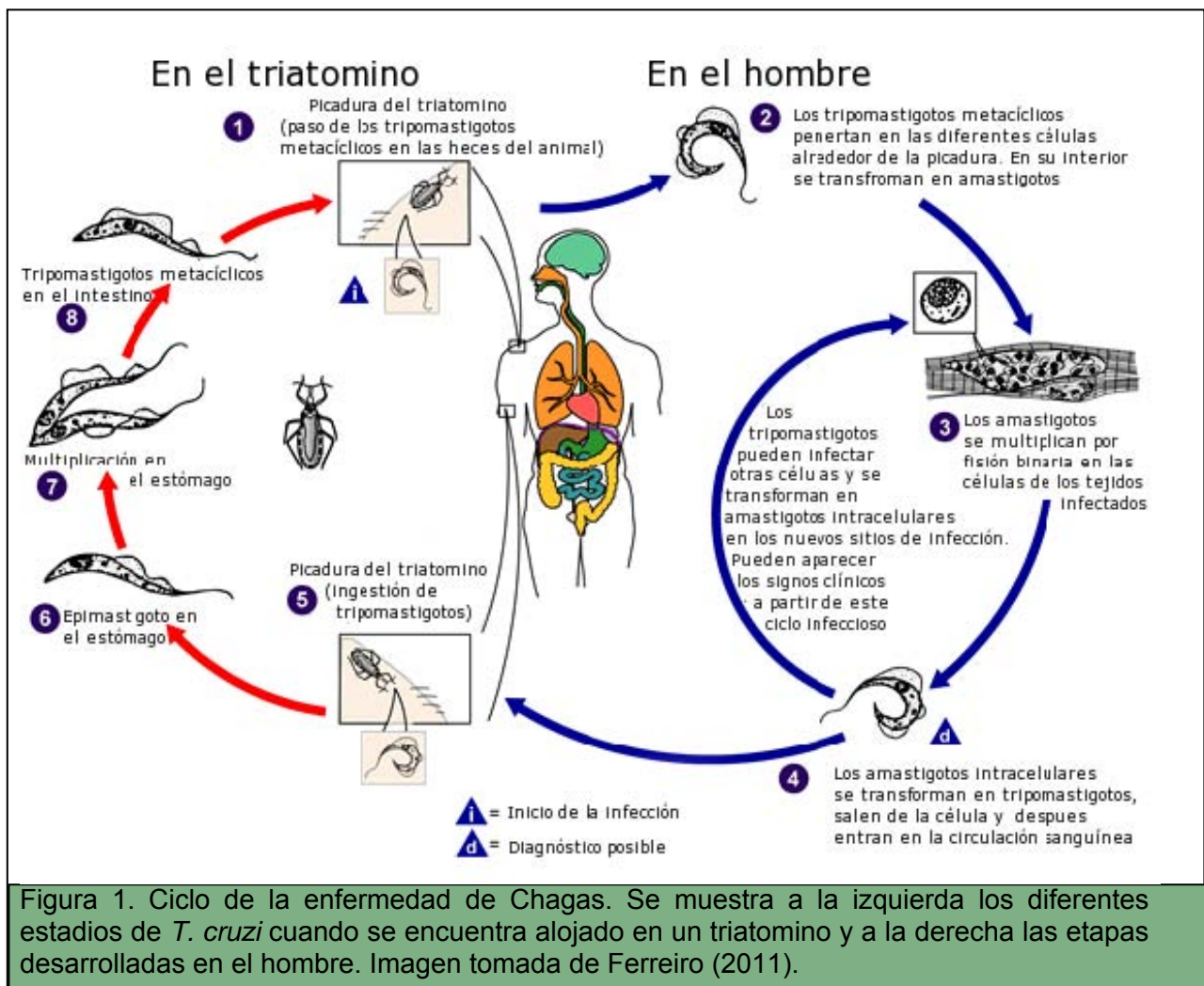
La enfermedad presenta tres estados en el hombre: la fase aguda, poco después de la infección, la fase indeterminada asintomática que puede durar de cinco a 20 años y la fase crónica. La fase aguda dura uno o dos meses, y se caracteriza por la presencia del parásito en el torrente sanguíneo del huésped. El *T. cruzi* es detectado por ensayos parasitológicos (hemocultivo) serológicos (anticuerpos específicos) y técnicas moleculares. Esta etapa inicial puede ser sintomática (fiebre, signo de Romaña, miocarditis y meningocefalitis, edema en la zona de la picadura) o asintomática, siendo letal en más de un 10 % de los casos (Coura 2003). La fase crónica comienza cuando el parásito sale de la circulación e invade las células del organismo, en particular las musculares cardíacas y lisas. Los órganos afectados se deforman generando adenopatía, hepatomegalia y esplenomegalia (Coura 2003), el daño genera por ejemplo el desarrollo de síntomas cardíacos (ej: taquicardia), síntomas digestivos (ej:

desórdenes de motilidad, secreción y absorción especialmente en esófago y colon) o desórdenes neurológicos (WHO 2012).

### **Ciclo de la enfermedad**

El ciclo de vida de *T. cruzi* alterna entre los vectores invertebrados (insectos triatominos) y sus huéspedes (vertebrados) (Figura 1). Entre los vertebrados infectados con el parásito se encuentran más de 180 especies de mamíferos (domésticos y silvestres). Los marsupiales y los xenartros son considerados los hospederos de *T. cruzi* más primitivos (Yeo et al. 2005, Noireau et al. 2009). Los huéspedes carnívoros, los roedores salvajes y las especies domésticas son actualmente muy importantes en la transmisión de la enfermedad (Flynn et al. 1998, Hancock et al. 2005, Rosypal et al. 2007). Si bien las aves son refractarias al parásito, éstas tienen un importante rol siendo huéspedes y alimento de los triatominos vectores. La inclusión del humano en el ciclo de transmisión del *T. cruzi* es discutida. Las infecciones humanas con *T. cruzi* más antiguas fueron encontradas en momias preincaicas, peruanas y chilenas que datan de unos 4000 años de edad, y en cazadores nómadas de Brasil de unos 9000 años (Guhl et al. 1999, Aufderheide et al. 2004).

El ciclo de la enfermedad de Chagas comienza cuando un insecto hematófago ingiere sangre de un vertebrado infectado con el parásito *T. cruzi* en estadio de tripomastigota. Luego de la ingesta, en el intestino medio del insecto los tripomastigotas se convierten en formas epimastigotas, etapa en la que se multiplican. La siguiente fase se desarrolla en la porción terminal del intestino del insecto donde el parásito cambia al estadio infectivo denominado tripomastigotas metacíclicos. En este momento los insectos vectores tienen la capacidad de transmitir el parásito al momento de una nueva alimentación ya que durante la misma también defecará conteniendo en sus heces las formas infectivas del *T. cruzi*. Así los tripomastigotas metacíclicos toman contacto con la piel del huésped vertebrado y penetran en las células epiteliales donde se transforman en estadio amastigota. Tras su replicación, se diferencian a formas tripomastigotas las cuales se encargan de la lisis celular del huésped adentrándose al espacio intercelular y llegando al torrente sanguíneo. Una vez allí, invaden y establecen focos en distintos órganos del huésped vertebrado. El ciclo se reinicia cuando otros triatominos ingieren el parásito al alimentarse de individuos infectados (Figura 1).



### Control de la enfermedad

Si bien la principal forma de transmisión del parásito es la vectorial (80 %), existen otros modos de infección menos frecuentes como el transfusional (16 %), materno-fetal (3 %), por ingestión oral y por trasplante de órganos (1 %) (WHO 2012, Yoshida 2008).

La eficiencia como vector de los triatominos radica principalmente en su capacidad de domiciliación. Por ello si bien las 145 especies son potenciales vectoras de la enfermedad, ya que tienen capacidad de ser infectivos, sólo 20 especies son las principales vectoras (Figura 2). Estas especies tienen diferentes características a tener en cuenta a la hora de combatirlas, como ser su capacidad de dispersión, el tipo de habitat doméstico que ocupan, la duración de su ciclo de vida o la existencia de poblaciones silvestres (Gourbière et al. 2012).



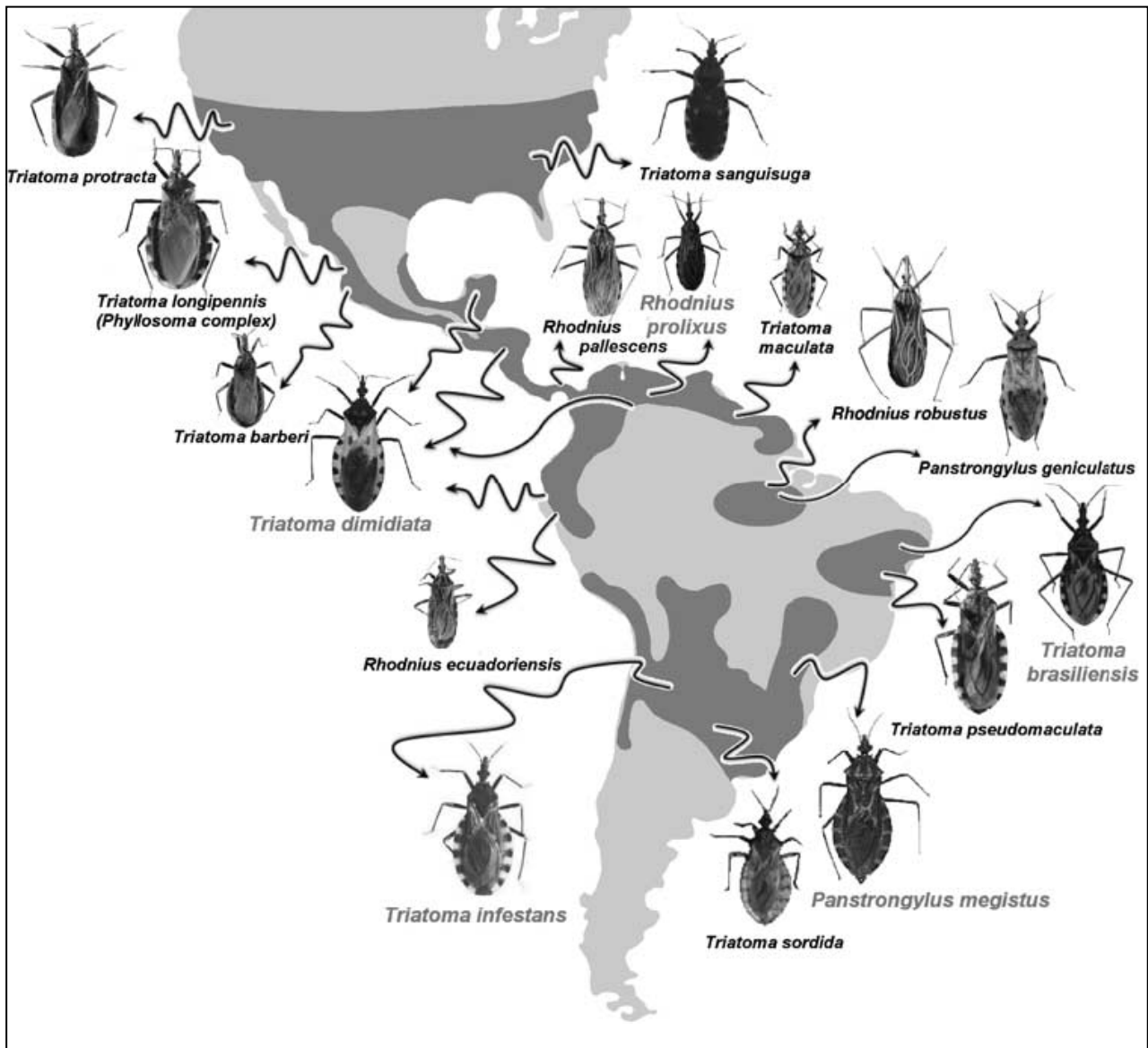


Figura 2. Principales especies de triatomínicos vectoras de la Enfermedad de Chagas. En el mapa se muestra en el mapa su distribución en el continente americano. Extraída de Gourbière et al. (2012).

Debido a que no existe vacuna ni tratamiento farmacológico eficaz contra el parásito, el combate contra la enfermedad de Chagas se ha centrado principalmente en la erradicación del vector del domicilio mediante el rociado de las casas con insecticidas piretroides y en interrumpir la transmisión transfusional mediante el control sanguíneo en los bancos de sangre (Guhl et al. 2009, Dias 2009). Estas sustancias se unen a receptores de los canales de sodio de la cutícula del insecto impidiendo la transmisión del impulso nervioso, lo que provoca la muerte del insecto (Stenersen 2004). El éxito en la erradicación de los triatomínicos del domicilio es favorecido por características biológicas propias de este grupo tales como reproducción lenta, poca movilidad, generaciones largas y estadios de vida coexistentes en el mismo ambiente (Dias 2009).

Uno de los programas con mayor éxito en el control vectorial fue la Iniciativa del Cono Sur (INCOSUR). Este programa regional intergubernamental auspiciado por la Organización Panamericana de la Salud (OPS), que incluyó varios países del Cono Sur, se inició en 1991. Su objetivo principal fue la disminución drástica de la transmisión al hombre de la enfermedad de Chagas mediante dos acciones principales: a) la eliminación de las poblaciones domésticas y peridomésticas del principal vector de la enfermedad de Chagas, *Triatoma infestans*, y b) el control sanguíneo de los bancos de sangre para eliminar la transmisión transfusional (Schofield & Dias 1999, Dias et al. 2002, Schofield et al. 2006). Mediante el rociado de las casas con insecticidas se redujo considerablemente la distribución geográfica de *T. infestans*, de casi 7 millones de km<sup>2</sup> en 1991 a menos de 1 millón de km<sup>2</sup> que ocupa actualmente (Schofield et al. 2006). Esto permitió la interrupción total de la transmisión vectorial en Brasil, Chile y Uruguay (Dias et al. 2002), así como en extensas regiones de Argentina y Paraguay. Sin embargo *T. infestans* doméstico aún persiste en Bolivia, Perú, y en la región del Gran Chaco (Bolivia, Argentina y Paraguay). La dificultad de eliminar a *T. infestans* de estas regiones son diversas, pero ya se han identificado varios factores. En la región del Gran Chaco, las propias condiciones climáticas de esta región dificultan la acción residual de los insecticidas ya que su persistencia en las casas no excede los tres meses, lo cual conduce a una rápida re-infestación de los domicilios luego del rociado con insecticida (Gürtler et al. 2007, Noireau et al. 2009). Otro factor que incide en la persistencia de *T. infestans* es la aparición de poblaciones resistentes a piretroides en el norte de Argentina y varias regiones de Bolivia (Picollo et al. 2005, Lardeaux et al. 2010).

Con el mismo objetivo de la INCOSUR, en 1997 se lanzó la Iniciativa de los Países de Centro América (IPCA) y los países del Pacto Andino (Dias et al. 2002, Schofield et al. 2006). En estas regiones la lucha contra la Enfermedad de Chagas implica el combate vectorial contra dos especies: *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata*. En el 2012 se logró la erradicación casi completa de *R. prolixus* en Centroamérica, principalmente debido a que se trata de una especie estrictamente domiciliada (Hashimoto & Schofield 2012). Sin embargo, en Venezuela y Colombia donde *R. prolixus* mantiene poblaciones silvestres (de Paula et al. 2005, Abad-Franch & Monteiro 2007), el combate vectorial aún continúa. En relación a *T. dimidiata*, esta especie presenta una amplia distribución, incluyendo México, toda Centroamérica, Colombia, Ecuador y norte del Perú (Dorn et al. 2007). Similar a lo que ocurre con *R. prolixus*, en los lugares donde no existen poblaciones silvestres el combate de *T. dimidiata* está siendo efectivo. En México y Centroamérica donde se encuentran focos silvestres el objetivo parece difícil de alcanzar (Schofield et al. 2006).

# Triatominos

## ***Hábitats y hábitos***

Los triatominos se encuentran tanto en ambientes naturales (rocas, nidos, cuevas, huecos de árboles y palmeras) como domésticos y peridomésticos (casas, gallineros, corrales, galpones), prefiriendo anidar en techos, grietas de muros y colchones, cercanos a fuentes de alimento. Las diferentes especies pueden ser exclusivamente silvestres, preferentemente domésticas o encontrarse en ambos ambientes. En general los triatominos se dispersan activamente, preferentemente caminando o mediante el vuelo atraídos por fuentes de luz o estimulados por la hambruna (Wisnivesky-Colli et al. 1993, Almeida et al. 2012). En las especies domésticas un factor muy importante es la dispersión pasiva realizada por el hombre (Schofield 1988, Cortez et al. 2010).

Tanto en ambientes domésticos como silvestres, la regulación del tamaño poblacional de los triatominos depende de la densidad de sus huéspedes. A mayor número de individuos en la población e igual número de huéspedes la competencia por el alimento aumenta. Un factor clave es la duración de la ingesta, la cual es interrumpida en casos de gran competencia por el alimento. Normalmente una ingesta completa dura unos 10 a 20 minutos cada cuatro a nueve días, dependiendo de la especie (Schofield 1994). La reducción de la nutrición tiene tres grandes consecuencias: 1) la velocidad del desarrollo de la ninfa disminuye, reduciendo la velocidad de paso a los estadios sucesivos, de manera que las hembras emergen más lentamente, 2) las hembras depositan menos huevos, 3) tiende a aumentar la probabilidad de que inicien un vuelo dispersivo, lo cual permite la invasión de sitios alternativos, como por ejemplo las viviendas humanas.

## ***Ciclo de vida***

Los insectos hemimetábolos, como los triatominos, poseen un ciclo de vida marcado por tres etapas: huevo, ninfa y adulto. En total la duración del ciclo abarca un año, pero este período depende mucho de la especie y del ambiente. En el caso de los triatominos el estado ninfal atraviesa por cinco estadios. El cambio entre los estadios ninfales ocurre por muda del exoesqueleto, lo que permite el crecimiento del insecto y es dependiente del estadio de desarrollo, temperatura, humedad y alimento disponible (o densidad poblacional). La última muda provoca la metamorfosis de la ninfa a adulto, que vive en promedio de 8 a 16 meses, lo que ocurre más tempranamente en las hembras y está marcado por la salida de las alas (Buxton 1930, Lent 1948, Wigglesworth 1972, Azambuja 1985). Las hembras pueden ser fecundadas poco después de la última muda y depositan unos 80-100 huevos por postura, comenzando a los 8-10 días post cópula hasta incluso un año después; dependiendo de la especie y del alimento

ingerido. Los huevos eclosionan entre los 10 a 40 días posteriores a su puesta (Castillo & Wolf 2000).

## **Clasificación**

La subfamilia Triatominae constituye un grupo de insectos hematófagos, pertenecientes a la familia Reduviidae (Hemiptera, Heteroptera). Se encuentra integrado por 145 especies, agrupadas en cinco tribus y se reconocen entre 15 y 17 géneros de acuerdo a los distintos autores (Tabla 1) (Lent & Wygodzinsky 1979, Galvão et al. 2003, Schofield & Galvão 2009, Frias-Lasserre 2010, Rosa et al. 2012, Monte Gonçalves et al. 2013).

Las cinco tribus son: Alberproseniini, Bolboderini, Cavernicolini, Rhodniini, y Triatomini. Las tres primeras son tribus con pocas especies y poco se conoce de ellas. La tribu Rhodniini agrupa a dos géneros, *Psammolestes* y *Rhodnius*, con 21 especies (Tabla 2). La tribu Triatomini es la más numerosa incluyendo siete u ocho géneros, dependiendo de la clasificación usada ya que el clado *Mepraia* es considerado género por Galvão et al. (2003) o complejo por Lent & Wygodzinsky (1979) y Schofield & Galvão (2009). Los géneros comprendidos en la tribu Triatomini son *Dipetalogaster*, *Eratyrus*, *Hermanlenticia*, *Linshcosteus*, *Mepraia*, *Panstrongylus*, *Paratriatoma* y *Triatoma*. Este último es el género más numeroso, donde se reconocen tres grupos distintos, los cuales se subdividen en complejos y subcomplejos (Tabla 3). Estos agrupamientos de las especies se basan principalmente en caracteres morfológicos, ecológicos y biogeográficos, y sólo en algunos subcomplejos existe apoyo de análisis genéticos obtenidos con distintas metodologías. Recientemente se está comprobando que la aplicación de distintos marcadores genéticos están modificando estos agrupamientos de especies (Mas Coma & Bargues 2009, Gourbière et al. 2012).

Tabla 1. Conformación taxonómica de la subfamilia Triatominae en tribus, géneros y número de especies, de acuerdo a Schofield & Galvão (2009) con modificaciones.

Tribu	Géneros	Número de especies
Alberproseniini	Alberprosenia	2
Bolboderini	Belminus	8
	Bolbodera	1
	Microtriatoma	2
	Parabelminus	2
Cavernicolini	Cavernicola	2
Rhodniini	Psammolestes	3
	Rhodnius	18
Triatomini	Dipetalogaster	1
	Eratyrus	2
	Hermanlenticia	1
	Linshcosteus	6
	Mepraia	5
	Panstrongylus	13
	Paratriatoma	1
Triatoma	78	
<b>Total</b>		<b>145</b>

Tabla 2. Especies reconocidas en los linajes evolutivos de la tribu Rhodniini, integrada por los géneros *Rhodnius* y *Psammolestes* de acuerdo a Monteiro et al. (2000).

Linaje	Especies
pictipes	<i>R. amazonicus</i> , <i>R. brethesi</i> , <i>R. colombiensis</i> , <i>R. ecuadoriensis</i> , <i>R. pallescens</i> , <i>R. paraensis</i> , <i>R. pictipes</i> , <i>R. stali</i> , <i>R. zeledoni</i>
robustus	<i>R. dalessandroi</i> , <i>R. domesticus</i> , <i>R. milesi</i> , <i>R. montenegrensis</i> , <i>R. nasutus</i> , <i>R. neglectus</i> , <i>R. neivai</i> , <i>R. prolixus</i> , <i>R. robustus</i> , <i>Ps. arthuri</i> , <i>Ps. coreodes</i> , <i>Ps. tertius</i>

Tabla 3. Especies integrantes del género *Triatoma*, clasificadas en grupos, complejos y subcomplejos, de acuerdo a Schofield & Galvão (2009) con modificaciones.

Grupo	Complejo	Subcomplejo	Especies
Rubrofasciata	Phyllosoma	Dimidiata	<i>T. dimidiata</i> , <i>T. hegneri</i> , <i>T. brailovskyi</i> , <i>T. gomeznunezi</i>
		Phyllosoma (=Meccus)	<i>T. bassolsae</i> , <i>T. bolivari</i> , <i>T. longipennis</i> , <i>T. mazzotti</i> , <i>T. mexicana</i> , <i>T. pallidipennis</i> , <i>T. phyllosoma</i> , <i>T. picturata</i> , <i>T. ryckmani</i>
	Flavida	<i>T. flavida</i> , <i>T. bruneri</i> , <i>T. obscura</i>	
	Rubrofasciata	<i>T. amacitiae</i> , <i>T. bouvieri</i> , <i>T. cavernicola</i> , <i>T. leopoldi</i> , <i>T. migrans</i> , <i>T. pugasi</i> , <i>T. rubrofasciata</i> , <i>T. sínica</i>	
	Protracta	<i>T. barberi</i> , <i>T. incrassata</i> , <i>T. neotomae</i> , <i>T. nitida</i> , <i>T. peninsularis</i> , <i>T. protracta</i> , <i>T. sinaloensis</i>	
	Lecticularia (=Nesotriatoma)	<i>T. gerstaeckeri</i> , <i>T. indictiva</i> , <i>T. lecticularia</i> , <i>T. recurva</i> , <i>T. rubida</i> , <i>T. sanguisuga</i>	
Dispar	Dispar		<i>T. boliviana</i> , <i>T. carrioni</i> , <i>T. dispar</i> , <i>T. nigromaculata</i> , <i>T. venosa</i>
Infestans	Infestans	Brasiliensis	<i>T. brasiliensis</i> , <i>T. b. melanosoma</i> , <i>T. juazeirensis</i> , <i>T. melanica</i> , <i>T. petrochiae</i> , <i>T. lenti</i> , <i>T. sherlocki</i>
		Infestans	<i>T. delpontei</i> , <i>T. infestans</i> , <i>T. platensis</i>
		Maculata	<i>T. arthurneivai</i> , <i>T. maculata</i> , <i>T. pseudomaculata</i> , <i>T. wygodzinskyi</i>
		Matogrossensis	<i>T. baratai</i> , <i>T. costalimai</i> , <i>T. deaneorum</i> , <i>T. guazu</i> , <i>T. jatai</i> , <i>T. jurbergi</i> , <i>T. matogrossensis</i> , <i>T. vanda</i> , <i>T. williami</i>
		Rubrovaria	<i>T. carcavalloi</i> , <i>T. circummaculata</i> , <i>T. klugi</i> , <i>T. limai</i> , <i>T. oliverai</i> , <i>T. rubrovaria</i>
	Sordida	<i>T. garciabesi</i> , <i>T. guasayana</i> , <i>T. patagonica</i> , <i>T. sordida</i>	
	Spinolai (=Mepraia)	<i>T. breyeri</i> , <i>T. eratyrsiformis</i> , <i>M. spinolai</i> , <i>M. gajardo</i> , <i>M. parapatrica</i>	
Sin asignar grupo			<i>T. melanocephala</i> , <i>T. tibiamaculata</i> , <i>T. vitticeps</i>

## **Origen Evolutivo de la subfamilia Triatominae**

Existe un gran debate acerca del origen evolutivo de los triatomíneos. La principal pregunta que se intenta responder es si la subfamilia Triatominae es monofilética o polifilética. La respuesta a esta pregunta está ligada a cuantas veces surgió en la evolución la hematofagia. El surgimiento de la hematofagia en cierto grupo de predadores es seguido por la adaptación a diferentes hábitats (teoría monofilética), o por lo contrario, distintas especies de predadores se adaptaron a diferentes hábitats y luego desarrollaron la hematofagia independientemente (teoría polifilética) (Schofield & Galvão 2009).

Por un lado evidencias a nivel de secuencias del ADN sostienen un origen monofilético del grupo hace 95 millones de años (MA). Esta estimación coincide con la formación del continente sudamericano, lo cual a su vez explicaría la distribución casi exclusivamente neotropical de los triatomíneos (Bargues et al. 2000, Gaunt & Miles 2002). El origen de la subfamilia Triatominae estaría representado por el nodo de la separación entre las tribus Triatomini y Rhodniini. Las otras tribus, Bolboderini y Cavernicolini estarían más emparentadas con Rhodniini (Weirauch & Munro 2009, Patterson & Gaunt 2010, Hwang & Weirauch 2012). A favor de esta hipótesis se argumenta que todas las familias o subfamilias donde se observa hematofagia son monofiléticas (Patterson & Gaunt 2010).

Por otro lado, los autores que sugieren un origen polifilético de la subfamilia Triatominae propone que la hematofagia es una convergencia evolutiva que surge en diversas ocasiones en distintos linajes con hábitos predatorios de la familia Reduviidae (Schofield & Galvão 2009). Inicialmente se propuso un origen polifilético debido a las grandes diferencias morfológicas y fisiológicas entre las tribus Rhodniini y Triatomini (Schofield 1988; Catalá 1997, Ribeiro et al. 1998). Luego se publicaron evidencias a nivel de secuencia de ADN que apoyaron el polifiletismo sugiriendo que las dos tribus se originan de grupos distintos dentro de Reduviidae (de Paula et al. 2005, Schofield & Galvão 2009). El argumento fundamental de la teoría polifilética radica en que la hematofagia surge de un proceso paso a paso. El estado ancestral sería un redúvido predador libre. Un primer paso hacia la hematofagia es su especialización a preda en nidos o viviendas de sus presas. Luego se convertiría en un hematófago facultativo, para por último desarrollar la hematofagia obligatoria. Este proceso con tantas etapas, sugiere que la hematofagia puede haberse desarrollado en diferentes oportunidades en los distintos linajes, y por ende conformando un grupo polifilético (Schofield & Galvão 2009).

Recientemente se planteó una tercera visión acerca del origen de los triatomíneos, la cual sostiene un origen parafilético. La subfamilia Triatominae sería parafilética con respecto al género *Opisthacidius*, integrante de la subfamilia Reduviinae (Hwang & Weirauch 2012). Es decir que la hematofagia pudo haber evolucionado una o dos veces entre los redúvidos predadores. En el análisis presentado por estos autores se observa a la subfamilia Triatominae subdividido

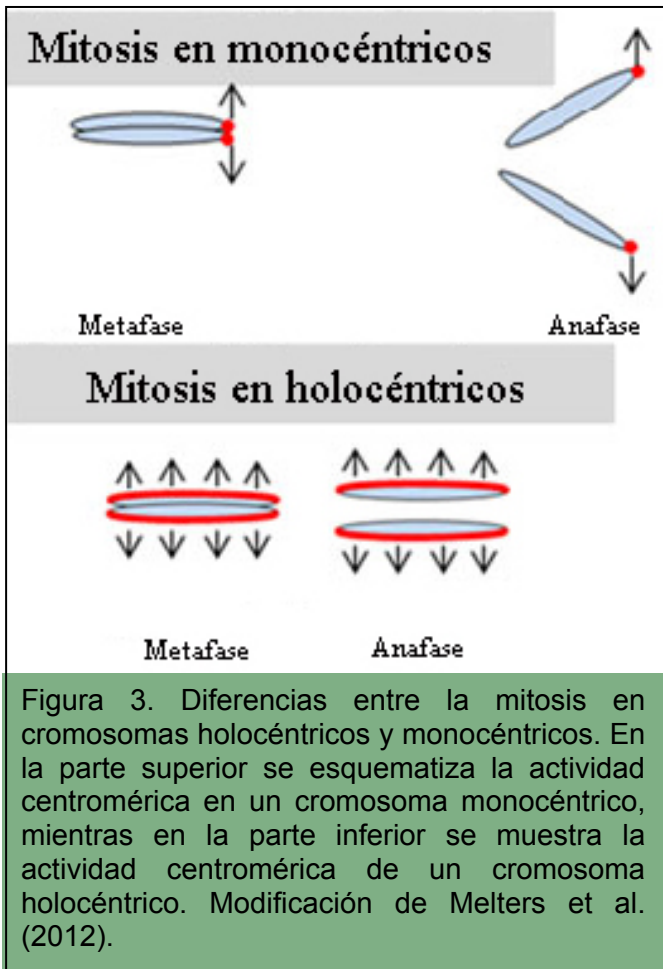
en dos clados, por un lado la tribu Triatomini y por el otro la tribu Rhodniini junto con el género *Opisthacidius*. Otro aporte del mismo trabajo fue el desarrollo de un nuevo reloj molecular que dató el origen de la subfamilia Triatominae (+*Opisthacidius*) en 24 a 32 MA (Oligoceno). Por lo tanto se establece que el surgimiento de los triatominos es posterior a la formación de Sudamérica, y que coincide con una radiación de mamíferos y aves neotropicales (Hwang & Weirauch 2012).

### **Citogenética de triatominos**

Además de la importancia sanitaria de los triatominos, este grupo de insectos brinda una gran oportunidad a los citogenetistas debido a la naturaleza holocéntrica de sus cromosomas y por su comportamiento meiótico particular. Estos cromosomas poseen la particularidad de tener centrómero no localizado o difuso, y como consecuencia, no se observa una constricción primaria (Hughes-Schrader & Schrader 1961).

Si bien no se encuentran frecuentemente, los cromosomas holocéntricos no sólo están presentes en los heterópteros como los triatominos. Están descritos para casi todos los taxa eucariotas, con la excepción de equinodermos y cordados, incluyendo protistas, animales y plantas, siendo *Caenorabditis elegans* la especie más utilizada para el estudio de estos cromosomas (Mandrioli & Manicardi 2012). Recientemente se ha sugerido que es un estado derivado, surgido en la evolución animal unas nueve veces. Por lo tanto su presencia dispersa puede ser resultado de convergencia evolutiva (Melters et al. 2012). Sin embargo no se puede descartar la hipótesis que sugiere a los cromosomas holocéntricos como ancestrales. Según la cual los cromosomas holocéntricos tienen la ventaja de que ante roturas de doble cadena los fragmentos continúan segregando (ya que poseen actividad cinética en las divisiones celulares) y se previene así la pérdida de material genético. Pero la prevalencia de los cromosomas monocéntricos en la escala eucariota sugiere que las ventajas que puedan ofrecer los cromosomas holocéntricos son contrarrestadas por otras desventajas. Probablemente estas desventajas estén relacionadas con la segregación de los cromosomas recombinantes durante la meiosis (Mandrioli & Manicardi 2012).

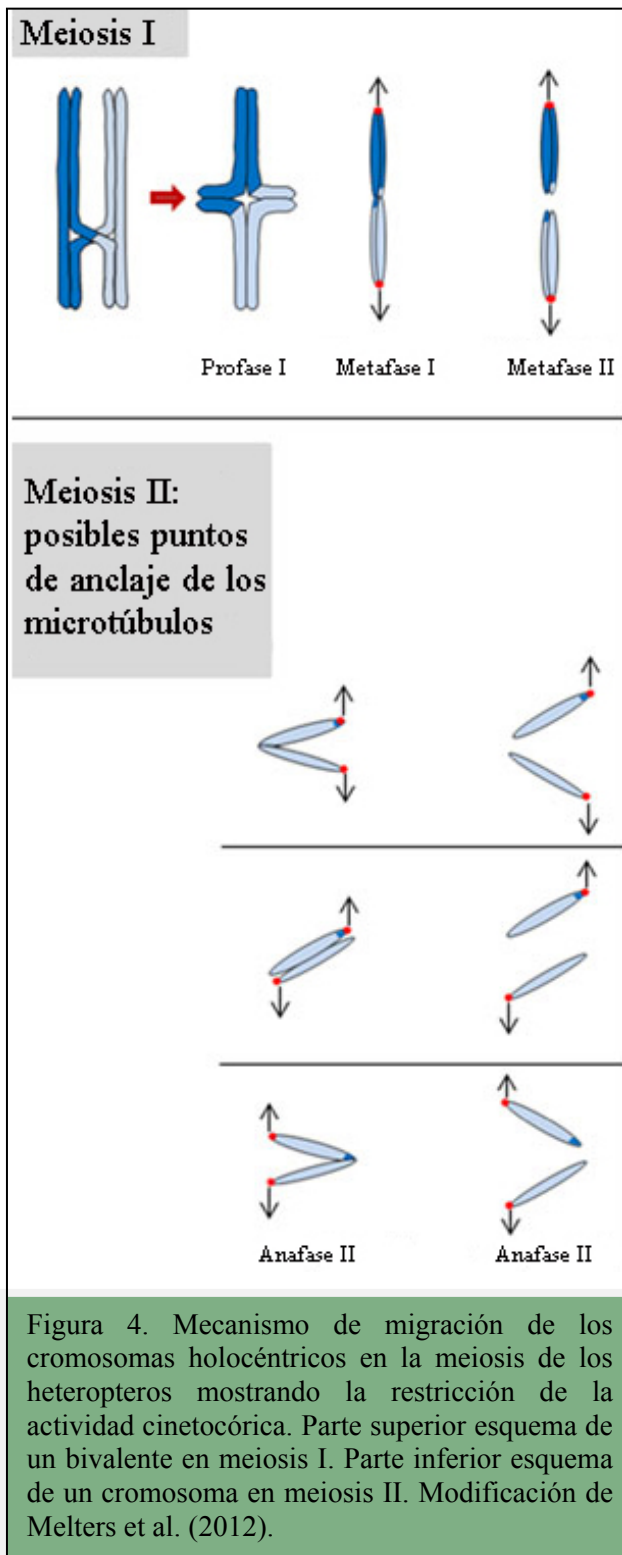




El comportamiento mitótico de los cromosomas holocéntricos es algo diferente al observado en presencia de cromosomas monocéntricos. Esto se debe a que las cromátidas hermanas en anafase migran paralelas al eje de división (White 1973) (Figura 3). En meiosis el comportamiento es aún más distinto, ya que la resolución del quiasma implica un problema geométrico. Los distintos organismos con cromosomas holocéntricos han desarrollado diferentes mecanismos para asegurar una meiosis exitosa. En el caso de los heterópteros existe un proceso llamado restricción de la actividad cinética (Melters et al. 2012) (Figura 4) que consiste en que la actividad cinética se localice sólo en una pequeña región del cromosoma cercana a uno de los dos telómeros (Pérez

et al. 1997). Generalmente en Heteroptera, los bivalentes muestran un solo quiasma, que puede estar colocado en cualquier parte del cromosoma, y no está terminalizado (Panzera et al. 2010).

En los cromosomas holocéntricos de Heteroptera también existen diferencias entre los cromosomas sexuales y los autosomas en relación a su comportamiento meiótico. La primera división meiótica (meiosis I) es reduccional para los autosomas y ecuacional para los sexuales. Además, los cromosomas sexuales son aquiasmáticos y se comportan como univalentes en la meiosis I (Pérez et al. 1997). Por otro lado, ya que cualquiera de los dos extremos puede generar actividad cinética, los autosomas tienen dos y tres posibles orientaciones en metafase I y II respectivamente (Figura 4). Mientras que los sexuales tienen dos y tres posibles orientaciones en metafase I y II respectivamente (Pérez et al. 1997, 2000). Se ha demostrado que existe una actividad cinética inversa, es decir, el extremo activo en meiosis I es inactivo en meiosis II (Pérez et al. 2000). Pese a estas diferencias, la meiosis I de los cromosomas sexuales y la meiosis II de los autosomas son similares en comportamiento, lo cual sugiere un mecanismo común determinado por la cantidad de cromátidas en los cromosomas a ser segregados (Pérez et al. 2000). Se han descrito los cariotipos de 80 especies de triatomíneos (Panzera et al. 2010). Todos ellos presentan cromosomas de pequeño y en general de similar tamaño, con una escasa diferenciación longitudinal, lo cual dificulta enormemente su análisis citogenético. Una característica singular de los triatomíneos es la homogeneidad en su número cromosómico, el cual



varía entre 21 y 25 cromosomas en los machos. El número de 20 autosomas (A) es el más frecuente, con solo tres excepciones (*T. nitida*, *P. megistus* y *T. rubrofasciata*). La variación en el número diploide es mayormente causada por la existencia de tres sistemas de cromosomas sexuales: XY,  $X_1X_2Y$ , y  $X_1X_2X_3Y$  (en machos) (Panzera et al. 2010). Ueshima (1966) ha propuesto que 20 autosomas es el carácter ancestral en los triatominos, siendo las fusiones y fisiones cromosómicas los mecanismos principales de variación, al igual que lo sugerido para otros grupos de Heteroptera (Ueshima 1966, Papeschi & Bressa 2006, Poggio et al. 2012). Sin embargo la homogeneidad del número diploide revela una baja ocurrencia de estos reordenamientos cromosómicos, contrariamente a lo pensado para los cromosomas holocéntricos. Una hipótesis que intenta explicar la baja frecuencia de estos reordenamientos en triatominos es que ellos tengan consecuencias negativas, debido al comportamiento diferencial en meiosis de los cromosomas sexuales y de los autosomas. Usualmente los univalentes o fragmentos cromosómicos se asocian a los cromosomas sexuales, afectando su segregación por lo que se producen gametos con variaciones tanto en el número de autosomas como de cromosomas sexuales. Por ello se sugiere que la constancia en el

número cromosómico no es un reflejo de una estabilidad genómica sino el resultado de una fuerte presión selectiva (Pérez et al. 2004).

Con respecto a los cromosomas sexuales, la hipótesis más aceptada es que el sistema XX/XY es el ancestral en la subfamilia Triatominae. El origen de los sistemas sexuales múltiples se debería a la fragmentación del cromosoma X ancestral (Ueshima 1966). Sin embargo la homeología tanto de los cromosomas X como de los cromosomas Y no ha sido comprobada en

las distintas especies de triatominos. El análisis mediante bandeo C ha mostrado una gran variabilidad en la composición de los cromosomas X, lo cual sugiere que podrían existir otros reordenamientos cromosómicos involucrados en la formación de los sistemas múltiples. Por ejemplo la ocurrencia de reordenamientos autosómicos involucran la formación de fragmentos cromosómicos que posteriormente se comportan como cromosomas sexuales múltiples (Pérez et al. 2004).

Debido a todo lo mencionado anteriormente acerca de las características de estos cromosomas, el análisis citogenético en especies con cromosomas holocéntricos se centra fundamentalmente en encontrar marcadores cromosómicos capaces de revelar variabilidad y como consecuencia analizar su evolución entre distintas especies. Así, nuestro grupo de investigación ha logrado optimizar el uso de diferentes marcadores cromosómicos en la subfamilia Triatominae. La aplicación del bandeo C nos permitió detectar una gran variabilidad, tanto inter como intraespecífica, en la cantidad, tamaño, localización y comportamiento de la heterocromatina constitutiva durante las divisiones meióticas (Panzera et al. 2010). La cantidad de heterocromatina varía entre 0 y 45% del total del complemento autosómico (Panzera et al. 1995, 1998). También el tamaño de las bandas heterocromáticas presenta aún mayor variación, siendo ausentes o diminutas en especies del género *Rhodnius*, u ocupando el 80% del cromosoma en el caso de *T. nitida*. A su vez los bloques pueden encontrarse en uno o ambos extremos cromosómicos, tanto en uno como en todos los pares autosómicos (Panzera et al. 2010). Este marcador ha sido muy útil para la identificación de especies crípticas (Panzera et al. 1997, 2006) y en la detección de variaciones poblacionales en los tres géneros principales: *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus* (Panzera et al. 1992, 2004, Pérez et al. 2002, Gómez-Palacio et al. 2008, 2012). En relación a los cromosomas sexuales, todas las especies de triatominos poseen un cromosoma Y heterocromático, mientras que el cromosoma X es heterocromático solo en algunas especies (Panzera et al. 2010). Hay que destacar que el comportamiento de la heterocromatina C durante la profase I temprana también es una importante variable entre especies, observándose distintas configuraciones en los cromocentros. Por último, otro carácter significativo de diferenciación cromosómica en meiosis es la presencia o ausencia de asociaciones heterólogas durante la meiosis. El número y tamaño de los bloques C positivos influye en este carácter, pero no es determinante (Panzera et al. 2010).

La variabilidad encontrada en la heterocromatina C pudo ser contrastada con el tamaño de los genomas de los triatominos, mediante la aplicación de la citometría de flujo láser. Esta técnica permitió determinar que los genomas de los triatominos difieren en su contenido haploide de ADN en cuatro veces, entre 0.7 pg y 2.8 pg. Sin embargo, la media hallada es muy similar a la propuesta para todos los heterópteros. Los resultados mostraron que el género *Triatoma* es el más variable en su tamaño genómico, mientras el género *Rhodnius* se presentó como el más

constante (Panzera et al. 2007). Considerando entonces, que los triatomíneos poseen similares complementos cromosómicos (entre 21 y 25 cromosomas), la gran variación encontrada en la cantidad de ADN genómico debería reflejar diferencias en el número y tipo de secuencias que contienen. Entre especies filogenéticamente cercanas hay una correlación positiva entre el tamaño genómico y la cantidad de heterocromatina, cuantificada por bandeos C. Mientras que en especies evolutivamente más distantes, las diferencias en la cantidad de ADN involucran además diferencias en la cantidad de eucromatina (Panzera et al. 2007).

La búsqueda de otros marcadores cromosómicos llevó a la implementación de la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) para el mapeo cromosómico de familias génicas en triatomíneos. Como por ejemplo el análisis de la localización del cluster de ADN ribosomal (ADNr) 45S. Este cluster incluye una región intergénica o espaciador no transcrito (IGS o NTS), tres genes de ADNr, el 18S, 5,8S y 28S (en dirección 5'-3'), separados entre sí por dos espaciadores transcritos internos (ITS- 1 e ITS- 2). El análisis del ADNr 45S en unas pocas especies de triatomíneos mostró una llamativa variabilidad entre especies (Severi-Aguiar & Azeredo-Oliveira 2005, Morielle-Souza & Azeredo-Oliveira 2007, Bardella et al. 2010). Sin embargo, estos autores utilizaron una sonda heteróloga sintetizada a partir del genoma de *Drosophila melanogaster*, por lo que su aplicación en triatomíneos exhibió en muchos casos señales de hibridación no específicas. Por ello, recientemente generamos en nuestro laboratorio una sonda del gen 18S (incluido en el cluster ribosomal 45S) a partir del genoma de *T. infestans*. Resultados previos de nuestro grupo utilizando esta sonda muestran una inusual variación poblacional en *T. infestans*, no reportada hasta la fecha en ninguna especie de Hemiptera (Ferreiro 2011). En conclusión, los resultados publicados por otros autores, así como los obtenidos por nuestro grupo, permiten asegurar la utilidad de este marcador como una herramienta eficaz para detectar variabilidad tanto interespecífica como poblacional. Además el análisis inter-específico de la localización del cluster ribosomal ha sido aplicado para establecer relaciones de parentesco e inferencias evolutivas en diferentes grupos de insectos (Hirai et al. 1996, Roy et al. 2005, Cabrero & Camacho 2008, Almeida et al. 2010, Nguyen et al. 2010). Por lo que el análisis de un amplio número de especies en la subfamilia Triatominae nos permitirá determinar si este marcador cromosómico se encuentra conservado o es variable, y en función de ello aportar nuevos conocimientos sobre las relaciones filogenéticas establecidas para la subfamilia. En la presente tesis se utilizará el cluster ribosomal 45S como un marcador cromosómico, en un extenso número de especies y poblaciones, con el fin de analizar la evolución cariotípica de la subfamilia Triatominae.

# Objetivos



## Objetivo general

Analizar la evolución cariotípica de la subfamilia Triatominae (Hemiptera, Reduviidae).

## Objetivos específicos

1. Analizar la variabilidad inter-específica de la localización cromosómica del cluster ribosomal 45S, en 71 especies pertenecientes a ocho géneros de la subfamilia Triatominae, mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH).
2. Analizar la variabilidad intra-específica de la localización cromosómica del cluster ribosomal 45S en *Rhodnius prolixus*, *R. pallescens*, *R. ecuadoriensis*, *Panstrongylus geniculatus*, *P. rufotuberculatus* y *Triatoma dimidiata*, analizando individuos de diferentes poblaciones.
3. Determinar si la posición cromosómica del cluster ribosomal 45S es una característica cromosómica conservada o no entre especies filogenéticamente relacionadas.

# Hipótesis de trabajo



La localización cromosómica del cluster ribosomal 45S es altamente variable en la subfamilia Triatominae, por lo que sería un carácter cromosómico apropiado para discernir mecanismos de cambios cromosómicos y analizar la evolución cariotípica de la subfamilia.



## Materiales

### Estudios inter-específicos

Se analizaron un mínimo de dos individuos por especie, con un total de 71 especies incluidas en tres tribus y ocho géneros de la subfamilia Triatominae. Considerando la disponibilidad de material, en varias especies se analizaron más de una localidad. Los insectos proceden tanto de poblaciones naturales como de insectarios de distintos países de las Américas (ver Tablas 4-6 en resultados). La identificación taxonómica de cada individuo fue realizada por los investigadores que aportaron el material, siguiendo las claves de identificación morfológica de Lent & Wygodzinsky (1979). Para los estudios cromosómicos se utilizaron las gónadas de individuos macho adultos, las cuales fueron extraídas y conservadas en fijador etanol absoluto: ácido acético glacial (3:1) a  $-20^{\circ}\text{C}$ , hasta su procesamiento.

### Estudios intra-específicos

En el caso de *Rhodnius prolixus*, se analizaron 13 individuos de seis poblaciones diferentes, incluyendo la cepa utilizada en el proyecto de secuenciación del genoma completo. El análisis de *R. pallescens*, comprendió a 10 individuos de cuatro poblaciones, estas poblaciones fueron elegidas teniendo en cuenta la variabilidad que presenta esta especie en su heterocromatina C (Gómez-Palacio et al. 2008). De *R. ecuadoriensis* se analizaron nueve individuos de dos poblaciones diferentes. Los individuos provenientes de estas poblaciones tienen diferencias en su hábitat siendo silvestres en Ecuador y domésticas en Perú. Ambas especies del género *Panstrongylus* fueron elegidas debido a su gran distribución geográfica y debido a su polimorfismo cromosómico revelado por bandeo C (Pérez et al. 2002). Cuatro individuos de dos poblaciones fueron analizados de *P. geniculatus*, y ocho individuos de tres poblaciones de *P. rufotuberculatus*. Para análisis de *Triatoma dimidiata*, debido a su variabilidad en el contenido de heterocromatina C de sus diferentes poblaciones y a la existencia de diferentes subespecies, se analizaron 15 individuos de tres poblaciones diferentes.

## Métodos

### *Hibridación in situ fluorescente (FISH)*

#### Obtención de preparaciones citológicas

Para la realización de los preparados los portaobjetos fueron previamente tratados con L-polilisisina 10% para mejorar la adherencia del material. Se disecaron las gónadas de macho en ácido acético al 50 %, y los preparados se obtuvieron mediante el método de aplastado. Las

preparaciones se observaron al microscopio de contraste de fase, y las mejores fueron seleccionadas. Se levantó el cubreobjetos de las preparaciones seleccionadas con nitrógeno líquido y se conservaron en un freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta la aplicación del FISH.

### **Obtención de la sonda**

Para el mapeo del cluster ADNr 45S se utilizó una sonda del gen 18S (uno de los genes incluidos dentro del cluster 45S) de *T. infestans*, previamente diseñada por nuestro grupo, llamada "TR800" (Ferreiro 2011). Dicha sonda fue clonada utilizando un vector plasmídico y sus réplicas fueron conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para su uso se procedió primeramente a la extracción del ADN plasmídico de una de las réplicas bacterianas. Para ello se sembró una de las réplicas congeladas en medio líquido LB con  $50\ \mu\text{g/ml}$  de ampicilina, durante toda la noche a  $37^{\circ}\text{C}$ . Seguidamente se siguieron las especificaciones del kit comercial utilizado para la extracción, Gene JET™ Miniprep kit de Fermentas™. El resultado fue observado en un gel de agarosa al 0,8% y cuantificado utilizando NanoDrop™ 1000 de Thermo Scientific™.

### **Marcaje de la sonda**

El producto obtenido en la extracción de ADN plasmídico, fue marcado utilizando dUTP acoplado con el fluorocromo Cy-3 de General Electric®, mediante el método de Nick-Translation. El kit comercial utilizado fue Nick Translation System de Invitrogen™, según sus especificaciones. Para comprobar que el proceso fue correcto y que la sonda se encontraba en un rango de los entre los 800 y los 300 pares de bases (tamaño óptimo para la hibridación), se corrió en un gel de agarosa al 1%. Luego se procedió a la precipitación de la sonda con etanol absoluto y acetato de sodio a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche y luego se resuspende en agua a una concentración de  $50\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

### **Hibridación**

Se realizó el ensayo de FISH como indica el siguiente protocolo:

#### Fijación de las láminas.

- Fijación de las láminas: Retirar del *freezer* las preparaciones y dejar atemperar. Fijar en un *coppling* con 60 ml de fijador 3:1 (etanol absoluto: ácido acético) por 15 minutos. Eliminar el exceso de fijador
- Deshidratación de las láminas: En un *coppling* con 60 ml de etanol 70 % por 5 minutos y pasaje a etanol 100% por 5 minutos
- Secar las preparaciones a temperatura ambiente (TA) en una gradilla tapada por 30 minutos

#### Pre-tratamiento de las láminas.

- Incubar las preparaciones 30 minutos en estufa a  $55-60^{\circ}\text{C}$

- Tratamiento con RNAasa [100µg/ml] en 2X SSC, en estufa a 37°C por 1 hora.  
Agregar 50µl por preparado y cubrir con film de plástico
- Lavar 3 veces por 5 minutos en *coppling* con 60 ml de 2X SSC
- Tratamiento con pepsina [0,01 mg/ml] (dil 1:100 de 1 mg/ml de pepsina en HCl 0,01 N), en estufa a 37°C por 20 minutos
- Lavar 3 veces por 5 minutos en *coppling* con 60 ml de 2X SSC
- Fijación a TA en 3,7 % de formaldehído diluido en PBS 1X por 10 minutos
- Lavar 3 veces por 5 minutos en *coppling* con 60 ml de 2X SSC

#### Deshidratación de las láminas.

- Deshidratación de las láminas: En un *coppling* con 60 ml de etanol 70 % por 3 minutos y pasaje a etanol 100% por 3 minutos
- Secar 1 hora a TA en una gradilla tapada

#### Preparación de la solución de hibridación (SH).

- Preparación de la SH: utilizar 10µl de SH por lámina que contenga, Formamida 50%, Dextran Sulfato 10%, 2X SSC y 50 µg/µl de sonda marcada.
- Desnaturalización de la solución de hibridación con las sondas a 75°C por 10 minutos
- Inmediatamente colocar el tubo en hielo y dejar por 5 minutos. Centrifugación levemente al finalizar el tiempo
- Agregar 10 µl de la mezcla (SH + sonda) sobre cada preparado
- Desnaturalizar las preparaciones en bloque térmico a 75°C por 6 minutos
- Sellar los preparados con pegamento y colocar en cámara húmeda
- Hibridar *over night* en estufa a 37°C

#### Lavados post-hibridación

- Sumergir las preparaciones en un *coppling* con 60 ml de 2X SSC para retirar los cubreobjetos
- Lavar 2 veces a 42°C por 5 minutos en *coppling* con 60 ml de 2X SSC
- Lavar 2 veces a 42°C por 5 minutos en *coppling* con 60 ml de 0,1X SSC
- Lavar 1 vez a 42°C por 5 minutos en *coppling* con 60 ml de 2X SSC
- Pasar los preparados a un *coppling* con 60 ml de 2X SSC a TA

#### Coloración y montaje de las láminas.

- Colocar en cada preparado 1 gota de DAPI diluido en 2X SSC [2 µg/ml]. Colocar cubreobjetos y dejar en oscuridad por 10 minutos
- Montar definitivamente utilizando VectaShield®, en cubreobjetos de 24 x 24 y sellar con esmalte.



### **Observación de la hibridación**

Las preparaciones citológicas fueron observadas utilizando un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse 80i y las imágenes (una detectando DAPI y otra el fluorocromo) tomadas con una cámara digital de refrigeración Nikon DS-5Mc-U2, utilizando el software Nikon Nis Elements 3.1 Advanced Research. Para cada individuo analizado al menos 30 metafases o diplotenos fueron analizados.

### **Procesamiento de las imágenes**

Para el procesamiento de los resultados obtenidos se utilizó Adobe® Photoshop®7.0. Para cada individuo analizado se realizó la combinación de las imágenes tomadas para la detección de DAPI y del fluorocromo. Luego se procedió a la selección de las mejores imágenes y al procesamiento de cada una de ellas.



El análisis de 71 especies incluidas en ocho géneros mediante FISH determinaron que en la subfamilia Triatominae el cluster ribosomal 45S posee uno o dos loci por genoma haploide, mostrando cuatro patrones de localización cromosómica: en el cromosoma X (16 especies), en dos cromosomas sexuales (14 especies), en un autosoma (39 especies) o en un autosoma y el cromosoma X (1 especie) (Tablas 4-6, Figuras 5-10). El análisis de varios individuos de distintas poblaciones para seis especies reveló que para 4 de ellas (*Rhodnius prolixus*, *R. pallescens*, *Panstrongylus geniculatus* y *Triatoma dimidiata*) el cluster ribosomal 45S se mantiene constante. Mientras que en *R. ecuadoriensis* y *P. rufotuberculatus* se detectó por primera vez variación intraespecífica en la localización del cluster ribosomal 45S. En todos los casos la señal de hibridación fue localizada en posición telomérica o subtelomérica. En algunos individuos se observa variación en la intensidad de las señales de hibridación, involucrando tanto cromosomas homólogos como no-homólogos. Las tablas 4, 5 y 6 presentan los resultados obtenidos en las 71 especies de triatominos, discriminados taxonómicamente según la clasificación sugerida por Schofield & Galvão (2009). En dichas tablas se incluyen, para cada especie, otros caracteres citogenéticos que serán tenidos en cuenta en la discusión.

## Tribu Rhodniini

Se analizaron 13 especies, 12 del género *Rhodnius* y 1 del género *Psammolestes*, todas ellas con un sistema sexual XX/XY. En *R. colombiensis*, *R. nasutus* (Fig. 5d), *R. prolixus* (Fig. 5f) y *R. robustus* (Fig. 5e) el cluster ribosomal 45S se localizó en el cromosoma X. Mientras en *R. domesticus*, *R. neivai* (Fig. 5a), *R. neglectus* (Fig. 5b), *R. milesi* (Fig. 5c), *R. pictipes* (Fig. 6a), *R. stali* (Fig. 6b), *R. pallescens* (Fig. 6c), y *Ps. tertius* presentaron el cluster ribosomal 45S en ambos cromosomas sexuales X e Y, siendo la mayoría de las veces la señal de cromosoma Y más pequeña. En *R. ecuadoriensis*, el análisis de dos poblaciones reveló que los genes ribosomales se encuentran en ambas localizaciones: cromosoma X y cromosomas X e Y.

## Tribu Bolboderini

Se analizó una sola especie, *Belminus herreri* la cual presentó el cluster ribosomal 45S en un par autosómico (Fig. 7a).

## Tribu Triatomini

Género *Dipetalogaster*: La única especie integrante del género fue analizada, *D. maxima*, que contiene al cluster ribosomal 45S ubicado en un par autosómico (Fig. 7b).

Género *Eratyrus*: Se analizaron las dos especies integrantes del género, *E. cuspidatus* y *E. mucronatus*. La primera presenta dos loci ribosomales: en uno de sus cromosomas X (X1) y en el cromosoma Y (Fig. 7c). Mientras *E. mucronatus* presenta un único locus ribosomal localizado en uno de sus cromosomas X (Fig. 7d).

Género *Panstrongylus*: En el análisis fueron incluidas seis especies. Todas ellas exhiben un sistema sexual múltiple  $X_1X_2Y$ , con el cluster ribosomal 45S localizado en un par autosómico (Fig. 7f). La única excepción fue una población de *P. rufotuberculatus* donde los individuos presentaron un sistema sexual XY con dos loci ribosomales, uno en cada cromosoma sexual (Fig 7e).

Género *Mepraia*: Dos de las tres especies distribuidas en Chile que integran el género fueron analizadas: *M. gajardoi* y *M. spinolai*. Además estudios morfométricos y de filogenia molecular (Lent & Wygodzinsky 1979, Campos et al. 2013 b) sugieren la inclusión en este género de dos especies distribuidas en Argentina de *Triatoma*: *T. eratyrusiformis* y *T. breyeri*, que también fueron analizadas. En las especies chilenas el cluster ribosomal se encuentra en uno de sus cromosomas X (X<sub>1</sub>) (Fig. 7g). En *M. spinolai* este cromosoma es heterocromático mientras en *M. gajardoi* es eucromático. En *T. eratyrusiformis* y *T. breyeri* los loci ribosomales se encuentran en un par de autosomas (Fig. 7h).

Género *Triatoma*: Se analizaron 44 especies, abarcando los tres Grupos en que se subdivide este género: Dispar, Rubrofasciata e Infestans, y además 3 especies que no están incluidas en ninguno de estos tres grupos.

Grupo Dispar: Se analizó la citogenética de dos especies por primera vez. Estas constan de un cariotipo  $2n= 22$  (20A+XY en machos) y presentaron el cluster ribosomal en el cromosoma X (Fig. 8a).

Grupo Rubrofasciata: Se analizaron 18 especies, pertenecientes a diferentes complejos y subcomplejos. Todas ellas, excepto una especie, poseen el cluster ribosomal en un par autosómico, independientemente de la presencia o ausencia de bandas C autosómicas (Fig. 8b). La especie restante, *Triatoma ryckmani*, mostró el cluster ribosomal 45S en uno de sus cromosomas X (Fig. 8c).

Grupo Infestans: El análisis abarcó 28 especies pertenecientes a distintos complejos y subcomplejos. En este grupo se observaron los cuatro patrones de localización del cluster

ribosomal observados en la subfamilia Triatominae: en el cromosoma X, en dos cromosomas sexuales, en un par de autosomas o en un par autosómico y el cromosoma X.

Subcomplejo rubrovaria: Las cuatro especies analizadas poseen el cluster ribosomal en un par autosómico (Fig. 9a).

Subcomplejo brasiliensis: Se analizaron seis especies, de las cuales cinco presentaron el cluster ribosomal en un par autosómico. La única excepción es *T. petrochiae* que posee un locus ribosomal en el cromosoma X (Fig. 9b).

Subcomplejo matogrossensis: Se analizaron cinco especies. *T. costalimai* y *T. guazu* presentan un locus en un par autosómico (Fig. 9c). Mientras *T. matogrossensis*, *T. vanda* y *T. jurbergi* lo poseen en ambos cromosomas sexuales, siendo la señal en el cromosoma Y de menor intensidad (Fig. 9d).

Subcomplejo sordida: Se analizaron las cuatro especies pertenecientes al subcomplejo. Dos de ellas, *T. guasayana* y *T. patagonica* poseen el cluster ribosomal en un par autosómico (Fig. 9f). Las otras dos, *T. sordida* y *T. garciabesi* mostraron dos loci uno en cada cromosoma sexual (Fig. 9e).

Subcomplejo maculata: Tres especies fueron analizadas: *T. pseudomaculata* y *T. wygodzinsky* mostraron el cluster ribosomal en un par autosómico (Fig. 9h), mientras *T. maculata* lo posee en ambos cromosomas sexuales, siendo la señal del cromosoma X más intensa que la del cromosoma Y (Fig. 9g).

Subcomplejo infestans: Las tres especies integrantes de este subcomplejo fueron analizadas, cada una de ellas mostró una localización distinta. *T. platensis* posee el cluster ribosomal en el cromosoma X, *T. delpontei* en un par autosómico y en el cromosoma X (Fig. 9i) y *T. infestans* es polimórfica. Las poblaciones de *T. infestans* se dividen en tres grupos. El grupo Andino posee el cluster ribosomal en un par autosómico y el grupo No Andino en el cromosoma X (Fig. 10).

Especies sin grupo asignado: Las tres especies presentaron distintas localizaciones del cluster ribosomal. *T. vitticeps* en el menor de sus cromosomas X ( $X_3$ ) (Fig. 9l) y en el cromosoma Y, *T. tibiamaculata* en un par autosómico (Fig. 9k), y *T. melanocephala* en uno de sus tres cromosomas X (Fig. 9j).

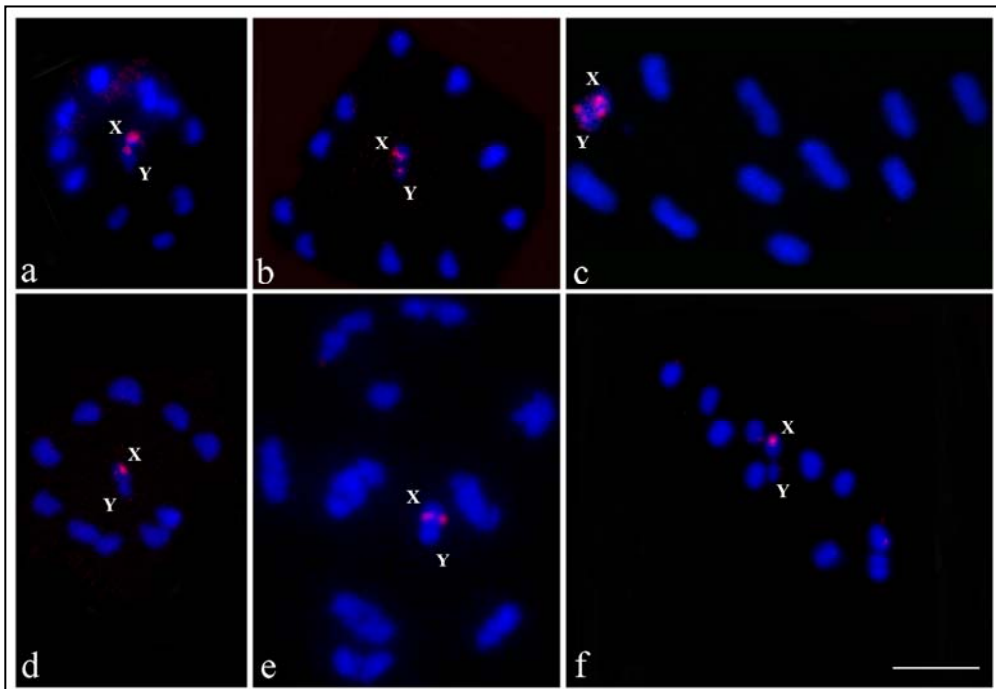


Figura 5. Resultados obtenidos con FISH en especies de la tribu Rhodniini linaje robustus. (a): *R. neivai*, metafase II; (b): *R. neglectus*, metafase II; (c): *R. milesi*, metafase I; (d): *R. nasutus*, metafase II; (e): *R. robustus*, diploteno; (f): *R. prolixus*, metafase II. Barra = 10 $\mu$ m.

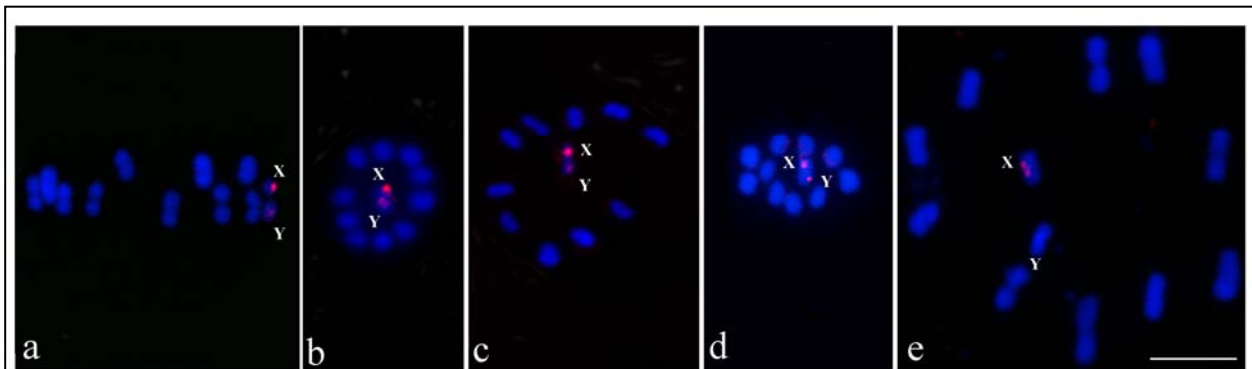


Figura 6. Resultados obtenidos con FISH en especies de la tribu Rhodniini linaje pictipes. (a): *R. pictipes*, metafase II; (b): *R. stali*, metafase II; (c): *R. pallescens*, metafase II, (d): *R. ecuadoriensis* de Ecuador, metafase II; (e): *R. ecuadoriensis* de Perú, metafase I. Barra = 10  $\mu$ m.

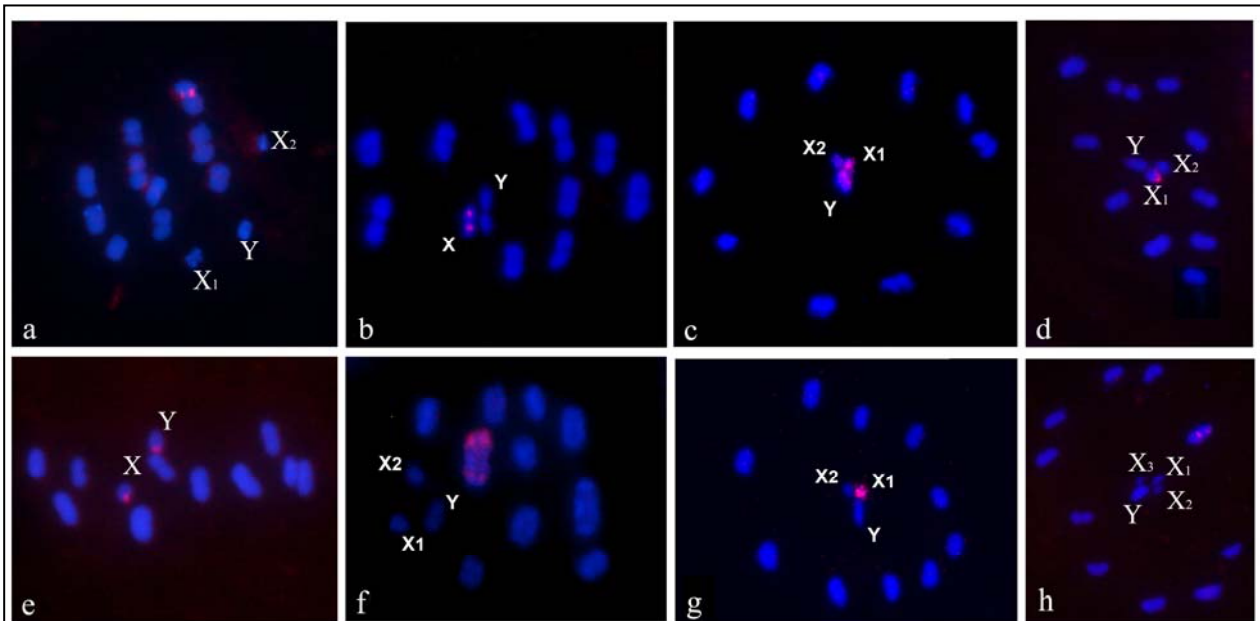


Figura 7. Resultados obtenidos con FISH en especies de las tribus Bolboderini y Triatomini. (a): *B. herreri*, metafase I; (b): *D. maxima*, metafase I; (c): *E. cuspidatus*, metafase II; (d): *E. mucronatus*, metafase II; (e): *P. rufotuberculatus* de Bolivia, metafase II; F: *P. chinai*, metafase I; (g): *M. spinolai*, metafase II; (h): *T. eratyrisiformis*, metafase II.

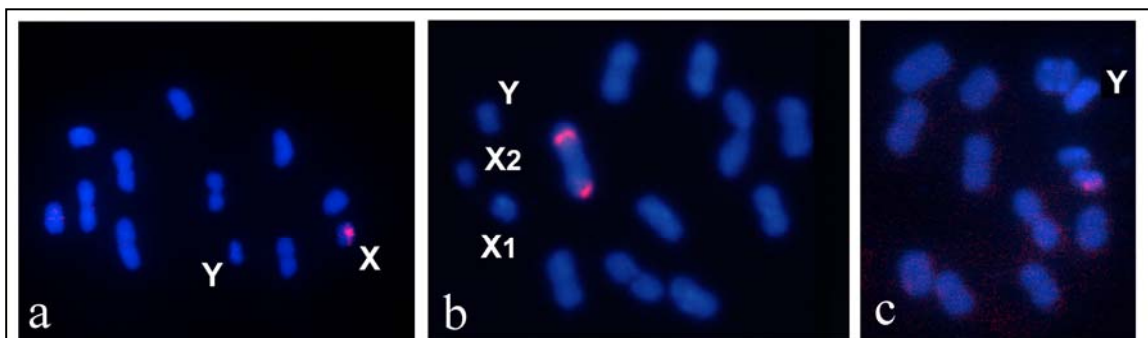


Figura 8: Resultados obtenidos con FISH en especies del género *Triatoma*, grupos dispar y rubrofasciata. (a): *T. carrioni*, metafase II; (b): *T. dimidiata*, metafase I; (c): *T. rykmani*, metafase I.

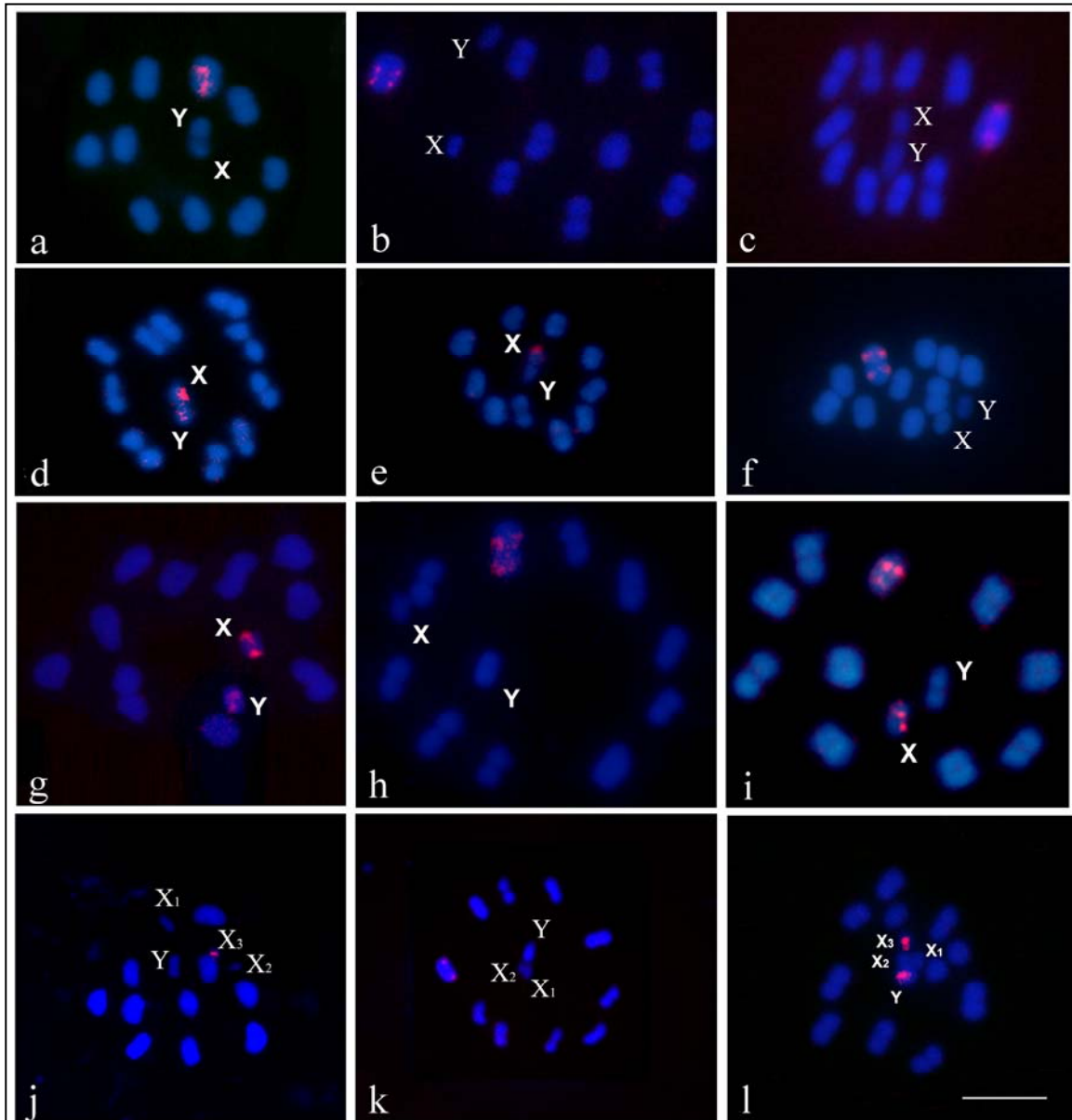


Figura 9. Resultados obtenidos con FISH en especies del género *Triatoma*, grupo Infestans. (a): *T. rubrovaria*, metafase I; (b): *T. brasiliensis*, metafase I; (c): *T. guazu*, metafase I; (d): *T. matogrossensis*, metafase II; (e): *T. sordida*, metafase II; (f): *T. patagonica*, metafase I; (g): *T. maculata*, metafase I; (h): *T. pseudomaculata*, metafase I; (i): *T. delpontei*, metafase I; (j): *T. melanocephala*, metafase II, (k): *T. tibiamaculata*, metafase II, (l): *T. vitticeps*, metafase II. Barra = 10  $\mu$ m.

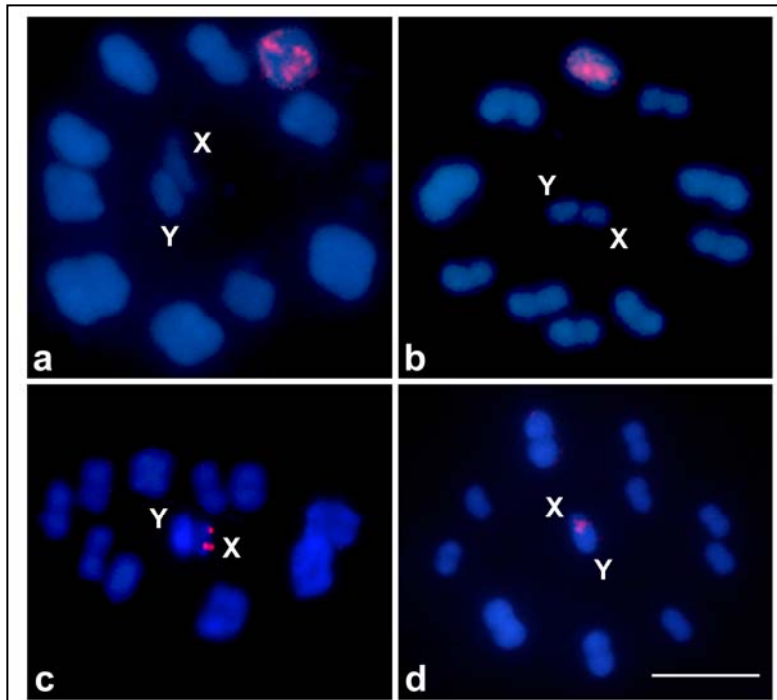


Figura 10: Resultados obtenidos con FISH en *T. infestans*, donde se observa su variabilidad intra-específica. (a): Grupo Andino, metafase I; (b): Grupo andino, metafase II; (c): Grupo no-Andino, metafase I; (d): Grupo no-Andino, metafase II. Barra=10 $\mu$ m.



Tabla 4: Resultados obtenidos con FISH utilizando una sonda del cluster ribosomal 45S en las tribus Rhodniini y Bolboderini. Todas las especies de Rhodniini tienen un número cromosómico de  $2n= 22$  (XX/XY), mientras que *Belminus herrerii* tiene un  $2n= 23$  ( $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ ). En todas las especies el cromosoma X carece de heterocromatina C. S= silvestre, P= peridomicilio, D= domicilio, ND= no determinado.

Especie	Heterocromatina C autosómica	Localización del cluster 45S ADNr	Origen geográfico
<b>Tribu Rhodniini</b>			
<b>Linaje Robustus</b>			
<i>R. domesticus</i>	Si	Cromosomas X e Y. Señal pequeña en cromosoma Y	Brasil, Santa Catarina. S
<i>R. nasutus</i>	Puntiformes en varios pares autosómicos	Cromosoma X	Insectario Instituto Evandro Chagas (IEC) (Pará, Brasil). Origen: ND
<i>R. neglectus</i>	No	Cromosomas X e Y. Señal pequeña en cromosoma Y	Brasil, Minas Gerais, Uberaba. S
<i>R. neivai</i>	No	Cromosomas X e Y. Señal pequeña en cromosoma Y	Insectario Fiocruz (Rio de Janeiro, Brasil). Origen: Venezuela, Maracay. P
<i>R. milesi</i>	No	Cromosomas X e Y. Señal pequeña en cromosoma Y	Insectario IEC (Brasil). Origen: Brasil, Pará, Bragança. S
<i>R. prolixus</i>	No	Cromosoma X	Insectario CDC (Atlanta, USA). Origen: Colombia Colombia, Casanare. S Guatemala, Las Palmas. D Colombia, Magdalena, Santa Marta, Kasakúmake. D Insectario Fiocruz (Brasil). Origen: Venezuela, Cojedes. S
<i>R. robustus</i>	No	Cromosoma X	Insectario Fiocruz (Brasil). Origen: Perú, Loreto. S
<i>Ps. tertius</i>	No	Cromosomas X e Y. Señal pequeña en cromosoma Y	Insectario Araraquara (São Paulo, Brasil). Origen: Brazil, Ceará, Spirito Santo. S

Tabla 4 (continuación)

Especie	Heterocromatina C autosómica	Localización del cluster 45S ADNr	Origen geográfico
<b>Linaje Pictipes</b>			
<i>R. colombiensis</i>	Puntiformes en 5-6 pares autosómicos	Cromosoma X	Colombia, Tolima, Coyaima, Totarco. S
<i>R. ecuadoriensis</i>	Sin determinar	Cromosomas X e Y Cromosoma X	Insectario Univ. Antioquia (Col.). Origen: Ecuador, Manabí. S Perú, La Libertad, Gran Chimú. D
<i>R. pallescens</i>	Puntiformes en 1 o 2 extremos de casi todos los autosomas	Cromosomas X e Y. Señal pequeña en cromosoma Y	Colombia, Norcasia, Caldas. S Colombia, Magdalena, Santa Marta, San Sebastián de Buena Vista. S Colombia, Magdalena, Santa Marta, Mendiaguaca, S Colombia, Sucre, Galeras. S Panamá, Chilibre. S
<i>R. pictipes</i>	No	Cromosomas X e Y. Señal pequeña en cromosoma Y	Insectario IEC (Brasil). Origen: Brasil, Pará, Bacarena. S
<i>R. stali</i>	No	Cromosomas X e Y.	Insectario Fiocruz (Brasil). Origen: Bolivia, La Paz, Alto Beni. P
<b>Tribu Bolboderini</b>			
<i>B. herreri</i>	sin determinar	Un par autosómico	Insectario CINTROP-UIS (Colombia). Origen: Colombia, Santander, El Carmen. S.

Tabla 5: Resultados obtenidos con FISH utilizando una sonda del cluster ribosomal 45S en distintos géneros, excepto *Triatoma*, de la tribu Triatomini. S= silvestre, P= peridomicilio, D= domicilio, ND= no determinado.

Especie	2n (macho)	Heterocromatina C autosómica	Heterocromatina C en cromosomas X	Localización del 45S ADNr	Origen geográfico
<b>Género <i>Dipetalogaster</i></b>					
<i>D. maxima</i>	20A + XY	No	No	Un par autosómico	México, Baja California, La Paz. S.
<b>Género <i>Eratyrus</i></b>					
<i>E. cuspidatus</i>	20A + X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	No	No	Cromosomas X <sub>1</sub> e Y	Colombia, Sucre, San Onofre. S.
<i>E. mucronatus</i>	20A + X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	Polimórfico. Bloque en un extremo de 0-1 par autosómico.	No	Cromosoma X <sub>1</sub>	Bolivia, La Paz, Apolo.
<b>Género <i>Panstrongylus</i></b>					
<i>P. chinai</i>	20A + X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	Bloques en 1 o 2 extremos de todos los autosomas	En ambos cromosomas X	Un par autosómico	Perú, Lambayeque, Zaña. S.
<i>P. geniculatus</i>	20A + X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	Polimórfico. Bloques en 0-6 pares autosómicos.	En ambos cromosomas X	Un par autosómico	Colombia, Santander Colombia, Antioquia, Amalfi
<i>P. lignarius</i>	20A + X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	Bloques en 1 o 2 extremos de todos los autosomas	En ambos cromosomas X	Un par autosómico	Perú, San Martín, Mallobamba. S.
<i>P. megistus</i>	18A + X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	No	En ambos cromosomas X	Un par autosómico	Insectario Fiocruz (Brasil). Origen: Minas Gerais. Brasil,
<i>P. rufotuberculatus</i>	20A + X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	Bloques en 1 o 2 extremos de 8-10 pares autosómicos	En ambos cromosomas X	Un par autosómico	Colombia, Guajira, Gurnake Colombia, Antioquia, Amalfi
	20A + XY			Cromosomas X e Y	Bolivia, La Paz, Muñecas, Ayata, Camata
<i>P. howardi</i>	20A + X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	Bloques en 1 o 2 extremos de todos los autosomas	En ambos cromosomas X	Un par autosómico	Perú, Lambayeque, Zaña. S.

Tabla 5 (continuación)

Especie	2n (macho)	Heterocromatina C autosómica	Heterocromatina C en cromosomas X	Localización del 45S ADNr	Origen geográfico
<b>Género <i>Mepraia</i></b>					
<i>T. breyeri</i>	20A + X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> Y	Puntiformes en algunos autosomas	Si, al menos en X1	Un par autosómico	Bolivia, Cochabamba, Aiquile, Mataral. S.
<i>T. eratyrsiformis</i>	20A + X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> Y	Sin determinar	Sin determinar	Un par autosómico	Insectario Córdoba (Argentina). Origen: Argentina, Neuquén, Chos Malal
<i>M. gajardoi</i>	20A + X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	Puntiformes en algunos autosomas	No	Un cromosoma X (X <sub>1</sub> )	Chile, Región XV Arica/Parinacota, Caleta Vitor. S.
<i>M. spinolai</i>	20A + X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	Bloques en 1 o 2 extremos de todos los autosomas	Si. Polimórfico para ambos Xs.	Un cromosoma X	Chile, Región III. Copiapó, Inca Oro. P.

Tabla 6: Resultados obtenidos con FISH utilizando una sonda del cluster ribosomal 45S en el género *Triatoma* discriminados por Grupos, Complejos y Subcomplejos. S= silvestre, P= peridomicilio, D= domicilio, ND= no determinado.

Especie	2n (macho)	Heterocromatina C autosómica	Heterocromatina C en cromosomas X	Localización del 45S ADNr	Origen geográfico
<b>Grupo Dispar</b>					
<i>T. boliviana</i>	20A + XY	No	No	Cromosoma X	Bolivia, La Paz, Muñecas. S.
<i>T. carrioni</i>	20A + XY	Puntiformes en 2 pares autosómicos	No	Cromosoma X	Perú, Piura, Ayacuiba. S.
<b>Grupo Rubrofasciata</b>					
<b>Complejo Flavida</b>					
<i>T. flavida</i>	20A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	No	No	Un par autosómico	Cuba, Península Guanahacabibes, Pinar del Río, Cueva Caimanera. S.
<b>Complejo Lenticularia</b>					
<i>T. lecticularia</i>	20A + XY	No	No	Un par autosómico	Insectario Fiocruz. Origen: Valkiria, Oklahoma, USA
<i>T. rubida</i>	20A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	No	No	Un par autosómico	México, Guaymas, Sonora.
<b>Complejo Phyllosoma</b>					
<i>T. dimidiata</i>	20A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	Puntiformes en ambos extremos cromosómicos de todos los autosomas.	No	Un par autosómico	México, Oaxaca, Nopala. P Guatemala, Jutiapa, Carrizdal. D. Colombia, Magdalena. S.
<i>T. bassolsae</i>	20A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	No	No	Un par autosómico	México, Puebla.
<i>T. longipennis</i>	20A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	No	No	Un par autosómico	
<i>T. mazzottii</i>	20A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	No	No	Un par autosómico	México, Oaxaca, Puerto Escondido. S.
<i>T. pallidipennis</i>	20A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	Polimórfico. Bloque en un extremo de 0-1 par autosómico	No	Un par autosómico	México, Morelos. Cuernavaca. S.
<i>T. phyllosoma</i>	20A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	No	No	Un par autosómico	México, Oaxaca, Santo Domingo. P.
<i>T. picturata</i>	20A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	No	No	Un par autosómico	México
<i>T. ryckmani</i>	20A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	No	No	Cromosoma X	Guatemala, El Progreso. P.

Tabla 6 (continuación)

Especie	2n (macho)	Heterocromatina C autosómica	Heterocromatina C en cromosomas X	Localización del 45S ADNr	Origen geográfico
<b>Complejo Protracta</b>					
<i>T. barberi</i>	20A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	Bloques en ambos extremos de todos los autosomas y	Si, en X <sub>1</sub>	Un par autosómico	México, Queretaro, La Purísima. P.
<i>T. nítida</i>	18A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	Bloques en 2 pares autosómicos grandes	No	Un par autosómico	Guatemala, Quiche, San Andrés, Saycabajá. P.
<i>T. protracta</i>	20A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	Polimórfico. Bloques en 1 o 2 extremos de 8-10 pares autosómicos	Si, en X <sub>1</sub>	Un par autosómico	Insectario Fiocruz (Brasil) Origen: Monte Diablo, California, USA
<b>Grupo Infestans</b>					
<b>Subcomplejo rubrovaria</b>					
<i>T. carcavalloi</i>	20A + XY	No	No	Un par autosómico	Insectario Fiocruz (Brasil). Origen: Rio Grande do Sul. Brasil.
<i>T. circummaculata</i>	20A + XY	No	No	Un par autosómico	Uruguay, Cerro Largo, Santa Aida. S.
<i>T. klugi</i>	20A + XY	No	No	Un par autosómico	Brasil, Rio Grande do Sul, Nova Petrópolis.
<i>T. rubrovaria</i>	20A + XY	No	No	Un par autosómico	Uruguay, Artigas. S.
<b>Subcomplejo brasiliensis</b>					
<i>T. brasiliensis brasiliensis</i>	20A + XY	Bloques en ambos extremos de todos los autosomas	No	Un par autosómico	Brasil, Pernambuco, Terra Nova. P.
<i>T. brasiliensis macromelanosoma</i>	20A + XY	Bloques en ambos extremos de todos los autosomas	No	Un par autosómico	Brasil, Pernambuco, Petrolina.
<i>T. juazeirensis</i>	20A + XY	Bloques en ambos extremos de todos los autosomas	No	Un par autosómico	Brasil, Bahia, Juazeiro.
<i>T. lenti</i>	20A + XY	Bloques en ambos extremos de todos los autosomas	No	Un par autosómico	Brasil, Bahia.

Tabla 6 (continuación)

Especie	2n (macho)	Heterocromatina C autosómica	Heterocromatina C en cromosomas X	Localización del 45S ADNr	Origen geográfico
<i>T. petrochiae</i>	20A + XY	Bloques en ambos extremos de todos los autosomas	No	Cromosoma X	Brasil, Bahia. Petrolina.
<i>T. sherlocki</i>	20A + XY	Bloques en ambos extremos de todos los autosomas	No	Un par autosómico	Insectario Fiocruz (Brasil). Origen: Brasil, Bahia.
<b>Subcomplejo matogrossensis</b>					
<i>T. costalimai</i>	20A + XY	No	No	Un par autosómico	Insectario Fiocruz (Brasil). Origen:
<i>T. guazu</i>	20A + XY	No	No	Un par autosómico	Insectario Fiocruz (Brasil). Origen: Matto Grosso Brasil, Belen
<i>T. jurbergi</i>	20A + XY	No	No	Cromosomas X e Y	Insectario Fiocruz (Brasil). Origen:
<i>T. matogrossensis</i>	20A + XY	No	No	Cromosomas X e Y	Insectario Fiocruz (Brasil). Origen: Brasil, Matto Grosso do Sul, Serra das Arenas.
<i>T. vandae</i>	20A + XY	No	No	Cromosomas X e Y	Insectario Fiocruz (Brasil). Origen: Brasil, Matto Grosso, Rondopolis.
<b>Subcomplejo sordida</b>					
<i>T. garciabesi</i>	20A + XY	No	No	Cromosoma X	Argentina, Salta.
<i>T. guasayana</i>	20A + XY	No	No	Un par autosómico	Bolivia, Boyuibe. S.
<i>T. patagonica</i>	20A + XY	Bloques en 1 o 2 extremos de casi todos los autosomas	Si	Un par autosómico	Argentina, Santiago del Estero, Mitre.
<i>T. sordida</i>	20A + XY	Bloques en 1 o 2 extremos de casi todos los autosomas	Si, polimórfico	Cromosoma X	Brasil, Matto Grosso, São Jose do Povo. P.
<b>Subcomplejo maculata</b>					
<i>T. maculata</i>	20A + XY	Bloques en 1 o 2 extremos de casi todos los autosomas	No	Cromosomas X e Y. Señal pequeña en cromosoma Y	Brasil, Roraima, Boa Vista.
<i>T. pseudomaculata</i>	20A + XY	Bloques en 1 o 2 extremos de 3-4 pares autosómicos.	No	Un par autosómico	Brasil, Ceará, Sobral.
<i>T. wygodzinsky</i>	20A + XY	No	No	Un par autosómico	Brasil, São Paulo, São João da Boa Vista. S.

Tabla 6 (continuación)

Especie	2n (macho)	Heterocromatina C autosómica	Heterocromatina C en cromosomas X	Localización del 45S ADNr	Origen geográfico
<b>Subcomplejo infestans</b>					
<i>T. delpontei</i>	20A + XY	Polimórfico. Bloque en un extremo de 9-10 pares autosómicos.	Si	Un par autosómico y el cromosoma X	Insectario Univ. Córdoba (Arg.). Origen: Argentina, Salta, Rivadavia, La Merced. S. Bolivia, Santa Cruz, Cordillera, Charagua, Tita. S.
<i>T. infestans</i> (grupo Andino)	20A + XY	Polimórfico, en 1 o 2 extremos de 7-10 pares autosómicos.		Un par autosómico	Bolivia, Potosí, Sud Chichas, La deseada. S. Bolivia, Chuquisaca, Sucre, Oropesa, Caraparí. D.
<i>T. infestans</i> (grupo no Andino)	20A + XY	Polimórfico, en 1 o 2 extremos de 2-4 pares autosómicos.	Si	Cromosoma X	Argentina, Catamarca, Palo Blanco. P. Brasil, Paraíba, Monteiro. D. Uruguay, Rivera. P.
<i>T. platensis</i>	20A + XY	Polimórfico. Bloques pequeños en 2-4 pares autosómicos.	Si	Cromosoma X	Uruguay, Paysandú, S. Insectario Univ. Córdoba (Arg.). Origen: Argentina, Córdoba, Cruz del Eje, San Marcos Sierras. S.
<b>Especies sin asignar grupo</b>					
<i>T. melanocephala</i>	20A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> Y	No	No determinado	Cromosoma X <sub>1</sub>	Insectario Fiocruz (Brasil). Origen: ND
<i>T. tibiamaculata</i>	20A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	Puntiformes, en varios pares autosómicos	No	Un par autosómico	Insectario Fiocruz (Brasil). Origen: Brasil, Pará, Belem.
<i>T. vitticeps</i>	20A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> Y	No	Si	Cromosomas X <sub>3</sub> e Y	Insectario Fiocruz (Brasil). Origen: Brasil, Rio de Janeiro





El presente estudio incluye 71 especies pertenecientes a ocho géneros de la subfamilia Triatominae, siendo el registro más extenso hasta ahora realizado en un grupo de Heteroptera sobre la localización del cluster ribosomal 45S. Hasta el presente se disponía de información de 35 especies de ocho diferentes familias (Papeschi & Bressa 2006a,b, Grozeva et al. 2010, 2011, Poggio et al. 2011).

En este trabajo se determinó que el cluster ribosomal 45S posee uno o dos loci por genoma haploide, localizados siempre en posición telomérica o subtelomérica. Respecto a su ubicación en el genoma, se observaron cuatro patrones de localización cromosómica del ADNr: en el cromosoma X, en dos cromosomas sexuales, en un autosoma o en un autosoma y el cromosoma X, siendo la más frecuente la localización sobre un par de autosomas (Tablas 4-6).

Los resultados aquí presentados muestran que los triatominos son un grupo muy variable en la posición cromosómica del ADNr, a pesar de su homogeneidad en el número cromosómico. La gran dinámica observada en la localización del cluster ribosomal 45S en la subfamilia Triatominae permite sacar varias conclusiones importantes acerca de la evolución cariotípica de la subfamilia que serán desarrolladas a lo largo de la discusión. La conclusión más importante es que, al igual que la variación excepcional en los patrones de bandeo C (Panzera et al. 2010), las distintas localizaciones del cluster ribosomal 45S revelan una gran dinámica de cambio en los genomas de las distintas especies de triatominos. Por lo que la hipótesis de homogeneidad cariotípica en triatominos carece de fundamentos a la luz de estos resultados.

## **Comparación entre localización del cluster 45S y otros caracteres citogenéticos**

Para la familia Reduviidae se ha sugerido una correlación entre la localización del cluster ribosomal 45S y el sistema sexual. Donde se enuncia que las especies que poseen un sistema sexual simple XX/XY tendrán el cluster ribosomal en los cromosomas sexuales. Mientras que las especies que poseen sistemas sexuales múltiples poseerán el cluster ribosomal en un par autosómico (Poggio et al. 2011). Sin embargo esta premisa no se cumple en la subfamilia Triatominae ya que especies con sistema sexual simple poseen el cluster ribosomal localizado en distintas localizaciones: en un autosoma (*Triatoma rubrovaria*), en el cromosoma X (*T. platensis*), en ambos sexuales (*T. sordida*) o en un par autosómico y el cromosoma X (*T. delponteí*). Otro ejemplo son las cuatro especies con tres cromosomas X (sistema  $X_1X_2X_3Y$ ),

donde se observan tres distintas ubicaciones del cluster ribosomal: en un autosoma (*T. eratyrisiformis* y *T. breyeri*), en un cromosoma X (*T. melanocephala*) y en un cromosoma X y el cromosoma Y (*T. vitticeps*).

Otra correlación sugerida en varios clados de insectos es entre la localización del cluster ribosomal 45S y la heterocromatina C (Brianti et al. 2009, Oliveira et al. 2010, Cabral de Mello et al. 2011a). Para analizar esta posible correspondencia entre la heterocromatina C y el cluster ribosomal abarcamos especies con diferentes cantidades de heterocromatina C, incluyendo especies con variaciones poblacionales en la cantidad de heterocromatina C (*T. infestans*, *T. dimidiata*, *Panstrongylus geniculatus* y *Rhodnius pallescens*), así como en especies con poblaciones que no presentan variaciones de heterocromatina C (*P. rufotuberculatus*, *R. ecuadoriensis* y *R. prolixus*). Nuestros resultados no muestran tal correspondencia en la subfamilia Triatominae. Es decir, no existe co-localización de ambos marcadores cromosómicos en todas las especies de triatominos. Por ejemplo, especies del género *Panstrongylus* presentan el cluster ribosomal en un par de autosomas, independientemente si éste posee o no heterocromatina C. Quizás el ejemplo más ilustrativo de esta falta de co-localización es *T. nitida*, especie que aunque posee dos cromosomas heterocromáticos, la señal ribosómica se observa en un par autosómico eucromático. Al igual que lo observado para los autosomas, el cluster ribosomal puede estar localizado tanto en cromosomas X heterocromáticos como en eucromáticos.

Los análisis intrapoblaciones de seis especies apoyaron esta falta de correlación, al demostrar que especies con variabilidad en la cantidad de heterocromatina C no presentan variabilidad en la localización del cluster ribosomal 45S (ej.: *R. pallescens*). Y por el contrario, poblaciones de especies con igual patrón de heterocromatina C poseen diferencias en la localización del cluster ribosomal (ej.: *R. ecuadoriensis* o *P. rufotuberculatus*).

Estas evidencias sugieren la existencia de distintas dinámicas evolutivas, o presiones selectivas que gobiernan los cambios en estos dos marcadores de forma independiente, ya que los patrones de variabilidad de uno y otro tampoco están relacionados. De todas formas no podemos descartar una posible interacción entre el cluster ribosomal 45S y secuencias repetidas no reveladas por la técnica de bandeo C. Inclusive podría existir relación entre secuencias repetitivas localizadas en la eucromatina y los genes ribosomales. En algunos insectos existe una clara relación entre los genes ribosomales y secuencias repetitivas tales como microsatélites, secuencias similares a los repetidos teloméricos (Mandrioli et al. 1999a, b, Bizarro et al. 2000), o con elementos transponibles (Jakubczak et al. 1991, Cabrero & Camacho 2008, Nguyen et al. 2010, Cabral de Mello et al. 2011b). Por lo que se ha planteado que estas secuencias juegan un rol muy importante en la ocurrencia de reordenamientos que cambian la posición de los genes ribosomales.

## Variación del cluster ribosomal, evolución y taxonomía

Una de las conclusiones más importantes de esta tesis es la gran dinámica observada en la localización del cluster ribosomal 45S en la subfamilia Triatominae. Los resultados dan cuenta de una gran variabilidad a pesar de la conservación en el número cromosómico. Para facilitar el análisis, discutiré los resultados considerando por separado los distintos agrupamientos de las especies, y luego concluiré para toda la subfamilia.

### ***Tribu Rhodniini***

Esta tribu está integrada por dos géneros, *Rhodnius* y *Psammolestes*, que involucra a 21 especies, la mayor parte de ellas asociadas a palmeras, en las que podría existir una co-evolución de más de 90 millones de años (Gaunt & Miles 2002). En las especies del género *Rhodnius* se observan diferentes grados de domesticación, inclusive algunas de ellas son importantes vectores de la enfermedad de Chagas (Abad-Franch et al. 2009).

Es ampliamente aceptado que Rhodniini es una tribu monofilética originada en la región Paleo-Amazónica (Monteiro et al. 2000, 2002, Hypsa et al. 2002, de Paula et al. 2005, 2007, Abad-Franch & Monteiro 2007). Desde esta región hubieron tres importantes rutas de dispersión: una al este hacia las regiones de Caatinga, Cerrado y el Gran Chaco, otra al norte hacia los llanos del Orinoco, y finalmente al oeste hacia las regiones andinas de Colombia y a Centroamérica (antes del levantamiento montañoso) (de Paula et al. 2007, Abad-Franch & Monteiro 2007). Los datos moleculares concuerdan con dichos datos biogeográficos y sugieren que la tribu presenta dos grandes linajes divergentes: *pictipes* (oeste de los Andes y Amazonas) y *robustus* (este de los Andes) (Monteiro et al. 2000, 2002, Abad-Franch & Monteiro 2007, Abad-Franch et al. 2009) (Tabla 2). Probablemente la especie más ancestral de la tribu sea *R. pictipes*, ya que posee una amplia distribución y ocupa diversos hábitats (Schofield & Galvão 2009).

En comparación con la filogenia ampliamente aceptada, nuestros resultados de 13 especies muestran la existencia de 2 patrones ribosómicos: en el cromosoma X y ambos cromosomas sexuales (Xe Y). Estos 2 patrones se observan en especies de ambos linajes, así como en especies muy cercanas filogenéticamente (como *R. pallescens* y *R. colombiensis*). Esto muestra que las secuencias ribosomales presentan un rápido ritmo evolutivo. Si bien esta alta tasa de cambio no nos permite realizar inferencias filogenéticas basados en la localización del cluster ribosomal 45S, como en otros grupos de insectos (Hirai et al. 1996, Roy et al. 2005, Cabrero & Camacho 2008, Almeida et al. 2010, Nguyen et al. 2010), la monofilia de Rhodniini permite realizar conjeturas acerca del patrón ancestral del cluster ribosomal 45S. Tomando en cuenta que las especies más basales de ambos linajes en las diferentes filogenias moleculares (Monteiro et al. 2000, 2002, de Paula et al. 2007), *R. pictipes*, *R. neivai*, *R. domesticus* o *Ps.*

*tertius*, poseen el cluster ribosomal 45S en ambos cromosomas sexuales, podemos sugerir que este patrón es el ancestral (Figura 11). El carácter derivado (ADNr 45S en el X) se puede explicar simplemente mediante la pérdida del locus ribosomal en el cromosoma Y, como se ha sugerido para otros grupos de insectos (Roy et al. 2005). En apoyo a esta hipótesis *R. pictipes*, considerada la especie más similar al ancestro común de Rhodniini (Dujardin et al. 1999, Lyman et al. 1999, Monteiro et al. 2000, 2002), posee el marcador en ambos cromosomas. Además *R. domesticus* y *R. neivai*, especies consideradas como relictuales y aisladas (Abad-Franch & Monteiro 2007) también poseen dicho patrón. De todas formas no podemos descartar una hipótesis alternativa que sugiera al cluster sólo en el cromosoma X como ancestral. Esta hipótesis implicaría una transferencia parcial o total del cluster ribosomal 45S al cromosoma Y, mediante elementos transponibles (Schubert & Wobus 1985) o mediante reordenamientos cromosómicos causados por recombinación ectópica de regiones heterocromáticas (Hanson et al. 1996). Llamativamente en casi todas las especies que poseen dos loci ribosomales, la señal en el cromosoma Y es mucho menor que la del cromosoma X, seguramente debido a diferencias en el número de copias del cluster ribosomal. El menor número de copias del cluster en el cromosoma Y podría significar de que se trate de un loci ribosómico en crecimiento, apoyando la hipótesis del X ancestral.

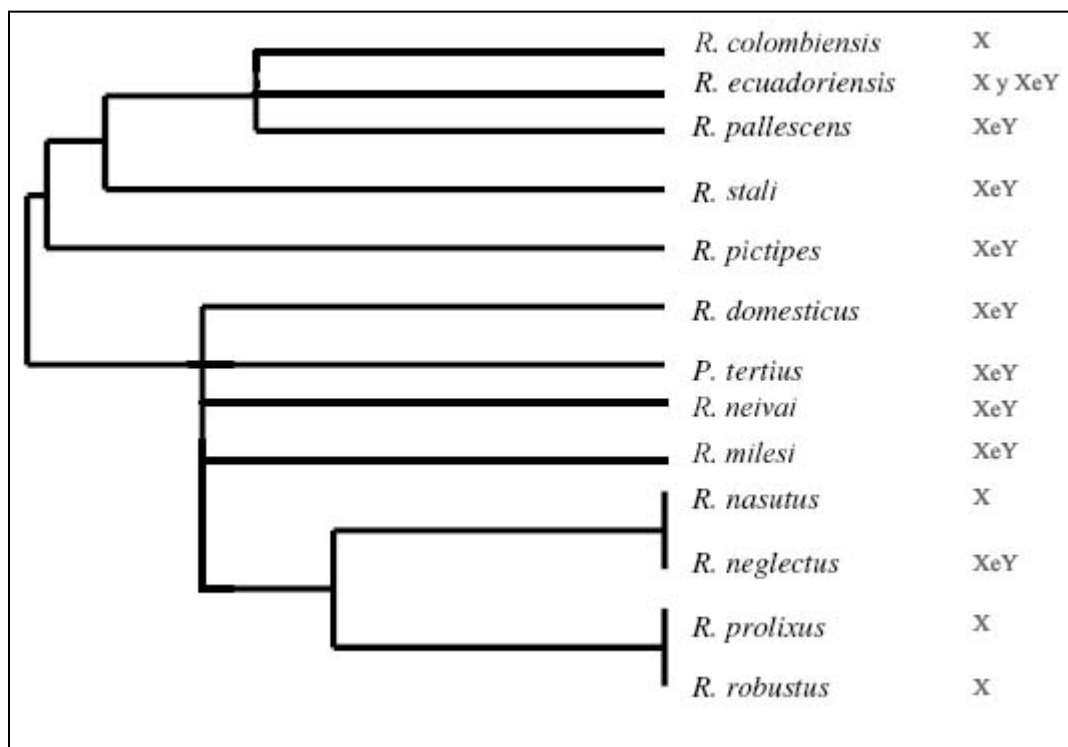


Figura 11. Filogenia de la tribu Rhodniini, modificada de Monteiro et al. (2002). Se muestra a la derecha el patrón de la localización del cluster ribosomal 45S. Los 2 linajes de la tribu presentan ambos patrones ribosómicos.

Es de destacar que las especies de la tribu Rhodniini no presentan el cluster ribosomal en los autosomas, tal como se observa en numerosas especies de la subfamilia Triatominae. Esta menor variabilidad, reducida únicamente a los cromosomas sexuales, podría deberse al origen monofilético de Rhodniini.

Por último en cuanto a las especies elegidas para realizar un estudio de mayor profundidad, incluyendo a varias poblaciones, tres fueron seleccionadas: *R. prolixus*, *R. pallescens* y *R. ecuadoriensis*. *R. prolixus* fue elegida para realizar el estudio poblacional debido a la gran importancia vectorial. Aunque se analizaron varias poblaciones de distintos países y hábitats, incluyendo la cepa que fue utilizada para la secuenciación del genoma, no se encontró variabilidad en la localización del cluster ribosomal. Todas las poblaciones tienen el cluster ribosomal localizado en el cromosoma X. Por lo tanto, los resultados de FISH concuerdan con evidencias moleculares que indican que esta especie es poco variable (Monteiro et al. 2003). *R. pallescens* fue seleccionada para el estudio poblacional debido al polimorfismo observado tanto a nivel citogenético como molecular (Gómez-Palacio et al. 2008, 2012). Se analizaron diferentes poblaciones que abarcaron a los dos citotipos cromosómicos descritos, según su cantidad de heterocromatina constitutiva (Gómez-Palacio et al. 2008). Inesperadamente no se encontró variación, todos los individuos analizados por FISH presentaron el cluster ribosomal 45S ubicado en ambos cromosomas sexuales X e Y. De *R. ecuadoriensis* se analizaron dos poblaciones, una de Perú (La Libertad) y otra de Ecuador (Manabí), que presentaban significativas diferencias a nivel del ADN mitocondrial (Abad-Franch et al. 2003, Abad-Franch & Monteiro 2005). La población de Ecuador presenta dos loci ribosomales, uno en cada cromosoma sexual, mientras que la población del Perú lleva únicamente el cluster ribosomal en el cromosoma X. La divergencia entre los haplotipos mitocondriales sugieren que estos son dos grupos bien diferenciados que inclusive podrían encontrarse en vías de especiación (Abad-Franch et al. 2003, Abad-Franch & Monteiro 2005). Considerando que ambas poblaciones muestran distintas afinidades por el ambiente doméstico y los hábitats silvestres (Villacis et al. 2010, Grijalva et al. 2012), su identificación como distintos grupos genéticos tiene gran importancia epidemiológica a tener en cuenta por los programas de control vectorial (Abad-Franch et al. 2001). El análisis mediante FISH de más poblaciones de *R. ecuadoriensis* en el resto de su distribución, y en sus distintos hábitats, así como el desarrollo de híbridos experimentales, son cruciales para determinar si la variabilidad genética observada refleja polimorfismos intraespecíficos o involucran a diferentes especies.

En conclusión, nuestros resultados de FISH en la tribu Rhodniini muestran una extensa variación en la localización de los loci ribosomales restringida a los cromosomas sexuales. Esta variación revela una dinámica de cambio genómico no detectada con otros caracteres cromosómicos ya que todas las especies de la tribu tienen el mismo número cromosómico ( $2n=$

20A + XX/XY) y similar tamaño genómico (el menor de la subfamilia Triatominae) (Panzera et al. 2007). Enmascarada por una aparente homogeneidad, los genomas de Rhodniini experimentaron cambios durante su evolución, que podrían implicar reordenamientos o transferencia de genes entre los cromosomas sexuales.

### ***Tribu Bolboderini***

Esta tribu está constituida por especies de pequeño tamaño, principalmente silvestres y arborícolas, distribuidas en Centroamérica y el Norte de Sudamérica (Lent & Wygodzinsky 1979, Galvão et al. 2003). Análisis moleculares sugieren que esta tribu está emparentada con la tribu Rhodniini (Patterson & Gaunt 2010).

En este trabajo solo una especie fue analizada, *Belminus herreri*, la cual presentó el cluster ribosomal en un par autosómico. Este patrón del ribosomal es muy distinto a las especies de la tribu Rhodniini, exclusivamente ubicados en los cromosomas sexuales. Sin embargo nuestros resultados podrían apoyar la hipótesis del patrón autosómico como ancestral. Por ello sería de gran interés analizar otras especies de Bolboderini, así como especies de las otras tribus menores como Cavernicolini que también se ha reportado como cercanas a Rhodniini (Hwang & Weirauch 2012).

### ***Tribu Triatomini***

Es la tribu más numerosa y diversa, incluyendo 107 especies agrupadas en 8 géneros (Tabla 1), de los cuales cinco fueron analizados en esta tesis: *Dipetalogaster*, *Eratyrus*, *Mepraia*, *Panstrongylus* y *Triatoma* (Tablas 5 y 6). Su filogenia es muy discutida, e incluso su origen es muy controvertido, ya que algunos autores suponen un origen polifilético (Carcavallo et al. 2000, Schofield & Galvão 2009) mientras que otros apoyan un origen monofilético (Patterson & Gaunt 2010, Hwang & Weirauch 2012). Esta tribu presenta además la mayor variabilidad en cuando a biología y ecología de sus especies. Por ende no es excepcional que haya presentado la mayor variación en triatominos, revelando los cuatro patrones detectados del marcador cromosómico estudiado. La variabilidad encontrada en esta tribu también se observa pese a la poca variación en el número cromosómico, y en algunas especies, también se observaron diferencias en la intensidad de la señal, no solo entre dos loci sino también entre cromosomas homólogos. Al igual que la variación excepcional en los patrones de bandeo C (Panzera et al. 2010), las distintas localizaciones del cluster ribosomal 45S demuestran una gran dinámica en los genomas de las distintas especies de Triatomini. Por lo que la hipótesis de homogeneidad cariotípica en triatominos carece de fundamentos a la luz de estos resultados.

Si analizamos los resultados obtenidos tomando en cuenta los géneros por separado, podemos observar una llamativa conservación del cluster ribosomal 45S en el género *Panstrongylus* pero una extensa variabilidad encontrada en los géneros *Triatoma*, *Mepraia* y *Eratyrus*.

### **Género *Dipetalogaster***

Posee sólo una especie, *D. maxima* endémica de la península de Baja California en México. Se destaca por su gran tamaño corporal y su asociación con lagartijas (Carcavallo et al. 2000). Análisis filogenéticos agrupa esta especie dentro del género *Triatoma*, específicamente con las especies del grupo Rubrofasciata (Hypsa et al. 2002, Marcilla et al. 2002). El análisis de FISH mostró el cluster ribosomal 45S en un par autosómico, similar a lo observado en la amplia mayoría de las especies del grupo Rubrofasciata. Por lo cual, nuestros resultados apoyan los datos filogenéticos que ubican a *D. maxima* dentro del grupo Rubrofasciata.

### **Género *Eratyrus***

*Eratyrus* está integrado únicamente por dos especies, *E. cuspidatus* y *E. mucronatus*, con una amplia distribución geográfica, desde México hasta Bolivia. Se cree que las dos especies surgieron por un evento de vicarianza, debido a la formación de la cordillera de los Andes ocurrida hacia el final del terciario y principios del cuaternario (Carcavallo et al. 2000). En Sudamérica, *E. cuspidatus* se encuentra únicamente al este de la cordillera, mientras que *E. mucronatus* se ubica al oeste de la misma. Por otro lado la presencia de *E. cuspidatus* en Centroamérica y México se puede explicar por eventos de migración posteriores a la formación del istmo de Panamá, posterior al levantamiento de los Andes. Por lo tanto, se puede situar el origen del género y/o un ancestro común de ambas especies en la parte noroeste de Sudamérica (Carcavallo et al. 2000). Los análisis filogenéticos moleculares no demuestran que *Eratyrus* sea un género por sí mismo, y colocan a ambas especies como basales dentro del género *Triatoma* (grupo Rubrofasciata) (Hypsa et al. 2002, Sainz et al. 2004).

Los resultados de FISH revelaron que la localización del cluster ribosomal 45S varía entre ellas. *E. mucronatus* mostró al cluster ribosomal en uno de sus cromosomas X, mientras que en *E. cuspidatus* se observa en uno de los cromosomas X y en el cromosoma Y.

Sin embargo estas especies son idénticas en cuanto a número cromosómico ( $2n=23$ ) y la variación de heterocromatina C se reduce a un par autosómico, heterocromático en *E. mucronatus* y eucromático en *E. cuspidatus*. Es decir que existe variación en la localización del cluster ribosomal a pesar de tener un cariotipo idéntico y escasa variabilidad en el bandeo C. En el caso de *Eratyrus* podríamos asumir que la variabilidad observada se podría deber a un largo

período de aislamiento entre ambas especies. Al ser sólo dos especies las integrantes del género, no es posible discutir acerca de cuál es el patrón plesiomórfico de *Eratyrus*. Tanto la hipótesis de pérdida como la ganancia del cluster ribosomal 45S en el cromosoma Y son perfectamente válidas.

### **Género *Mepraia***

Este género está integrado por cinco especies, tres endémicas de Chile y dos de Argentina. Análisis de secuencias mitocondriales apoyan su parentesco evolutivo y sugieren su separación en dos clados: Argentina y Chile, por eventos de vicarianza debido al levantamiento de los Andes (Campos et al. 2013a). Nuestros datos también reconocen los dos grupos, ya que dos especies chilenas poseen el cluster ribosomal en un cromosoma X, mientras que las especies argentinas lo presentan en un par de autosomas.

Similar a lo observado en el género *Eratyrus*, en el género *Mepraia* un largo período de aislamiento y diferenciación podría explicar la variación en la localización del cluster ribosomal. En las especies de *Mepraia*, el aislamiento habría provocado además una diferenciación en el número de cromosomas X. Las especies endémicas de Chile presentan un sistema sexual  $X_1X_2Y$  y las de Argentina  $X_1X_2X_3Y$  (Panzera et al. 2010).

### **Género *Panstrongylus***

Es el tercer género en importancia epidemiológica, mostrando distintos niveles de domiciliación en sus 14 especies (Dujardin et al. 2000, Patterson et al. 2009). Aunque existen algunas especies asociadas a palmeras, todas ellas se encuentran en nidos terrestres o cavidades de árboles (Gaunt & Miles 2000). Estas 14 especies se distribuyen exclusivamente en América del Sur, excepto dos de ellas, que se detectan también en Centroamérica y México (*P. rufotuberculatus* y *P. geniculatus*) (Schofield & Galvão 2009). Su filogenia es discutida, ya que aunque se distribuyen casi exclusivamente en América del Sur, los análisis moleculares con secuencias nucleares y mitocondriales muestran que las especies de este género están emparentadas con las especies de *Triatoma* de América del Norte (grupo Rubrofasciata) (Hypsa et al. 2002, Marcilla et al. 2002, Patterson et al. 2009). Las especies basales serían *P. rufotuberculatus* o *P. geniculatus*, ambas generalistas y con una amplia distribución geográfica. Se ha sugerido que esta forma ancestral Meso-Americana, se dispersó hacia el sur llegando a Sudamérica, donde debido al levantamiento de los Andes surgieron dos linajes (Schofield & Galvão 2009). La existencia de estos dos linajes, este y oeste de los Andes, es apoyado por análisis morfológicos (Lent & Wygodzinsky 1979), citogenéticos (Pérez et al. 2002) y moleculares (Marcilla et al. 2002).



De las 14 especies que integran este género, seis han sido analizadas en esta tesis. Los resultados obtenidos indican que todas las especies poseen el cluster ribosomal en un par autosómico, con una especie polimórfica. De los 2 linajes de *Panstrongylus* reconocidos, solo hemos podido analizar especies de uno de los clados debido a la falta de material. Por lo cual no podemos descartar que exista variación en este género, ya que es posible que el estudio de las restantes especies de *Panstrongylus* aporte más información sobre la dinámica del cluster ribosomal.

Además se realizó un análisis de varias poblaciones abarcando diferentes localidades, de las especies con mayor extensión geográfica, *P. rufotuberculatus* y *P. geniculatus* de tal manera de incluir las variantes poblacionales de *P. geniculatus* observadas con bandeado C. Los resultados obtenidos mostraron que todas las poblaciones de *P. geniculatus* son homogéneas en cuanto a la localización del cluster ribosomal 45S, ubicándose en un par autosómico. Sin embargo, el análisis de distintas poblaciones de *P. rufotuberculatus* mostró la existencia de variabilidad intra-específica. Mientras individuos de distintas poblaciones colombianas poseen el patrón autosómico, se halló una población boliviana que presentó dos loci ribosomales, ubicados en los cromosomas sexuales X e Y. La variabilidad de esta población abarcó no solo la localización del cluster ribosomal 45S sino también su sistema sexual. Todos los ejemplares machos de esta población presentaron un sistema sexual XY a diferencia del característico  $X_1X_2Y$  observado en las restantes poblaciones de *P. rufotuberculatus* así como en todas las especies del género analizadas. Debido a estas inusuales variaciones observadas, se sospechó que los individuos analizados fueran determinados erróneamente como especie. Por lo que se enviaron ejemplares adultos al Dr. Cleber Galvão (Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz, Brasil) para comprobar su determinación taxonómica mediante claves morfológicas. El Dr. Galvão confirmó que se trataban de ejemplares de *P. rufotuberculatus*. Por lo que es necesario un estudio cromosómico más detallado de esta población a fin de determinar si la presencia de un sistema sexual XY se debe a una fusión de los sexuales  $X_1X_2$  o a la pérdida de uno de ellos. Esta variabilidad hallada en *P. rufotuberculatus* podría apoyar la hipótesis de que es una de las especies ancestrales, ya que es la única que presentó variabilidad.

En resumen, más allá de la inusual población boliviana de *P. rufotuberculatus*, en el género *Panstrongylus* se observa una gran conservación en la posición cromosómica del cluster ribosomal. A nivel filogenético, nuestros resultados apoyan lo sugerido por datos moleculares que incluyen a las especies del género *Panstrongylus* evolutivamente muy próximas al grupo Rubrofasciata del género *Triatoma*, ya que ambos grupos de especies presentan el cluster ribosomal en un par autosómico.

## Género *Triatoma*

El análisis del género *Triatoma* es más complejo debido a su riqueza en especies, su complejidad taxonómica y su variabilidad para este marcador. A continuación discutiremos los resultados obtenidos siguiendo la agrupación de especies en el género *Triatoma* propuesta por Schofield y Galvão (2009). Es decir, dividiendo la discusión en los tres grupos del género: Dispar, Rubrofasciata e Infestans.

**Grupo Dispar:** Es el menos numeroso (cinco especies), distribuido en las proximidades de la cordillera de los Andes desde Venezuela a Bolivia (Schofield & Galvão 2009). Debido a su localización geográfica poco accesible para su captura, poco se conoce de la biología y genética de este grupo. Todas las especies tienen el mismo cariotipo con 10 pares autosómicos y un sistema sexual XY (Panzeria et al. 2010). En esta tesis se analizaron dos especies, *T. carrioni* y *T. boliviana*, y ambas presentan el cluster ribosomal en el cromosoma X.

Sería muy interesante ampliar el análisis de especies en este grupo, ya que su distribución geográfica a lo largo de los Andes podría dar lugar a poblaciones aisladas que muestren variaciones genéticas.

**Grupo Rubrofasciata:** Agrupa principalmente a las especies de América del Norte, Central y el Caribe. Podría tratarse de un grupo monofilético originado en la península de Yucatán, siendo *T. dimidiata* su especie más basal (Bargues et al. 2008, Schofield & Galvão 2009). Este grupo se subdivide en cinco complejos: phyllosoma, flavida, protracta, lecticularia y rubrofasciata (Tabla 3), de los cuales en esta tesis se analizaron especies pertenecientes a los primeros cuatro complejos. El complejo phyllosoma sería el más ancestral albergando a los subcomplejos dimidiata (México, Centroamérica y norte de Sudamérica) y phyllosoma (exclusivo de México, y una especie en Guatemala). El complejo flavida está integrado por especies de las islas de Cuba y Jamaica, supuestamente derivadas del complejo phyllosoma. Los complejos lecticularia y protracta que se distribuyen en Norte y Centroamérica también derivarían del complejo phyllosoma. Por último el complejo rubrofasciata está distribuido principalmente en Asia (6 especies) más la especie cosmopolita *T. rubrofasciata*, de la cual derivaron las anteriores (Schofield & Galvão 2009).

En los análisis de FISH se observó que 17 de las 18 especies analizadas poseen el cluster ribosomal localizado en un par autosómico. Incluyendo el análisis de diferentes poblaciones que se llevó a cabo en *T. dimidiata*, donde se analizaron varios individuos de tres poblaciones, abarcando gran parte de la distribución del vector más importante de Centroamérica. Por lo tanto, este grupo se destaca por la gran conservación de este marcador cromosómico, lo cual podría apoyar la hipótesis de ser un grupo monofilético. *T. ryckmani* fue la única especie variable, llevando el cluster ribosomal 45S en uno de sus cromosomas X. Esta especie es la que presenta la distribución más al sur de todas las especies de *Triatoma* del grupo Rubrofasciata, y no se encuentra en simpatria con ninguna de ellas. Además es la única

especie que habita exclusivamente en bromélias, a diferencia de los hábitats rocosos que ocupan las especies geográficamente más cercanas como las del subcomplejo *phyllosoma*. Lamentablemente no se disponen de análisis moleculares que comprueben la pertenencia de *T. ryckmani* al grupo *Rubrofasciata*. Probablemente el aislamiento geográfico de esta especie y su especialización ecológica puedan haber contribuido a cambios genómicos que derivaron en la variación en la posición del cluster ribosomal.

Por otro lado, una de las especies sin asignar a ningún subcomplejo, *T. tibiamaculata*, es ubicada en los análisis moleculares dentro del grupo *Rubrofasciata*, pese a su distribución sudamericana (Hypsa et al. 2002, Schofield & Galvão 2009). Nuestros resultados de FISH coinciden con este agrupamiento ya que esta especie alberga el cluster ribosomal en un par autosómico. Además su sistema sexual también es igual al que presentan las especies del grupo.

En futuros análisis sería importante poder analizar especies del subcomplejo *Rubrofasciata* y del género *Linshcosteus*, distribuidas en Asia, que han experimentado un importante aislamiento geográfico con los triatominos de las Américas.

**Grupo Infestans:** Está conformado por un gran número de especies sudamericanas. Las clasificaciones están basadas generalmente en datos morfológicos y biogeográficos, aunque recientemente se han incluido evidencias genéticas (Schofield & Galvão 2009). Sin embargo es un grupo que presenta varias interrogantes acerca del agrupamiento de las especies que lo integran. Dentro del grupo *infestans* se identifican dos complejos: *spinolai* e *infestans*. Aunque algunos autores reconocen al complejo *spinolai* como un género separado de *Triatoma* denominado *Mepraia* (Galvão et al. 2003). Este complejo o género nuevo está integrado por cinco especies, tres en Chile y dos en Argentina, por lo que se sugiere que han sufrido un evento de vicarianza debido al levantamiento de los Andes (Campos et al. 2013a). En el complejo *infestans* se reconocen 6 subcomplejos: *infestans*, *brasiliensis*, *maculata*, *matogrossensis*, *rubrovaria* y *sordida*. Las especies que integran cada subcomplejo es objeto de un debate continuo, ya que en muchos casos estos agrupamientos los sustentan solamente datos morfológicos o biogeográficos. Además existen tres especies, *T. tibiamaculata*, *T. vitticeps* y *T. melanocephala*, no incluidas en ninguno de estos subcomplejos (Schofield & Galvão 2009).

El análisis del grupo *Infestans* mostró una variabilidad mayor a la descrita previamente para todo el orden Hemiptera, mostrando los cuatro patrones encontrados para la localización del cluster ribosomal 45S. Si observamos los resultados en función de la clasificación aceptada (Schofield & Galvão 2009), se puede analizar si existe correlación entre los resultados del FISH y la clasificación. Es decir, si el agrupamiento de especies según los patrones de localización del cluster ribosomal es coincidente o no con los agrupamientos basados en datos morfológicos, geográficos y/o moleculares.

**Subcomplejo brasiliensis:** Consta de seis especies que habitan en simpatria en la región nordeste de Brasil, adaptadas al clima seco del Cerrado y la Caatinga. El agrupamiento de las especies en este subcomplejo está sustentado por datos morfológicos, cromosómicos y moleculares (Monteiro et al. 1998, 2004, Panzera et al. 2000, Costa et al. 2009, Mendonça et al. 2009, Almeida et al. 2012).

A nivel cromosómico todas las especies que integran este subcomplejo presentan el mismo número cromosómico ( $2n = 20A + XX/XY$ ) y todos los autosomas presentan bloques de heterocromatina C en ambos extremos cromosómicos (Panzera et al. 2000). Estas características comunes permiten diferenciar claramente las especies del subcomplejo brasiliensis de los restantes grupos de *Triatoma*, aunque no nos permite diferenciarlas entre ellas (Panzera et al. 2010). En cuanto a los resultados de FISH, todas las especies excepto una, presentan el cluster ribosomal en un par autosómico. La excepción es *T. petrochiae* que presenta la señal ribosomal en el cromosoma X.

**Subcomplejos rubrovaria y matogrossensis:** Ambos subcomplejos incluyen especies de hábitats rocosos, exclusivamente encontradas en Brasil. La relación entre ambos subcomplejos así como la integración de las especies que conforman cada subcomplejo es muy discutida, llevando incluso a la postulación de un nuevo agrupamiento denominado oliverai (Noireau et al. 2002). A nivel citogenético todas las especies de ambos subcomplejos son indistinguibles entre sí por presentar el mismo número cromosómico ( $2n = 20A + XX/XY$ ) y la carencia de heterocromatina autosómica (Panzera et al. 2010). Las cuatro especies del subcomplejo rubrovaria analizadas presentan el cluster ribosomal 45S en un par autosómico, lo cual coincide con estudios moleculares de genes mitocondriales que sugieren un estrecho parentesco entre ellas (Almeida et al. 2009). Sin embargo en las especies del subcomplejo matogrossensis se identifican dos patrones de FISH distintos: dos especies en un par autosómico (*T. guazu* y *T. costalimai*) y tres especies con el cluster ribosomal en ambos cromosomas sexuales (*T. jurbergi*, *T. matogrossensis* y *T. vanda*) (Tabla 6). Nuestros resultados concuerdan con datos isoenzimáticos y morfométricos que cuestionan la integración del subcomplejo matogrossensis (Noireau et al. 2002). Estos autores reconocen dos clados claramente distintos. Uno de ellos integrado por *T. guazu*, *T. williami* del complejo matogrossensis, junto con *T. klugi* y *T. oliveirai*, del complejo rubrovaria, donde el cluster ribosomal se encuentra en un par autosómico. El segundo clado está integrado por *T. jurbergi*, *T. matogrossensis* y *T. vanda* que presentan el ribosomal en ambos cromosomas sexuales. Es decir que nuestros resultados de FISH sugieren, al igual que los datos morfológicos e isoenzimáticos, que *T. guazu*, *T. williami* y *T. costalimai* deberían estar incluidos en el

subcomplejo rubrovaria en lugar del matogrossensis. Análisis moleculares de ambos grupos de especies podrían ayudar a clarificar su agrupamiento y contribuirían a testar nuestra hipótesis de que las especies filogenéticamente más cercanas presentan la misma ubicación cromosómica del cluster ribosomal.

**Subcomplejo maculata:** El subcomplejo maculata está constituido por cuatro especies: *T. arthurneivai*, *T. wygodzinskyi*, *T. maculata* y *T. pseudomaculata*, siendo las dos últimas las más estudiadas por su importancia epidemiológica como vectores de la enfermedad de Chagas en Brasil. Ambas especies son alopátricas, una habitando al norte del Amazonas (*T. maculata*) y la otra al sur (*T. pseudomaculata*). Suponiendo un ancestro común, se han formulado dos hipótesis para explicar su distribución. La primera sugiere que, dada su asociación con aves, las dos poblaciones surgieron de un ancestro común, y que *T. maculata* fue formada por la migración pasiva de ninfas asociadas a aves migratorias (Schofield 1988). La segunda, que presupone un origen mucho más antiguo, argumenta que el ancestro común tenía una distribución amplia que abarcaba la actual distribución de ambas especies. Luego de un evento de vicarianza como la formación de la selva Amazónica, las dos subpoblaciones quedaron aisladas y se diferenciaron en especies distintas (Abad-Franch & Monteiro 2007). Sin embargo, el análisis con distintos marcadores genéticos (isoenzimas y genes mitocondriales) y fenéticos (morfometría y sensillas) han puesto en duda la conformación del subcomplejo maculata, especialmente la estrecha relación evolutiva entre *T. maculata* y *T. pseudomaculata*, sugiriendo que pertenecen a distintos linajes evolutivos (Hypsa et al. 2002, Paula et al. 2005; Santos et al. 2007, Carbajal de la Fuente et al. 2008). Además diversos autores han demostrado que *T. wygodzinskyi* y *T. pseudomaculata* son especies hermanas, con un mismo ancestro común (Carbajal de la Fuente et al. 2008, 2010, 2011).

En cuanto a sus características citogenéticas, se analizaron 3 de las 4 especies de este subcomplejo, todas ellas presentando el mismo número cromosómico ( $2n = 20A + XX/XY$ ). A nivel de bandas C, *T. maculata* y *T. pseudomaculata* presenta varios autosomas heterocromáticos, mientras que *T. wygodzinskyi* carece de ellos (Santos et al. 2007). A nivel de FISH, *T. maculata* presenta la señal ribosómica en ambos cromosomas sexuales mientras que las restantes 2 especies la presentan en un par autosómico. En conclusión, nuestros resultados de FISH son concordantes con datos genéticos y fenéticos que sugieren una reformulación del subcomplejo maculata donde *T. maculata* y *T. pseudomaculata* no estén incluidas en el mismo grupo, y que *T. pseudomaculata* y *T. wygodzinskyi* son especies evolutivamente muy próximas.

**Subcomplejo sordida:** Está constituido por cuatro especies: *T. sordida*, *T. garciabesi*, *T. guasayana* y *T. patagonica*. A excepción de *T. sordida*, este subcomplejo ha sido muy poco estudiado debido a su escasa importancia vectorial. Son especies morfológicamente muy similares que habitan en la región del Gran Chaco incluyendo Argentina, Paraguay, Bolivia y Brasil (Lent & Wygodzinsky 1979). Estudios genéticos mediante marcadores moleculares contradicen el agrupamiento de estas especies en un mismo subcomplejo (García et al. 2001, Hypsa et al. 2002, Sainz et al. 2004). Por lo tanto su similitud morfológica no guardaría relación con sus relaciones evolutivas.

Aunque todas las especies presentan el mismo número cromosómico ( $2n= 20A + XX/XY$ ), los resultados obtenidos en esta tesis reflejan una gran variabilidad entre las especies que integran este subcomplejo, al igual que lo observado a nivel de su heterocromatina C (Panzera et al. 1997). Por un lado *T. sordida* y *T. garciabesi* llevan los clusters ribosomales en los cromosomas sexuales, mientras *T. guasayana* y *T. patagonica* los presentan en un par autosómico. Análisis filogenéticos con distintos marcadores mitocondriales no agrupan estas especies dentro de un mismo clado (García et al. 2001, Hypsa et al. 2002, Sainz et al. 2004). Estos análisis agrupan a *T. patagonica* y *T. guasayana* con las especies del subcomplejo rubrovaria, mientras que a *T. sordida* y *T. garciabesi* las relaciona con *T. matogrossensis*. Los resultados obtenidos con FISH son coincidentes con los datos moleculares, reconociendo dos grupos distintos de acuerdo a la localización del cluster ribosomal. En conclusión, la similitud morfológica que llevó a la agrupación de estas especies en un mismo subcomplejo es una convergencia evolutiva que no está sustentada por datos genéticos, incluyendo los aquí presentados y por lo tanto se sugiere la disolución del subcomplejo sordida.

**Subcomplejo infestans:** Involucra tres especies: *T. delpontei*, *T. platensis* y *T. infestans*. Las dos primeras están asociadas a nidos de aves mientras que *T. infestans* habita con pequeños mamíferos y en el ambiente doméstico, siendo el principal vector de la enfermedad de Chagas, incluyendo una amplia distribución geográfica (Schofield et al. 2006). Diversos estudios genéticos, entre ellos los cromosómicos, sustentan que estas tres especies están estrechamente emparentadas y que derivan de un ancestro común (Panzera et al. 1995, 2004, Pereira et al. 1996, García et al. 2001, Barges et al. 2006). A nivel molecular las diferencias entre las especies son muy pequeñas, por lo que se acepta que el principal mecanismo de especiación en este grupo ha sido la diferenciación ecológica. Aunque las tres especies presentan un mismo número cromosómico ( $2n= 20A + XX/XY$ ), a nivel de heterocromatina C cada una de ellas exhibe un patrón distinto, con la particularidad de que *T. infestans* presenta un extenso polimorfismo cromosómico tanto a nivel de los autosomas como de los cromosomas sexuales (Panzera et al. 1992, 2004, 2010, Ferreira 2011). La extensa variabilidad de este grupo a nivel de

heterocromatina C es similar al observado en los genes ribosomales donde cada una de las especies posee un patrón de localización diferente. En *T. infestans* se encontraron dos patrones diferentes que coinciden con los grupos poblacionales definidos mediante heterocromatina C. El grupo Andino que se caracteriza por poseer bloques heterocromáticos en 14- 20 de sus 22 cromosomas, presenta un locus ribosomal en un par autosómico. El grupo No Andino que se caracteriza por poseer bloques heterocromáticos en 4 -7 de sus 22 cromosomas, posee un locus ribosomal ubicado en el cromosoma X (Ferreiro 2011). En la presente tesis se amplió el estudio de *T. infestans*, sobretodo analizando poblaciones silvestres, y se hallaron los mismos dos patrones. Por otro lado, *T. delpontei* mostró dos loci ribosomales, uno en un par autosómico y otro en el cromosoma X, y *T. platensis* posee un locus ribosomal ubicado en el cromosoma X. La gran variación en la localización del cluster ribosomal encontrada en el subcomplejo *infestans*, revela que estas tres especies estrechamente emparentadas han experimentado grandes rearrreglos cromosómicos en un corto período de tiempo.

### **Variabilidad del cluster ribosomal en la tribu Triatomini**

Habiendo analizado cada género, grupo y subcomplejo de la tribu Triatomini por separado, y tomando en cuenta las filogenias moleculares inferidas de secuencias génicas de ADN mitocondrial y nuclear, se logra obtener una idea clara acerca de la evolución del cluster ribosomal 45S en la tribu Triatomini. La mayoría de las especies (41 de las 71 especies analizadas), incluidas en cuatro de los ocho géneros estudiados presenta este patrón autosómico. Además se encuentra presente en los tres sistemas sexuales descritos en la subfamilia, involucrando especies con y sin heterocromatina autosómica. Comparando con las filogenias moleculares (Hypsa et al 2002, Schofield & Galvão 2009, Campos et al. 2013b), nuestros resultados de FISH apoyan la hipótesis de que el cariotipo ancestral de la tribu comprendía un número diploide de 22 cromosomas ( $2n= 20A + XX/XY$ ), tal como sugiere Ueshima (1966), y sugieren que éste presentaba el cluster ribosomal localizado en un par autosómico. La dicotomía más basal en la tribu separa a los grupos Rubrofasciata e *Infestans*, y para cada tribu las especies más basales poseen el patrón autosómico. La clara conservación de este patrón en el grupo Rubrofasciata no ofrece dudas al respecto (Figura 12).

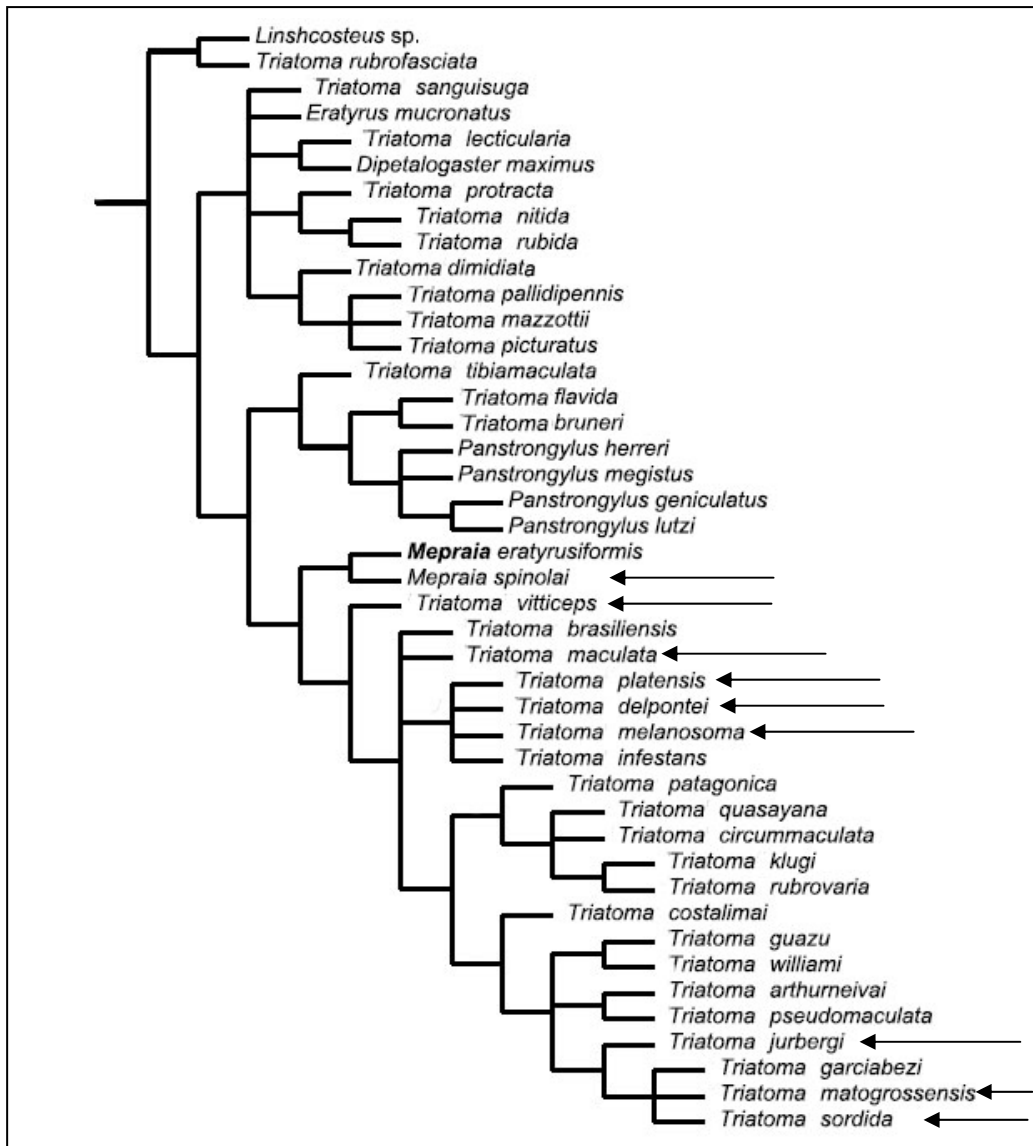


Figura 12. Filogenia de la tribu Triatomini, modificada de Hypsa et al. (2002). Se señalan con una flecha las especies que presentan un patrón de localización del cluster ribosomal 45S diferente al autosómico.

En la tribu Triatomini el cluster ribosomal parece estar sometido a distintas tasas de cambio en su localización cromosómica considerando la variación observada dentro de los distintos linajes evolutivos. En algunos géneros, grupos e incluso subcomplejos, la posición del cluster ribosomal 45S se mantiene inalterada, las especies del mismo agrupamiento taxonómico poseen la misma localización cromosómica. Estos son los casos del género *Panstrongylus* (excepto la población mutante de *P. rufotuberculatus*) y de los grupos Dispar y Rubrofasciata (excepto *T. ryckmani*) del género *Triatoma*. Por el contrario en otros agrupamientos, como los subcomplejos infestans y matogrossensis del género *Triatoma*, las especies presentan una alta variabilidad reflejando una tasa de cambio mayor.



A excepción de lo observado en el subcomplejo infestans, podemos sugerir que para que se observen cambios en la localización del cluster ribosomal entre especies evolutivamente cercanas es necesario un largo período de diferenciación mediado por aislamiento geográfico o ecológico. Ejemplos ilustrativos de un aislamiento geográfico podrían ser lo ocurrido entre los dos grupos de *Mepraia* y las dos especies de *Eratyrus* por el levantamiento de los Andes. En el caso de la diferenciación de las especies chilenas y argentinas de *Mepraia*, y posiblemente también con la población andina de *P. rufotuberculatus*, los cambios en la posición del cluster ribosomal estuvo acompañada por cambios cromosómicos más profundos que involucraron el número de cromosomas X. Por otra parte, el aislamiento ecológico parece haber sido la principal causa de diferenciación de *T. ryckmani* en relación a las restantes especies del subcomplejo phyllosoma y de las especies del subcomplejo infestans. Sin embargo hay un solo ejemplo que desafía nuestra hipótesis de aislamiento, la variabilidad observada de *T. petrochiae* en el subcomplejo brasiliensis. La única explicación posible es que la diferenciación genética de *T. petrochiae* con las restantes especies se realizó en tiempos muy remotos, siendo la simpatria actual un fenómeno posterior a dicha diferenciación genética. Lamentablemente no podemos contrastar esta explicación por la carencia de análisis moleculares comparativos entre los integrantes de este subcomplejo.

## **Dinámica de variación del cluster ribosomal 45S**

La capacidad de los genes ribosomales de moverse en el genoma y amplificar o disminuir su número de copias son propiedades ampliamente reconocidas de estos genes (Cabrero & Camacho 2008). Las variaciones en el número de copias son explicadas principalmente por la recombinación homóloga desigual, entre los repetidos en tándem de los genes ribosomales del cluster ribosomal 45S. Ello implica que se pueden producir productos de recombinación con distintos números de repetidos del gen ribosomal.

Por otro lado, el movimiento de los genes ribosomales en el genoma son explicados mediante tres mecanismos principales: reordenamientos cromosómicos, transposiciones y recombinación ectópica. Si bien existen varios reportes en una gran variedad de taxones, incluyendo insectos, donde los reordenamientos cromosómicos estructurales, del tipo fusión y fisión, están implicados en el movimiento de los loci ribosomales (Hirai et al. 1996, Bressa et al. 2009), esta hipótesis no parece probable en triatominos. La variabilidad de los números cromosómicos en triatominos es prácticamente inexistente, más aún involucrando a los autosomas, lo que vuelve poco probable que eventos de fusión o fisión estén implicados en esta variabilidad de loci ribosomales.

El mecanismo de transposición implica que los genes ribosomales son movidos debido a su asociación con elementos transponibles. Originalmente se planteó que un elemento transponible se mueva a otra región del genoma llevándose consigo algunas copias del cluster ribosomal. Luego este nuevo locus puede aumentar su número de copias y estabilizarse en esta nueva posición (Schubert 1984, Schubert & Wobus 1985). La existencia de más de un locus ribosomal en algunas especies de triatominos podría apoyar esta hipótesis. La observación de diferencias en la intensidad de las señales de hibridación de un mismo individuo, que reflejan diferentes números de copia de los genes ribosomales, podría indicar que ocurrieran recientes eventos de transposición. Varios elementos transponibles han sido descritos en triatominos (Gilbert et al. 2010), incluyendo un retrotransposon no-LTR que se encuentra inserto en la secuencia del gen 28S ADNr de *R. prolixus* (Jakubczak et al. 1991). Por lo tanto podemos sugerir que en los triatominos, así como se ha sugerido para otros insectos (Cabrero & Camacho 2008, Nguyen et al. 2010, Cabral de Mello et al. 2011b), la variabilidad observada podría ser explicable mediante un mecanismo de asociación entre genes del cluster ribosomal 45S y elementos transponibles. Especies polimórficas, como *T. infestans* o *R. ecuadoriensis*, son excelentes candidatos para el estudio y búsqueda de elementos transponibles y para el análisis de su mecanismo de acción.

Igual de probable es el mecanismo de recombinación ectópica, o sea recombinación de secuencias homólogas entre cromosomas no homólogos. Este tipo de recombinación suele darse en regiones heterocromáticas. Es posible que genes ribosomales cambien su localización en el genoma debido a localizarse adyacentes a un punto de recombinación (Hanson 1996). Ambos mecanismos seguramente estén controlados por la proximidad de los territorios cromosómicos en interfase o en la profase. En triatominos las asociaciones heterólogas son muy frecuentes, tanto involucrando a cromosomas autosómicos, sexuales o inclusive entre ambos tipos de cromosomas (Panzera et al. 2010), por ende favoreciendo ambos procesos de movilidad del cluster ribosomal 45S. Esto también se evidencia durante la meiosis, donde existen frecuentes asociaciones entre regiones de heterocromatina C de diferentes cromosomas, ya sean autosomas o sexuales (Panzera et al 2010). De esta hipótesis podemos sugerir que los grupos de especies donde se observan asociaciones heterólogas son más propensos a presentar variabilidad en la localización del cluster ribosomal 45S. El subcomplejo *infestans* es una evidencia clara a favor de esta hipótesis.

Un punto controversial sería el intercambio de secuencias entre los cromosomas sexuales, ya que son considerados aquiasmáticos durante la meiosis (Solari 1979). Sin embargo en todas la especies de triatominos, desde la profase meiótica temprana hasta diacinesis, los cromosomas sexuales están íntimamente asociados formando un cromocentro heteropicnótico (Panzera et al. 2010). Esta cercana configuración espacial entre los cromosomas sexuales es un

prerrequisito esencial para la ocurrencia de la recombinación ectópica o la transposición de los genes ribosomales. Por lo tanto, la presencia del cluster ribosomal 45S en dos cromosomas sexuales detectado en 15 especies de cinco géneros distintos de triatomíneos (*Rhodnius*, *Psammolestes*, *Eratyrus*, *Panstrongylus* y *Triatoma*) podría estar reflejando que el intercambio de secuencias entre los cromosomas sexuales aquíasmáticos es más frecuente del esperado.

Nuestros resultados sólo nos permiten especular acerca de los posibles mecanismos implicados en la transferencia del cluster ribosomal. Otros estudios son necesarios para determinar más precisamente los mecanismos implicados.



1. La variabilidad revelada para la localización del cluster ribosomal 45S demuestra una gran dinámica de cambio en los genomas de las distintas especies de la subfamilia Triatominae.
2. No existe correlación entre el número de cromosomas del cariotipo (tanto autosomas como sexuales) y la localización del cluster ribosomal.
3. No existe correspondencia entre la localización del cluster ribosomal con la cantidad o localización de la heterocromatina C, por lo que sugerimos que las presiones selectivas que las rigen podrían ser distintas.
4. El cariotipo ancestral de la subfamilia Triatominae comprendería un número diploide de 22 cromosomas ( $2n= 20A + XX/XY$ ), con el cluster ribosomal localizado en un par autosómico.
5. El cluster ribosomal está sometido a distintas tasas de cambio. La velocidad de variación difiere entre los distintos linajes o grupos evolutivos de la subfamilia.
6. Para que ocurra un cambio en la localización del cluster ribosomal entre especies evolutivamente cercanas es necesario un extenso período de diferenciación mediado por aislamiento geográfico o ecológico.
7. En la subfamilia Triatominae, los mecanismos más probables responsables de los cambios en la localización cromosómica del cluster ribosomal serían el de transposición y el de recombinación ectópica.



1. Continuar analizando la dinámica de cambio del cluster ribosomal en otros grupos no analizados en esta Tesis. Particularmente útil sería el análisis de especies de las tribus Alberproseniini, Cavernicolini y Bolboderini, aumentar el número de especies del género *Panstrongylus*, en las especies de *Triatoma* y *Linshcosteus* de Asia, en nuevas poblaciones de especies variables como *T. infestans*, *P. rufotuberculatus* y *R. ecuadoriensis*, o en especies que se presume puedan existir especies crípticas como *R. robustus* o *T. sordida*.
2. Cuantificar mediante Real Time PCR el número de copias del gen 18S presentes en el cluster ribosomal 45S en diferentes especies y poblaciones de triatominos. Lo cual será útil a la hora de analizar los mecanismos responsables del cambio de localización del cluster ribosomal.
3. Para continuar con el objetivo de analizar la evolución cariotípica de la familia Triatominae nos proponemos:
  - Determinar la existencia de otras secuencias repetidas y su localización cromosómica, tales como trasposones, retrotrasposones y otros elementos de ADN repetitivo. E investigar su posible asociación con el cluster ribosomal.
  - Comparar la dinámica de cambio del cluster ribosomal con el análisis de otros genes repetidos, tales como el gen ribosomal 5S o los de las familias génicas de las histonas o del spliceosoma.
  - Desarrollar otras metodologías para el estudio de las secuencias repetitivas presentes en la heterocromatina, tales como la hibridación *in situ* genómica (GISH).
  - Desarrollar nuevas sondas que involucren secuencias de cromosomas completos, como por ejemplo los cromosomas sexuales, mediante microdissección cromosómica y amplificación de su ADN por DOP-PCR y posterior hibridización sobre especies con distintos mecanismos sexuales.



- Abad-Franch F, et al. 2001. Biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) in Ecuador: implications for the design of control strategies. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 611-620.
- Abad-Franch F, et al. 2003. Phylogenetic relationships among members of the Pacific *Rhodnius* lineage (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Infect Genet Evol* 2: 244-245.
- Abad-Franch F, Monteiro FA, 2005. Molecular research and the control of Chagas disease vectors. *An Acad Bras Cienc* 77: 437-454.
- Abad-Franch F, Monteiro FA, 2007. Biogeography and evolution of Amazonian triatomines (Heteroptera: Reduviidae): implications for Chagas disease surveillance in humid forest ecoregions. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 57-70.
- Abad-Franch F, et al. 2009. Ecology, evolution and the long-term surveillance of vector-borne Chagas disease: a multi-scale appraisal of the tribe Rhodniini (Triatominae). *Acta Trop* 112: 159-177.
- Almeida MC, et al. 2010. Physical mapping of 18S rDNA cistron in species of the *Omophoita* genus (Coleoptera, Alticinae) using fluorescent in situ hybridization. *Micron* 41: 729-734.
- Almeida CE, et al. 2012. Dispersion capacity of *Triatoma sherlocki*, *Triatoma juazeirensis* and laboratory- bred hybrids. *Acta Trop* 122: 71-79.
- Aufderheide AC, et al. 2004. A 9000-year record of Chagas' disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 2034-2039.
- Azambuja P, 1985. Aspectos fisiológicos de *Rhodnius prolixus* Stal, 1859 (Hemiptera, Reduviidae) I. Substancias inibidoras da alimentação. II. Factores hemolíticos e antibacterianos induzidos. Tese de Doutorado Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil.
- Bardella VB, et al. 2010. Chromosomal location of heterochromatin and 45S rDNA sites in four South American triatomines (Heteroptera: Reduviidae). *Comp Cytogenet* 4: 141-149.
- Bargues MD, et al. 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 MD, et al. 2008. Phylogeography and genetic variation of *Triatoma dimidiata*, the main Chagas disease vector in Central America, and its position within the genus *Triatoma*. *PLoS Negl Trop Dis* 2:e233.
- Barret T, Arias JR, 1985. A new triatomine host of trypanosoma from the Central Amazon of Brazil: *Cavernicola lenti* n. sp. (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 80: 91-96.
- Bizzaro D, et al. 2000. Chromosome analysis and molecular characterization of highly repeated DNAs in the aphid *Acyrtosiphon pisum* (Aphididae, Hemiptera). *Genetica* 108: 197-202
- Bressa MJ, et al. 2009. Sex chromosome evolution in cotton stainers of the genus *Dysdercus* (Heteroptera: Pyrrhocoridae). *Cytogenet Genome Res* 125: 292-305.
- Buxton PA, 1930. The biology of a blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *Trans R Ent Soc Land* 78: 337-436.
- Brianti MT, et al. 2009. Comparative analysis of the chromosomal positions of rDNA genes in species of the *tripunctata* radiation of *Drosophila*. *Cytogenet Genome Res* 125: 149-157.
- Cabral-de-Mello DC, et al. 2011a. Chromosomal organization of the 18S and 5S rRNAs and histone H3 genes in Scarabaeinae coleopterans: insights into the evolutionary dynamics of multigene families and heterochromatin. *BMC Genetics* 12: 88. doi:10.1186/1471-2156-12-88.

- Cabral-de-Mello DC, et al. 2011b. Cytogenetic mapping of rRNAs and histone H3 genes in 14 species of *Dichotomius* (Coleoptera, Scarabaeidae, Scarabaeinae) beetles. *Cytogenet Genome Res* 134: 127-135.
- Cabrero J, Camacho JPM, 2008. Location and expression of ribosomal RNA genes in grasshoppers: abundance of silent and cryptic loci. *Chromosome Res* 16: 595-607.
- Campos R, et al. 2013a. High phylogeographic structure in sylvatic vectors of Chagas disease of the genus *Mepraia* (Hemiptera: Reduviidae). *Infection Genet Evol*. En prensa.
- Campos R, et al. 2013b. Phylogenetic relationships of the spinolai complex and other triatomini based on mitochondrial DNA sequences (Hemiptera: Reduviidae). *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 13: 73-76.
- Carbajal de la Fuente AL, et al. 2008. Inferences about antennal phenotype: the "*Triatoma maculata* complex" (Hemiptera: Triatominae) is valid? *Acta Trop* 106: 16-21.
- Carbajal de la Fuente AL, et al. 2010. Comparative biology of the two sister species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). *Rev Soc Bras Med Trop* 43:15-18.
- Carbajal de la Fuente AL, et al. 2011. Misidentification of two Brazilian triatomines, *Triatoma arthurneivai* and *Triatoma wygodzinskyi*, revealed by geometric morphometrics. *Med Vet Entomol* 25: 178-183.
- Carcavallo, et al. 2000. Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera Reduviidae). Proposals for taxonomic arrangements. *Entomol Vectores* 7: 1-99.
- Catalá S, 1997. Antennal sensilla of Triatominae Hemiptera Reduviidae. A comparative study of five genera. *Int J Insect Morphol Embriol*. 26: 67-73.
- Chagas C, 1909. Nova Tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1: 159-218.
- Costa J, et al. 2009. Morphological evidence suggests homoploid hybridization as a possible mode of speciation in the Triatominae (Hemiptera, Heteroptera, Reduviidae). *Infect Genet Evol* 9: 263-270.
- Cortez MR, et al. 2010. New insights on the spread of *Triatoma infestans* from Bolivia - Implications for Chagas disease emergence in the Southern Cone. *Infect Genet Evol* 10: 350-353.
- Coura JR, 2003. Tripanossomose, doença de Chagas. *Ciênc Cult* 55: 30-33.
- Da Rosa JA et al. 2012. Description of *Rhodnius montenegrensis* n. sp (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the state of Rondonia, Brazil. *Zootaxa* 3478: 62-76.
- Dias JCP, et al. 2002. The impact of Chagas Disease control in Latin America: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 603-612.
- Dias JCP, 2009. Elimination of Chagas disease transmission: perspectives. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 41-45
- de Paula AS, et al. 2005. Testing the sister-group relationship of the Rhodniini and Triatomini (Insecta: Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mol Phylogen Evol* 35: 712-718.
- de Paula AS, et al. 2007. Systematics and biogeography of Rhodniini (Heteroptera: Reduviidae: Triatominae) based on 16S mitochondrial rDNA sequences. *J Biogeogr* 34: 699-712.
- Dorn PL, et al. 2007. *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811): A review of its diversity across its geographic range and the relationship between populations. *Infect Genet Evol* 7: 343-352.
- Dujardin JP, et al. 1999. Triatominae as a model of morphological plasticity under ecological pressure. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 223-228.
- Dujardin JP, et al. 2000. Les Vecteurs de la Maladie de Chagas. *Recherches Taxonomiques, Biologiques et Génétiques*. Academie Royale des Sciences d'Outre Mer, Brussels, 162 pp.
- Ferreiro MJ, 2011. Análisis de la variabilidad cromosómica en *Triatoma infestans*, principal vector de la enfermedad de Chagas en el cono sur. Tesis de Maestría en Biología PEDECIBA-Udelar. Uruguay.

- Flynn JJ, et al. 1998. Recent advances in South American mammalian paleontology. *Tree* 13: 449-454.
- Frias-Lasserre D, 2010. A new species and karyotype variation in the bordering distribution of *Mepraia spinolai* (Porter) and *Mepraia gajardo* Frías et al. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in Chile and its parapatric model of speciation. *Neotropical Entomol* 39: 572-583.
- Galvão C, et al. 2003. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa* 202: 1-36.
- Gaunt MW, Miles MA, 2000. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (Triatominae) and their associated trypanosomes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 557- 565.
- Gaunt MW, Miles MA, 2002. An insect molecular clock dates the origin of the insects and accords with paleontological and biogeographical landmarks. *Mol Biol Evol* 19:748-761.
- Gilbert C, et al. 2010. A role for host-parasite interactions in the horizontal transfer of transposons across phyla. *Nature* 464: 1347-1350.
- Gómez-Palacio A, et al. 2008. Chromosome variability in the Chagas disease vector *Rhodnius pallescens* (Hemiptera, Reduviidae, Rhodniini). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 160-164.
- Gómez-Palacio A, et al. 2012. Morphometric and molecular evidence of intraspecific biogeographical differentiation of *Rhodnius pallescens* (Hemiptera: Reduviidae: Rhodniini) from Colombia and Panama. *Infect Genet Evol* 12: 1975-1983.
- Gourbière S, et al. 2012. Genetics and evolution of triatomines: from phylogeny to vector control. *Heredity* 108: 190-202.
- Grijalva MJ, et al. 2012. Ecological factors related to the widespread distribution of sylvatic *Rhodnius ecuadoriensis* populations in southern Ecuador. *Parasit Vectors* 5: 17.
- Grozeva S, et al. 2010. Bed bug cytogenetics: karyotype, sex chromosome system, FISH mapping of 18S rDNA, and male meiosis in *Cimex lectularius* Linnaeus, 1758 (Heteroptera: Cimicidae). *Comp Cytogen* 4: 151-160.
- Grozeva S, et al. 2011. Karyotypes, male meiosis and comparative FISH mapping of 18S ribosomal DNA and telomeric (TTAGG)<sub>n</sub> repeat in eight species of true bugs (Hemiptera, Heteroptera). *Comp Cytogen* 5: 355-374.
- Guhl F, et al. 1999. Isolation of *Trypanosoma cruzi* DNA in 4,000-year-old mummified human tissue from northern Chile. *Am J Phys Anthropol* 108: 401-407.
- Guhl F, et al. 2009. Sylvatic triatominae: a new challenge in vector control transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 71-75.
- Gürtler RE, et al. 2007. Sustainable vector control and management of Chagas disease in the Gran Chaco, Argentina. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 16194-16199.
- Hancock K, et al. 2005. Prevalence of antibodies to *Trypanosoma cruzi* in raccoons (*Procyon lotor*) from an urban area of northern Virginia. *J Parasitol* 91: 470-472.
- Hanson RE, et al. 1996. Distribution of 5S and 18S-28S rDNA loci in a tetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and its putative diploid ancestors. *Chromosoma* 105: 55-61.
- Hashimoto K, Schofield CJ, 2012. Elimination of *Rhodnius prolixus* in Central America. *Parasites & Vectors* 5:45.
- Hirai H, et al. 1996. Genomic dispersion of 28S rDNA during karyotypic evolution in the ant genus *Myrmecia* (Formicidae). *Chromosoma* 105: 190-196.
- Hughes-Schrader S, Schrader F, 1961. The kinetochore of the Hemiptera. *Chromosoma* 12: 327-350.
- Hwang WS, Weirauch C, 2012. Evolutionary history of assassin bugs (Insecta: Hemiptera: Reduviidae): insights from divergence dating and ancestral state reconstruction. *PLoS ONE* 7: e45523.
- Hypsa V, et al. 2002. Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the Asiatic clade. *Mol Phylogenet Evol* 23: 447-457.



- Jakubczak JL, et al. 1991. Retrotransposable elements RI and R2 interrupt the rRNA genes of most insects. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 3295-3299.
- Lardeaux F, et al. 2010. Insecticide resistance of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) vector of Chagas disease in Bolivia. *Trop Med International Health* 15: 1037-1048
- Lent H, 1948. O gênero *Rhodnius* Stal (Hemiptera, Reduviidae). *Rev Bras Biol* 8: 297-339.
- Lent H, Wygodzinsky P, 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas disease. *Bull Am Mus Nat History* 163: 127-520.
- Lyman DF, et al. 1999. Mitochondrial DNA sequence variation among Triatominae vectors of Chagas disease. *Am J Trop Med Hyg* 60: 377-386.
- Mandrioli M, et al. 1999. Cytogenetic and molecular characterization of a highly repeated DNA sequence in the peach potato aphid *Myzus persicae*. *Chromosoma* 108: 436-442.
- Mandrioli M, Manicardi GC, 2012. Unlocking holocentric chromosomes: new perspectives from comparative and functional genomics. *Current genomics* 13: 343-349.
- Marcilla A, et al. 2002. Nuclear rDNA ITS-2 sequences reveal polyphyly of *Panstrongylus* species (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), vectors of *Trypanosoma cruzi*. *Inf Gen Evol* 1: 225-235.
- Martínez FH, et al. 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 mtCytB sequences. *Mol Phylogenet Evol* 41: 279-287.
- Martínez-Ibarra JA, et al. 2008: Biological and genetic aspects of experimental hybrids from species of the Phyllosoma complex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 236-243.
- Mas-Coma S, Bargues MD, 2009. Populations, hybrids and the systematic concepts of species and subspecies in Chagas disease triatomine vectors inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA. *Acta Trop* 110: 112-136.
- Melters DP, et al. 2012. Holocentric chromosomes: convergent evolution, meiotic adaptations, and genomic analysis. *Chrom Res* 20: 579-593.
- Mendonca VJ, et al. 2009. Phylogeny of *Triatoma sherlocki* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) inferred from two mitochondrial genes suggests its location within the *Triatoma brasiliensis* complex. *Am J Trop Med Hyg* 81: 858– 864
- Moncayo A, Silveira AC, 2009. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 17-30.
- Monte Gonçalves TC, et al. 2013. *Triatoma jatai* sp. nov. in the state of Tocantins, Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108: 429-437.
- Monteiro FA, et al. 1998. Genetic confirmation of the specific status of *Triatoma petrochii* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Ann Trop Med Parasitol* 92: 897-900.
- Monteiro FA, et al. 2000. Phylogeny and molecular taxonomy of the Rhodniini derived from mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Am J Trop Med Hyg* 62: 460-465.
- Monteiro FA, et al. 2002. Allozyme relationships among ten species of Rhodniini showing paraphyly of *Rhodnius* including *Psammolestes*. *Med Vet Entomol* 16: 83-90.
- Monteiro FA, et al. 2003. Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. *Mol Ecol* 12: 997-1006.
- Monteiro FA, et al. 2004. Nested clade and phylogeographic analyses of the Chagas disease vector *Triatoma brasiliensis* in northeast Brazil. *Mol Phylogenet Evol* 32: 46-56.
- Morielle-Souza A, Azeredo-Oliveira MT, 2007. Differential characterization of holocentric chromosomes in triatomines (Heteroptera, Triatominae) using different staining techniques and fluorescent in situ hybridization. *Genet Mol Res* 6: 713-720.
- Nguyen P, et al. 2010. Evolutionary dynamics of rDNA clusters on chromosomes of moths and butterflies (Lepidoptera). *Genetica* 138: 343-354.
- Noireau F, et al. 2002. Phylogenetic relationships within the oliveirai complex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Infect Genet Evol* 2: 11-17.

- Noireau F, 2009. Wild *Triatoma infestans*, a potential threat that needs to be monitored. Mem Inst Oswaldo Cruz 104: 60-64.
- Oliveira SG, et al. 2010. Cytogenetic analysis of two *Coprophanæus* species (Scarabaeidae) revealing wide constitutive heterochromatin variability and the largest number of 45S rDNA sites among Coleoptera. Micron 41: 960-965.
- Panzer F, et al. 1995. Karyotype evolution in holocentric chromosomes of three related species of triatomines (Hemiptera-Reduviidae). Chrom Res 3: 143-150.
- Panzer F, et al. 1992. C-heterochromatin polymorphism in holocentric chromosomes of *Triatoma infestans* (Hemiptera-Reduviidae). Genome 35: 1068-1074.
- Panzer F, et al. 1997. Genetic variability and geographic differentiation among three species of triatomine bugs (Hemiptera-Reduviidae). Am J Trop Med Hyg 57: 732-739.
- Panzer F, et al. 1998. Cytogenetics of Triatomines. En Atlas de Triatomines de América. Capítulo 15. Fundación Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Río de Janeiro, Brazil, pp. 621-664.
- Panzer F, et al. 2000. Chromosome homogeneity in populations of *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera-Reduviidae-Triatominae). Cad Saude Pub 16: 83-88.
- Panzer F, et al. 2004. Genomic changes of Chagas disease vector, South America. Emerg Infect Dis 10: 438-446.
- Panzer F, et al. 2006. Chromosomal variation and genome size support existence of cryptic species of *Triatoma dimidiata* with different epidemiological importance as Chagas disease vectors. Trop Med Intern Health 11: 1092-1103.
- Panzer F, et al. 2007. Genome size determination in Chagas Disease transmitting bugs (Hemiptera-Triatominae) by flow cytometry. Am J Trop Med Hyg 76: 516-521.
- Panzer F, et al. 2010. Cytogenetics and genome evolution in the subfamily Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). Cytogen Genome Res 128: 77-87.
- Panzer Y, et al. 2012. High dynamics of rDNA cluster location in kissing bug holocentric chromosomes (Triatominae, Heteroptera). Cytogen Genome Res 138: 56-67.
- Papeschi AG, Bressa MJ, 2006a. Classical and molecular cytogenetics in Heteroptera. Res Adv Entomol 1: 1-9.
- Papeschi AG, Bressa MJ, 2006b. Evolutionary cytogenetics in Heteroptera. J Biol Res 5: 3-1.
- Patterson JS, et al. 2009. On the genus *panstrongylus* Berg 1879: Evolution, Ecology and epidemiological significance. Acta Trop 110: 187-199.
- Patterson JS, Gaunt WG, 2010. Phylogenetic multi-locus codon models and molecular clocks reveal the monophyly of haematophagous reduviid bugs and their evolution at the formation of South America. Mol Phylogenet Evol 56: 608-621.
- Pereira J, et al. 1996. Enzymatic variability and phylogenetic relatedness among *Triatoma infestans*, *T. platensis*, *T. delpontei* and *T. rubrovaria*. Heredity 77: 47-54.
- Pérez R, et al. 1997. Meiotic behaviour of holocentric chromosomes: orientation and segregation of autosomes in *Triatoma infestans* (Heteroptera). Chromo Res 5: 47-56.
- Pérez R, et al. 2000. Meiosis in holocentric chromosomes: orientation and segregation of an autosome and sex chromosomes in *Triatoma infestans* (Heteroptera). Chrom Res 8: 17-25.
- Pérez R, et al. 2002. Chromosomal evolution trends of the genus *Panstrongylus* (Hemiptera, Reduviidae), vectors of Chagas disease. Inf Gen Evol 2: 47-56.
- Pérez R, et al. 2004. Cytogenetic studies on *Mepraia gajardoi* (Heteroptera: Reduviidae). Chromosome behaviour in a spontaneous translocation mutant. Eur J Entomol 101: 211-218.
- Piccolo MI, et al. 2005. High resistance to pyrethroid insecticides associated with ineffective field treatments in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Northern Argentina. J Med Entomol 42: 637-642.
- Poggio MG, et al. 2011. Male meiosis, heterochromatin characterization and chromosomal location of rDNA in *Microtomus lunifer* (Berg, 1900) (Hemiptera: Reduviidae: Hammacerinae). Comp Cytogenet 5: 1-22.

- Poggio MG, et al. 2012. Cytogenetic study in a mutant of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) carrying a spontaneous autosomal fusion and an extra chromosome. *Cytogen Genome Res* 139: 44-51.
- Ribeiro JM, et al. 1998. Role of salivary antihemostatic components in blood feeding by triatomine bugs (Heteroptera). *J Med Entomol* 35: 599-610.
- Rosypal AC, et al. 2007. Serological survey of *Leishmania infantum* and *Trypanosoma cruzi* in dogs from urban areas of Brazil and Colombia, *Vet Parasitol* 149: 172-177.
- Rothhammer F, et al. 1985. Chagas' disease in pre-Columbian South America. *Am J Phys Anthropol* 68: 495-498.
- Roy V, et al. 2005. Evolution of the chromosomal location of rDNA genes in two *Drosophila* species subgroups: *ananassae* and *melanogaster*. *Heredity* 94: 388-395.
- Sainz AC, et al. 2004. Phylogeny of triatomine vectors of *Trypanosoma cruzi* suggested by mitochondrial sequences. *Genetica* 121: 229-240.
- Santos SM, et al. 2007. Evolutionary relationships based on genetic and phenetic characters between *Triatoma maculata*, *Triatoma pseudomaculata* and morphologically related species (Reduviidae: Triatominae). *Infect Genet Evol* 7: 469-475.
- Schofield CJ, 1988. The biosystematics of Triatominae. In: Service, M.W. (Ed.), *Biosystematics of Haematophagous Insects*, Systematics Association special volume 37. Clarendon press, Oxford, UK, pp. 284-312.
- Schofield CJ, 1994. Triatominae: Biología y control. *Eurocomunica* p-80.
- Schofield CJ, Dias JPC, 1999. The Southern Cone Initiative against Chagas Disease. *Adv Parasitol* 42:1-27.
- Schofield CJ, et al. 2006. The future of Chagas disease control. *Trends in Parasitology* 22: 583-588.
- Schofield CJ, Galvão C 2009. Classification, evolution and species groups within the Triatominae. *Acta Trop* 110: 88-100.
- Schubert I, 1984. Mobile nucleolus organizing regions (NORs) in *Allium* (Liliaceae S. Lat) – inferences from the specificity of silver staining. *Plant Syst Evol* 144: 291-305.
- Schubert I, Wobus U 1985. In situ hybridization confirms jumping nucleolus organizing regions in *Allium*. *Chromosoma* 92: 143-148.
- Severi-Aguiar GD, et al. 2006. Meiosis aspects and nucleolar activity in *Triatoma vitticeps* (Heteroptera, Triatominae). *Genetica* 126: 141-151.
- Stenersen J. 2004. *Chemical Pesticides. Mode of Action and Toxicology*. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA.
- Solari AJ, 1979. Autosomal synaptonemal complexes and sex chromosomes without axes in *Triatoma infestans* (Reduviidae, Hemiptera). *Chromosoma* 72: 225-240.
- Ueshima N, 1979. Hemiptera II: Heteroptera. In *Animal cytogenetics. Insecta*, Vol. 3, Part 6, 2nd ed., Gebrüder Borntraeger, Berlin-Stuttgart, 117 pp.
- Villacís AG, et al. 2010. Phenotypic variability of *Rhodnius ecuadoriensis* populations at the Ecuadorian central and southern Andean region. *J Med Entomol* 47: 1034-1043.
- Weirauch C, Munro JB, 2009. Molecular phylogeny of the assassin bugs (Hemiptera: Reduviidae), based on mitochondrial and nuclear ribosomal genes. *Mol Phylogenet Evol* 53: 287-299.
- White MJD, 1973. *Animal Cytology and Evolution*, 3rd edn. Cambridge: Cambridge University Press.
- Wigglesworth VB, 1972. *The principles of insect physiology*. Chapman and Hall.
- Wisnivesky-colli C, et al. 1993. Dispersive flight and house invasion by *Triatoma guasayana* and *Triatoma sordida* in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 88: 27-32.

World Health Organization, 2012

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/index.html>.

Yoshida N, 2008. *T. cruzi* infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity. *Parasitol Int* 2: 105-109.

Yeo M, et al. 2005. Origins of Chagas disease: *Didelphis* species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *International J Parasitol* 35: 225-233

# High Dynamics of rDNA Cluster Location in Kissing Bug Holocentric Chromosomes (Triatominae, Heteroptera)

Y. Panzera<sup>a</sup> S. Pita<sup>a</sup> M.J. Ferreiro<sup>a</sup> I. Ferrandis<sup>a</sup> C. Lages<sup>a</sup> R. Pérez<sup>a</sup>  
A.E. Silva<sup>b</sup> M. Guerra<sup>c</sup> F. Panzera<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Sección Genética Evolutiva, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; <sup>b</sup>Departamento de Biología, Universidade Federal de Paraíba, Areia, and <sup>c</sup>Laboratório de Citogenética Vegetal, Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

## Key Words

Chagas disease vectors · FISH · Hemiptera · Holocentric chromosomes · rDNA variability · Triatominae

## Abstract

In this paper, we determine by fluorescent in situ hybridization the variability in the chromosomal location of 45S rDNA clusters in 38 species belonging to 7 genera of the Triatominae subfamily, using a triatomine-specific 18S rDNA probe. Our results show a striking variability at the inter- and intra-specific level, never reported so far in holocentric chromosomes, revealing the extraordinary genomic dynamics that occurred during the evolution in this group of insects. Our results also demonstrate that the chromosomal position of rDNA clusters is an important marker to disclose chromosomal differentiation in species karyotypically homogenous in their chromosome number.

Copyright © 2012 S. Karger AG, Basel

Triatominae is a subfamily of Reduviidae (Hemiptera, Heteroptera), generally defined by their blood-sucking habit [Lent and Wygodzinsky, 1979]. Most triatomines are vectors of Chagas disease or American trypanoso-

miasis, recognized as the most serious human parasitic disease of Latin America in terms of its social and economic impact, with 15 million people infected and 12,500 deaths per year [World Health Organization, 2006].

There are currently 140 triatomine species, classified into 5 tribes and 15–19 genera [Galvão et al., 2003; Schofield and Galvão, 2009]. Karyotypic information is currently available for 80 species from 9 genera [Panzera et al., 2010]. The triatomines present a very uniform chromosome complement; most species have 20 autosomes, with the exception of only 3 species. The number of sex chromosomes is more variable; 3 sex chromosome systems can be found in males (XY, X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>Y and X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>Y) (table 1) [Panzera et al., 2010]. As observed in all heteropteran species, the triatomines have holocentric chromosomes characterized by the presence of a diffuse or non-localized centromere [Hughes-Schrader and Schrader, 1961].

The lack of a primary constriction and the relatively small chromosomes of similar size are factors that cause difficulties in studying karyotype evolution in Heteroptera. In some cases, C-banding and silver staining of nucleolus organizer regions have been successfully used for longitudinal differentiation in holocentric chromosomes [Kuznetsova et al., 2011].

**Table 1.** Available data on the chromosomal location of 45S rDNA through FISH and relevant cytogenetic traits in Triatominae species

Species	Male diploid number (2n)	Chromosomal location of 45S rDNA	Autosomal C-bands	X with C-bands association	Heterologous	Geographic origin <sup>a</sup>	Reference
<b>Genus <i>Rhodnius</i></b>							
<i>R. prolixus</i> (fig. 1a)	20A+XY	X chromosome	no	no	no	Insectary CDC (USA). Origin: Colombia Colombia, Casanare. S Guatemala, Las Palmas. D Brazil, Santa Catarina. S	this paper
<i>R. domesticus</i> (fig. 1b)	20A+XY	both sex chromosomes; small signal in Y chromosome	no	no	no		this paper
<i>R. pallens</i>	20A+XY	both sex chromosomes; small signal in Y chromosome	C-dots in 1 or both ends of almost all autosomes	no	no	• ND	• Morielle-Souza and Azeredo-Oliveira [2007]
<i>R. colombiensis</i>	20A+XY	X chromosome	C-dots in 5–6 autosomal bivalents	no	no	• Colombia, Norcasia, Caldas. S Colombia, Tolima, Coyaima, Totarco. S	• this paper this paper
<b>Genus <i>Psammolestes</i></b>							
<i>P. tertius</i> (fig. 1c)	20A+XY	both sex chromosomes; small signal in Y chromosome	no	no	no	Insectary Araraquara, Brazil. Origin: Ceará, Espírito Santo, Brazil	this paper
<b>Genus <i>Dipetalogaster</i></b>							
<i>D. maxima</i> (fig. 1d)	20A+XY	X chromosome	no	no	no	Mexico, Baja California, La Paz. S	this paper
<b>Genus <i>Eratyrus</i></b>							
<i>E. cuspidatus</i> (fig. 1e)	20A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	1 X chromosome (X <sub>1</sub> ) and Y chromosome	no	no	no	Colombia, Sucre, San Onofre. S	this paper
<b>Genus <i>Panstrongylus</i></b>							
<i>P. megistus</i> (fig. 1f)	18A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	• 1 autosomal pair and 1 sex chromosome • the largest autosomal pair	no	no	no	• ND	• Morielle-Souza and Azeredo-Oliveira [2007]
<i>P. lignarius</i>	20A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	largest autosomal pair	C-blocks in 1 or both ends of almost all autosomes	yes	yes	• Insectary Fiocruz (Rio de Janeiro, Brazil). Origin: Minas Gerais, Brazil Peru, San Martin, Mallobamba. S	this paper
<i>P. chinai</i> (fig. 1g)	20A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	largest autosomal pair	C-blocks in both ends of all autosomes	yes	yes	Peru, Lambayeque, Zaña. S	this paper
<b>Genus <i>Mepraia</i></b>							
<i>M. spinolai</i> (fig. 1h)	20A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	1 X chromosome	C-blocks in 1 or both ends of all autosomes	yes	yes	Chile, Region III, Copiapó, Inca Oro. P	this paper
<i>M. gajardoii</i> (fig. 1i)	20A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	1 X chromosome	C-dots in some autosomes	no	no	Chile, Region XV, Arica/Parinacota, Caleta Vitor. S	this paper
<b>Genus <i>Triatoma</i></b>							
Group Rubrofasciata Complex Phyllosoma Subcomplex <i>Dimidiata</i>							
<i>T. dimidiata maculipennis</i>	20A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	a large autosomal pair	C-dots in 1 or both ends of almost all autosomes	no	no	Mexico, Oaxaca, Nopala. P Guatemala, Jutiapa, Carrizal. D Colombia, Magdalena. S	this paper
<i>T. dimidiata dimidiata</i>							
<i>T. dimidiata capitata</i> (fig. 2a)							

**Table 1** (continued)

Species	Male diploid number (2n)	Chromosomal location of 45S rDNA	Autosomal C-bands	X with C-bands association	Heterologous Geographic origin <sup>a</sup>	Reference
<b>Subcomplex <i>Phyllosoma</i></b>						
<i>T. pallidipennis</i>	20A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	a large autosomal pair	no	no	Mexico, Morelos, Cuernavaca, S	this paper
<i>T. phyllosoma</i>	20A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	a large autosomal pair	no	no	Mexico, Oaxaca, Santo Domingo, P	this paper
<i>T. mazzottii</i>	20A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	a large autosomal pair	no	no	Mexico, Oaxaca, Puerto Escondido, S	this paper
<b>Subcomplex <i>Flavida</i></b>						
<i>T. flavida</i>	20A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	a large autosomal pair	no	no	Cuba, Peninsula Guanahacabibes Pinar del Río, Caimanera cave, S	this paper
<b>Complex Protracta</b>						
<i>T. nitida</i> (fig. 2b)	18A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	1 autosomal pair (euchromatic)	C-blocks in the 2 largest heterochromatic pairs	no	Guatemala, Quiché, San Andrés Saycabajá, P	this paper
<i>T. protracta</i> (fig. 2c)	20A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	• only 1 chromosome of an autosomal pair • a large autosomal pair	C-blocks in both ends of all autosomes	yes	• Insectary Araraquara (SP, Brazil). Origin: ND • Insectary Fiocruz (RJ, Brazil). Origin: Monte Diablo, Calif., USA	• Severi-Aguiar and Azeredo-Oliveira [2005] • this paper
<b>Complex Lecticularia</b>						
<i>T. lecticularia</i> (fig. 2d)	20A+XY	1 autosomal pair	no	no	Insectary Fiocruz (RJ, Brazil). Origin: Valkiria, Okla., USA	this paper
<b>Group Dispar</b>						
<b>Complex Dispar</b>						
<i>T. carrioni</i> (fig. 2e)	20A+XY	X chromosome	C-dots in the 2 largest autosomal pairs	no	Perú, Piura, Ayacuiba, S	this paper
<i>T. boliviana</i>	20A+XY	X chromosome	no	no	Bolivia, La Paz, Muñecas, Vilaque, S	this paper
<b>Group Infestans</b>						
<b>Complex Infestans</b>						
<b>Subcomplex <i>Rubrovaria</i></b>						
<i>T. caravallói</i> (fig. 2f)	20A+XY	largest autosomal pair	no	no	Insectary Fiocruz (RJ, Brazil). Origin: Rio Grande do Sul, Brazil	this paper
<i>T. rubrovaria</i>	20A+XY	largest autosomal pair	no	no	• Insectary Araraquara (SP) and Fiocruz (RJ), Brazil. Origin: ND • Uruguay, Artigas, S	• Bardella et al. [2010] • this paper
<b>Subcomplex <i>Brasilensis</i></b>						
<i>T. sherlocki</i>	20A+XY	largest autosomal pair	C-blocks in both ends of all autosomes	yes	Insectary Fiocruz (RJ, Brazil). Origin: Brazil, Bahia	this paper
<i>T. brasiliensis</i>	20A+XY	largest autosomal pair	C-blocks in both ends of all autosomes	yes	• Insectary Araraquara (SP) and Fiocruz (RJ), Brazil. Origin: ND • Brazil, Pernambuco, Terra Nova, P	• Bardella et al. [2010] • this paper
<b>Subcomplex <i>matogrossensis</i></b>						
<i>T. matogrossensis</i> (fig. 2g)	20A+XY	both sex chromosomes; small signal in Y chromosome	no	no	• Insectary Araraquara (SP) and Fiocruz (RJ, Brazil). Origin: ND • Insectary Fiocruz (RJ, Brazil), Origin: Serra das Arenas, M.G. do Sul, Brazil	• Bardella et al. [2010] • this paper
<i>T. vandae</i>	20A+XY	both sex chromosomes; small signal in Y chromosome	no	no	Insectary Fiocruz (RJ, Brazil). Origin: Rondonopolis, Matto Grosso, Brazil	this paper

**Table 1** (continued)

Species	Male diploid number (2n)	Chromosomal location of 45S rDNA	Autosomal C-bands	X with C-bands association	Heterologous	Geographic origin <sup>a</sup>	Reference
Subcomplex <i>Sordida</i> <i>T. sordida</i> (fig. 2h)	20A+XY	X chromosome	C-blocks in only 1 end of almost all autosomal pairs	yes	yes	Brazil, Matto Grosso, São Jose do Povo, P	this paper
<i>T. garciabesi</i>	20A+XY	X chromosome	no	no	no	Argentina, Salta, S	this paper
Subcomplex <i>Maculata</i> <i>T. maculata</i> (fig. 2i)	20A+XY	both sex chromosomes; small signal in Y chromosome	C-dots in 1 or both ends of almost all autosomal pairs	no	no	Brazil, Roraima, Boa Vista	this paper
<i>T. pseudomaculata</i> (fig. 2j)	20A+XY	a large autosomal pair	C-dots in 1 or both ends of 3 or 4 autosomal pairs	no	yes	Brazil, Ceará, Sobral, P	this paper
<i>T. wygodzinsky</i>	20A+XY	largest autosomal pair	no	no	no	Brazil, São Paulo, São João da Boa Vista, S	this paper
Subcomplex <i>Infestans</i> <i>T. delpontei</i> (fig. 2k)	20A+XY	a large autosomal pair and X chromosome	C-blocks in only 1 end of all autosomes	yes	yes	Insectary Córdoba (Arg.). Origin: La Merced, Rivadavia, Salta, Argentina. S	this paper
<i>T. platensis</i>	20A+XY	X chromosome	C-blocks in 1 or both ends of the 3 largest autosomal pairs	yes	yes	• Insectary Araraquara (SP, Brazil). Origin: ND • Insectary Córdoba (Arg.). Origin: San Marcos Sierras, Cruz del Eje, Córdoba, Argentina. S • Uruguay, Paysandú. S • Bolivia, Potosí, Sud Chichas, La Deseada. S • Bolivia, Chuquisaca, Sucre, Oropeza, Catapari. D • ND	• Severi-Aguiar and Azeredo-Oliveira [2005] • this paper
<i>T. infestans</i> Andean group (fig. 3a, b)	20A+XY	a large autosomal pair	C-blocks in 1 or both ends of almost all autosomes	yes	yes	• Argentina, Catamarca, Palo Blanco. P • Brazil, Paraíba, Monteiro. D • Uruguay, Rivera. P Insectary Araraquara (Sao Paulo, Brazil) and Flocruz (RJ, Brazil). Origin: ND	• this paper • this paper • this paper • this paper
<i>T. infestans</i> Non-Andean group (fig. 3c, d)	20A+XY	• 1 hybridization signal (not determined) • X chromosome	C-blocks in 1 or both ends of the 3 largest autosomal pairs	no	yes	• Argentina, Catamarca, Palo Blanco. P • Brazil, Paraíba, Monteiro. D • Uruguay, Rivera. P Insectary Araraquara (Sao Paulo, Brazil) and Flocruz (RJ, Brazil). Origin: ND	• Morielle-Souza and Azeredo-Oliveira [2007] • this paper
<i>T. infestans melanosoma</i>	20A+XY	X chromosome	same as above	no	yes	• Argentina, Catamarca, Palo Blanco. P • Brazil, Paraíba, Monteiro. D • Uruguay, Rivera. P Insectary Araraquara (Sao Paulo, Brazil) and Flocruz (RJ, Brazil). Origin: ND	• this paper • this paper • this paper • this paper
<b>Species without group assigned</b> <i>T. tibiamaculata</i>	20A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	• 1 autosomal pair • a large autosomal pair	terminal C-dots in some autosomal pairs	no	no	• Insectary Araraquara (SP, Brazil). Origin: ND • Insectary Flocruz (RJ, Brazil). Origin: Belem, Pará, Brazil Insectary Araraquara (SP, Brazil). Origin: ND • Insectary Flocruz (RJ, Brazil). Origin: Rio de Janeiro, Brazil	• Severi-Aguiar and Azeredo-Oliveira [2005] • this paper
<i>T. vitticeps</i> (fig. 2l)	20A+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> Y	• 2 X chromosomes • the smallest X chromosome (X <sub>3</sub> ) and Y chromosome	no	yes	no	• Insectary Araraquara (SP, Brazil). Origin: Rio de Janeiro, Brazil	• Severi-Aguiar et al. [2006] • this paper

Species are grouped according to the classification of Galvão et al. [2003] and Schofield and Galvão [2009]. <sup>a</sup> ND = Not determined; P = peridomestic; D = domiciliary; S = sylvatic.



Within Triatominae species, C-heterochromatin is the main source of karyotype differentiation both at the interspecific and intraspecific level [Panzera et al., 2010]. C-heterochromatin variability in autosomes and sex chromosomes involves changes in quantity, size, composition, location and behavior of C-blocks during cell divisions. These analyses have been very useful to differentiate several cryptic species [Panzera et al., 1997, 2006] and to detect population variability in species from different genera, such as *Triatoma infestans* [Panzera et al., 1992, 2004], *Panstrongylus geniculatus* [Pérez et al., 2002] and *Rhodnius pallescens* [Gómez-Palacio et al., 2008]. The role of the C-heterochromatin in chromosomal evolution is still unclear, thus creating a need for other cytogenetic markers to reveal the occurrence of chromosomal changes in the genomes with holocentric chromosomes. Using fluorescent in situ hybridization (FISH) with a heterologous ribosomal probe from *Drosophila*, varying 45S ribosomal cluster location has been reported in triatomine species, supporting its utility as chromosomal marker [Severi-Aguiar and Azeredo-Oliveira, 2005; Severi-Aguiar et al., 2006; Morielle-Souza and Azeredo-Oliveira, 2007; Bardella et al., 2010].

The aim of this paper was to determine the degree of variability in the chromosomal location of the 45S rDNA clusters in 38 species belonging to 7 genera of the Triatominae subfamily. To perform the FISH assay, we generated a triatomine-specific 18S rDNA probe. Our findings show a striking variability at inter- and intraspecific levels, revealing the extraordinary genomic dynamics that occurred during the evolution of this group of insects.

## Materials and Methods

### Interspecific Studies

We studied 38 species from 7 genera included in the Rhodniini (*Psammostestes* and *Rhodnius* genera) and Triatomini tribes (*Dipetalogaster*, *Eratyrys*, *Mepraia*, *Panstrongylus* and *Triatoma* genera) (table 1) by FISH. For each species, at least 2 male individuals were analyzed. As far as possible we used individuals collected from natural populations (table 1).

The species analyzed here comprised the 3 sex systems described in males for Triatominae: XY, X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>Y and X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>Y. For the *Triatoma* genus, which involves 80 of the 140 described species, we studied the 3 main clades or groups: the Infestans group (from south and east of the Amazon region), the Rubrofasciata group (species from north of the Amazon, including Central and North America and Old World species) and the Dispar group (west of the Amazon region, only including the Dispar complex). At least 2 species pertaining to 12 of the 13 *Triatoma* groups (complexes or subcomplexes) were studied [Schofield and Galvão, 2009] (table 1).

### Intraspecific Studies

We analyzed different populations from the 3 main vector species of Chagas disease: *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata* and *T. infestans*. For each species, 12 individuals and at least 3 individuals from each geographical origin were studied. In *R. prolixus*, we studied field specimens from Colombia (sylvatic) and Guatemala (domestic) and insectary individuals (Centers for Disease Control and Prevention of Atlanta, Ga., USA). This last material is being used for the entire genome sequencing by The Genome Center at Washington University ([http://genome.wustl.edu/genomes/view/rhodnius\\_prolixus](http://genome.wustl.edu/genomes/view/rhodnius_prolixus)). In *T. dimidiata* we analyzed specimens from 3 subspecies identified by molecular markers [Bargues et al., 2008], all of them showing the cytotype 1 described by Panzera et al. [2006]. In *T. infestans* we studied several populations from both previously described chromosomal groups, named Andean and non-Andean, which have substantial differences in C-heterochromatin content and genome size [Panzera et al., 2004, 2007, 2010].

### DNA Isolation, PCR Amplification and Probe Generation

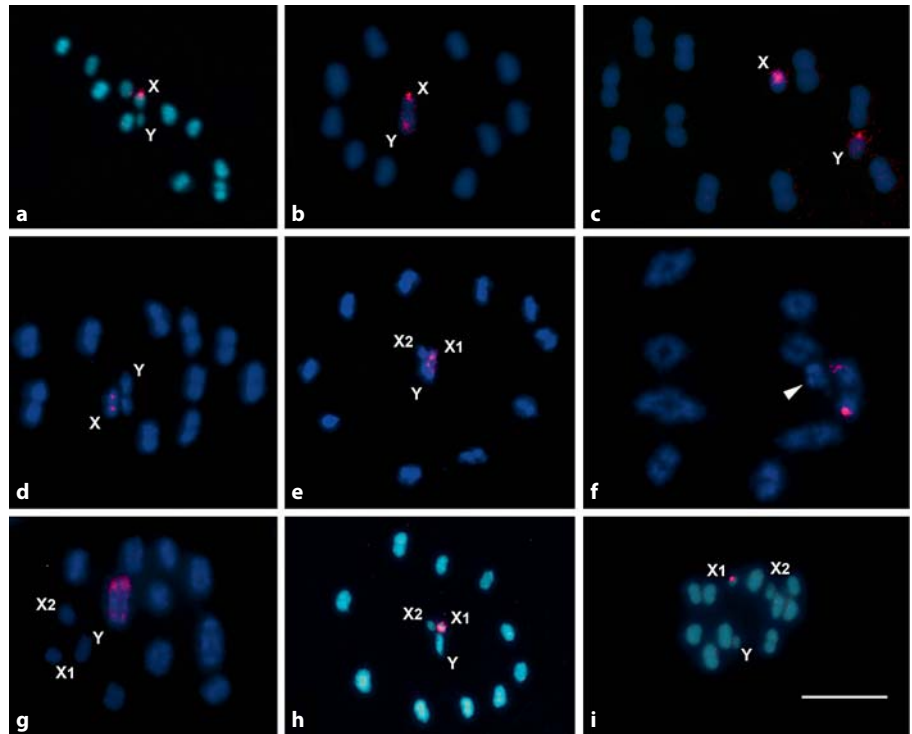
Genomic DNA was isolated from adult *T. infestans* from Uruguay (non-Andean chromosomal group) with standard procedures. The cephalothoraxes were homogenized and solubilized in a lysis buffer containing 50 µg/ml proteinase K and RNase A (100 µg/ml). Following phenol:chloroform (1:1) extractions, the DNA was precipitated with ethanol and resuspended in H<sub>2</sub>O. The 18S rRNA gene of *T. infestans* (accession number Y18750) was used to design new primers (forward: 5'-GTC GGT GTA ACT GGC ATG T-3' and reverse: 5'-GTG TCG TCG GTA GCA TTG A-3'). An 807-bp fragment was amplified by PCR, which was performed in 50 µl using 1 ng genomic DNA, 1× buffer, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs (Fermentas Life Sciences Inc., Haver, Md., USA), 0.3 µM primers (each), and 1 U/µl Taq polymerase (Fermentas). The amplification conditions employed were 30 s at 94°C, 40 s at 48°C and 1 min at 72°C. The PCR product was cloned into a GeneJet vector (Fermentas) and sequenced bidirectionally with vector primers using an ABI Prism 377-Perkin Elmer automated sequencer. Plasmid DNA (1 µg) was labeled by the Nick Translation System (Invitrogen, Carlsbad, Calif., USA) using Cy3-dUTP (GE Healthcare, Life Sciences, Oreg., USA).

### Fluorescence in situ Hybridization

FISH was carried out using squashed gonad preparations, previously fixed in 3:1 ethanol:acetic acid solution. The chromosome preparation was pre-treated with 100 µg/ml RNase A and 0.01 mg/ml pepsin, and post-fixed in 3.7% formaldehyde. The slides were denatured at 75°C for 6 min in a hybridization solution which contained the DNA probe (50 ng per slide), 50% formamide, 2× SSC and 10% dextran sulfate and were hybridized overnight at 37°C. Slides were then washed twice in 2× SSC for 5 min at 42°C and twice in 0.1× SSC for 5 min at room temperature. The slides were mounted with Vectashield H-100 (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, Calif., USA) containing 2 µg/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI).

### Microscopy and Imaging

Slides were analyzed under a Nikon Eclipse 80i epifluorescence microscope. Images were obtained with a Nikon DS-5Mc-U2 digital cooled camera using Nikon Nis Elements 3.1 Advanced



**Fig. 1.** Interspecific variability in the chromosomal location of 45S rDNA in species from 6 genera of Triatominae, excluding *Triatoma*. The rDNA signals are located in 1 sex chromosome (**a, d, h, i**), in 2 sex chromosomes (**b, c, e**) or in 1 autosomal pair (**f, g**). **a** *Rhodnius prolixus* ( $2n = 20A+XY$ ), MII; **b** *R. domesticus* ( $2n = 20A+XY$ ), MII; **c** *Psammolestes tertius* ( $2n = 20A+XY$ ), MI; **d** *Dipetalogaster maxima* ( $2n = 20A+XY$ ), MI; **e** *Eratyrus cuspidatus* ( $2n = 20A+X_1X_2Y$ ), MII; **f** *Panstrongylus megistus* ( $2n = 18A+X_1X_2Y$ ), diplotene. The arrowhead indicates the associated sex chromosomes. **g** *P. chinai* ( $2n = 20A+X_1X_2Y$ ), MI; **h** *Mepraia spinolai* ( $2n = 20A+X_1X_2Y$ ), MII; **i** *M. gajardo* ( $2n = 20A+X_1X_2Y$ ), MI. Bar represents 10  $\mu\text{m}$ .

Research software, and processed with Adobe Photoshop® software. For each species at least 30 meiotic metaphases I (MI) or II (MII) or diplotene stages were studied.

## Results

The 45S rDNA cluster has 1 or 2 chromosome loci per haploid genome, showing 4 location patterns: in the X chromosome (11 species), in the X and Y chromosomes (8 species), in 1 autosomal pair (19 species), or in the X chromosome plus 1 autosomal pair (1 species) (table 1, figs. 1–3). In all cases, the hybridization signals are located in a terminal or subterminal chromosome position. Table 1 summarizes our results and includes previous reports of rDNA cluster location by FISH and other relevant cytogenetic traits of the Triatominae, which will be considered in the results and discussion.

### Genus *Rhodnius*

We analyzed 4 species: 2 without autosomal C-heterochromatin (*R. prolixus*, *R. domesticus*) and 2 with autosomal C-heterochromatin (*R. pallenscens*, *R. colombiensis*) (table 1). In *R. prolixus* and *R. colombiensis*, the rDNA cluster was located on the X chromosome (fig. 1a). In *R.*

*domesticus* and *R. pallenscens* the hybridization signals were observed in both sex chromosomes (X and Y) (fig. 1b).

### Genus *Psammolestes*

The only species studied of this genus, *P. tertius*, presented the rDNA clusters on the X and Y chromosomes (fig. 1c).

### Genus *Dipetalogaster*

*D. maxima* is the only species belonging to this genus. The rDNA clusters were localized on the X chromosome (fig. 1d).

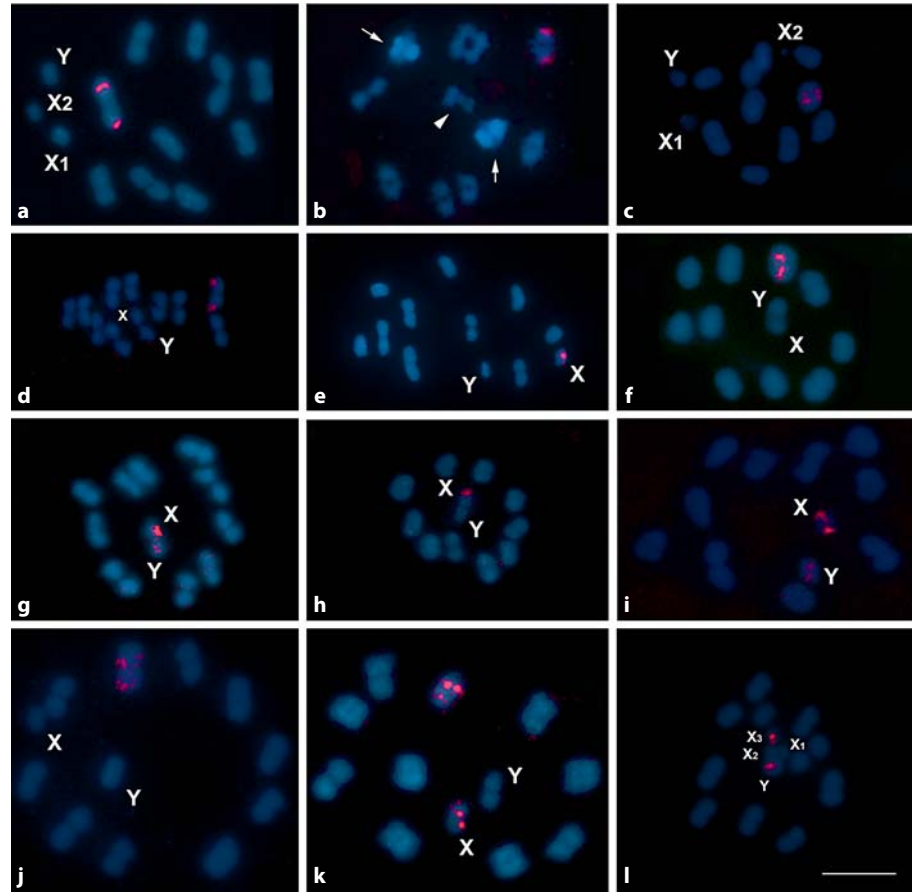
### Genus *Eratyrus*

The only species analyzed, *E. cuspidatus*, has no autosomal C-heterochromatin (table 1) and carried the rDNA in 1 euchromatic X chromosome ( $X_1$ ) and the Y chromosome (heterochromatic). The hybridization signals presented the same intensities on both sex chromosomes (fig. 1e).

### Genus *Panstrongylus*

The 3 species analyzed showed the same rDNA location: in the largest autosomal pair. In *P. lignarius* and *P. chinai* the clusters were located on 1 C-heterochromatic

**Fig. 2.** Interspecific variability in the chromosomal location of 45S rDNA in triatomine species of the genus *Triatoma*. The rDNA signals are located in 1 sex chromosome (**e, h**), in 2 sex chromosomes (**g, i, l**), in 1 autosomal pair (**a–d, f, j**), or in 1 autosomal pair and X chromosome (**k**). **a** *T. dimidiata* ( $2n = 20A+X_1X_2Y$ ), MI; **b** *T. nitida* ( $2n = 18A+X_1X_2Y$ ), diplotene. Two heterochromatic bivalents are indicated by arrows. The association of 3 sex chromosomes is indicated by the arrowhead. **c** *T. protracta* ( $2n = 20A+X_1X_2Y$ ), MI; **d** *T. lecticularia* ( $2n = 20A+XY$ ), MII; **e** *T. carrioni* ( $2n = 20A+XY$ ), MII; **f** *T. carvalhoi* ( $2n = 20A+XY$ ), MI; **g** *T. matogrossensis* ( $2n = 20A+XY$ ), MII; **h** *T. sordida* ( $2n = 20A+XY$ ), MII; **i** *T. maculata* ( $2n = 20A+XY$ ), MI; **j** *T. pseudomaculata* ( $2n = 20A+XY$ ), MI; **k** *T. delpontei* ( $2n = 20A+XY$ ), MI; **l** *T. vitticeps* ( $2n = 20A+X_1X_2X_3Y$ ), MII. Bar represents 10  $\mu\text{m}$ .



autosome (table 1, fig. 1g), while in *P. megistus* it was on a euchromatic autosome (table 1, fig. 1f).

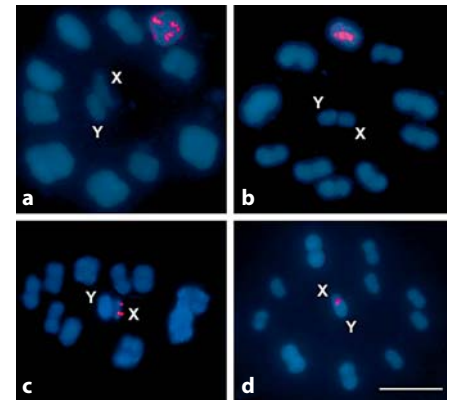
#### Genus *Mepraia*

In both species (*M. spinolai* and *M. gajardoi*) the rDNA cluster was observed in one of the 2 X chromosomes. This X chromosome had C-heterochromatin in *M. spinolai* but not in *M. gajardoi* (table 1, fig. 1h, l, respectively).

#### Genus *Triatoma*

In this genus we analyzed 24 species belonging to 3 main clades or groups, and 2 unassigned species. This genus presented the 4 chromosomal location patterns of 45S rDNA described above (table 1, figs. 2, 3).

**Group *Rubrofasciata*.** The 8 species analyzed presented the hybridization signal in 1 autosomal pair, despite different cytogenetic features (table 1). The species analyzed have C-heterochromatic blocks (fig. 2c) or not (fig. 2a, b, d), a multiple sex system ( $X_1X_2Y$ ) (fig. 2a–c) or an XY sex system (fig. 2d) and different autosomal numbers (18 or 20 chromosomes).



**Fig. 3.** Intraspecific variability in the chromosome location of the 45S rDNA in *Triatoma infestans* ( $2n = 20A+XY$ ). **a, b** Andean group, MI and MII, respectively. The rDNA signals are located in 1 autosomal pair. **c, d** Non-Andean group, MI and MII, respectively. The rDNA signals are located in 1 sex chromosome (X chromosome). Bar represents 10  $\mu\text{m}$ .

*Group Dispar.* Here, we described the chromosome complement of *T. boliviana* and *T. carrioni* for the first time. Both species present a diploid chromosome number of 22 chromosomes ( $2n = 20A+XY$  in males,  $XX$  in females) and the 45S rDNA cluster was located on the euchromatic X chromosome (table 1, fig. 2e).

*Group Infestans.* We studied 16 species from the 5 subcomplexes included in this group (table 1).

*Subcomplexes Rubrovaria and Brasiliensis.* The 4 species analyzed (2 for each subcomplex) showed the same rDNA location: in the largest autosomal pair (fig. 2f).

*Subcomplex Matogrossensis.* In the 2 species analyzed, rDNA signals were located on both sex chromosomes (X and Y). However, the intensity of the hybridization signals was different, the one on the Y chromosome being less intense (fig. 2g).

*Subcomplex Sordida.* The 2 species analyzed showed the same rDNA location, i.e. in the X chromosome (fig. 2h).

*Subcomplex Maculata.* In the 3 species analyzed, we found 2 different chromosome locations for the 45S rDNA cluster. In *T. maculata*, 45S rDNA was located in both sex chromosomes (fig. 2i), while in *T. pseudomaculata* and *T. wygodzinsky* it was observed in 1 autosomal pair (fig. 2j).

*Subcomplex Infestans.* We studied the 3 species of this subcomplex: *T. delpontei*, *T. platensis* and *T. infestans*. In *T. delpontei*, hybridization signals were located on an autosomal pair and on the X chromosome (fig. 2k). In *T. platensis*, the rDNA clusters were located in the X chromosome. In the 2 chromosomal groups of *T. infestans* (Andean and non-Andean) previously identified by Panzera et al. [2004], we found a striking intraspecific variability. The Andean group showed the rRNA genes located in 1 autosomal pair (fig. 3a, b) and the non-Andean group showed the signal on the X chromosome (fig. 3c, d).

*Unassigned Species.* *T. tibiamaculata* showed the signal on the largest autosomal pair, while in *T. vitticeps* it was located on the smallest X chromosome ( $X_3$ ) and in the largest sex chromosome identified as Y (fig. 2l).

## Discussion

### Variability of rDNA Location in Heteroptera

Reports on the number and location of rDNA clusters in Heteroptera using silver staining techniques and FISH with rDNA probes are very scarce and include no more than 33 species distributed in 8 families [for review see

Papeschi and Bressa, 2006a, b; Grozeva et al., 2010, 2011]. This is the first report attempting to address and study the variability of the 45S rDNA cluster location in a great number of species included in a single subfamily of Heteroptera.

We observed 1 or 2 loci of the rDNA cluster per haploid genome located either in the sex chromosomes and/or in 1 autosome (table 1). The low number of loci, their chromosomal position (terminal or subterminal) and their distribution in sex chromosomes or autosomal pairs are in agreement with other reports in Heteroptera [for review see Papeschi and Bressa, 2006a, b; Grozeva et al., 2011; Poggio et al., 2011]. The distribution patterns of the rDNA clusters reveal an extensive variability among the 38 analyzed species, never reported so far. The results described herein, as well as some results previously reported [for review see Panzera et al., 2010], indicate that the Triatominae is one of the chromosomally most diverse subfamilies within the Heteroptera suborder, in spite of their homogeneity in chromosome number.

### Comparative Results in Triatominae rDNA Location

We analyzed a new sample of the 10 species previously described through FISH [Severi-Aguiar and Azeredo-Oliveira, 2005; Severi-Aguiar et al., 2006; Morielle-Souza and Azeredo-Oliveira, 2007; Bardella et al., 2010], most of them from natural populations (table 1). For 3 species, our results were different from the previously reported data (table 1). In *T. vitticeps* ( $2n = 20A+X_1X_2X_3Y$ ), Severi-Aguiar et al. [2006] described the hybridization signals on 2 X chromosomes. Based on the chromosome segregation during both meiotic divisions, we established that the rDNA is located in 1 X chromosome and in the Y chromosome (fig. 2l). In *T. protracta*, Severi-Aguiar and Azeredo-Oliveira [2005] described a heterozygous pattern in 1 autosomal pair. We found the rDNA signals on both autosomal homologues (homozygous pattern) (fig. 2c). In *P. megistus*, Morielle-Souza and Azeredo-Oliveira [2007] described the hybridization signals on the sex chromosome. Our results indicate that the 45S rDNA is located in an autosomal pair (fig. 1f). These discrepancies may derive from the different geographical origins of the individuals analyzed, changes in the FISH conditions and/or the use of different rDNA probes (i.e. heterologous *Drosophila* probe vs. homologous *Triatoma* probe).

### Correlation between rDNA Location and Chromosomal Traits

In Reduviidae, a correlation between rDNA chromosomal location and sex systems [Poggio et al., 2011] has

been suggested. However, our data indicates that in triatomines, the position of rDNA in autosomes or sex chromosomes does not appear to be correlated with the sex chromosome mechanism (table 1). Species with the same sex mechanism, even from the same genus, presented different location patterns; for example *T. carrioni* and *T. carcavallo* (fig. 2e, f, respectively). Furthermore, species with different sex mechanisms presented the rDNA cluster in the same location; for example *T. protracta* and *T. pseudomaculata* (fig. 2c, j, respectively).

In a wide range of organisms, both among closely related species and even within a given species, variations in the position and number of rDNA clusters are associated with C-heterochromatin changes [Andronico et al., 1985; Hirai et al., 1996; Criniti et al., 2005; Roy et al., 2005; Raskina et al., 2008; Gomes de Oliveira et al., 2010]. Our results show that in most triatomine species the rDNA is not associated with C-heterochromatin regions (table 1). In closely related species within the *Panstrongylus* genus, the rDNA signal is located in the second largest autosome pair, regardless of the presence or absence of C-heterochromatin (fig. 1g, f, respectively). In *T. nitida*, despite the fact that it has 2 almost entirely heterochromatic autosomal pairs, the rDNA signal is located in a euchromatic autosomal pair (table 1, fig. 2b). As observed for the autosomes, the rDNA cluster may be located either on the C-heterochromatic (fig. 1h, 2h) or euchromatic X chromosomes (figs. 1a, b, d, i, 2e, 3c, d).

We cannot rule out a relationship between rDNA clusters and repetitive sequences not revealed by C-banding. Repetitive sequences are thought to play an important role in ribosomal cluster rearrangements. In several species, including Hemiptera, rDNA clusters have been related with the presence of macrosatellite and telomere-like repeats [Mandrioli et al., 1999a, b; Bizarro et al., 2000].

#### *Evolutionary and Taxonomic Aspects*

Within different groups of insects, including species with holocentric chromosomes, interspecific comparisons of the rDNA location have been frequently used to trace evolutionary pathways [Hirai et al., 1996; Roy et al., 2005; Cabrero and Camacho, 2008; Almeida et al., 2010; Nguyen et al., 2010]. However, among Heteroptera this type of analysis has not been successfully implemented, taking into account the few species that have been studied. The only previous study about sex chromosome evolution involving the ribosomal genes in Heteroptera was performed in 3 species of the genus *Dysdercus* [Bressa et al., 2009].

Despite the extensive variation found in the rDNA position within the Triatomine subfamily, in several closely related species, such as the Rubrofasciata group of the genus *Triatoma* and the *Panstrongylus* species, the 45S ribosomal cluster is observed in the same chromosomal location (table 1). This would reflect that in these groups of species this location is an evolutionarily conserved genetic trait. However, the interspecific variations within the genus *Rhodnius* (fig. 1a, b) and the subcomplex Infestans (figs. 2k, 3) clearly show that the rDNA cluster position can vary in a short period of time, even among closely related species.

The subcomplex Infestans comprises 3 closely related species: *T. platensis*, *T. delpontei* and *T. infestans*. These species share a recent common ancestor [Ueshima et al., 1966] and present an identical chromosome number [Panzer et al., 1995]. However, the 45S rDNA cluster is observed in different locations, in the X chromosome in *T. platensis* and in 1 X and 1 autosomal pair in *T. delpontei* (fig. 2k). Moreover, *T. infestans* presents a polymorphism that depends on the geographic origin of the individuals (see intraspecific variation below) (fig. 3). This striking ribosomal gene variation revealed that these closely related species have undergone major chromosomal rearrangements in a relatively short period of time when compared to other triatomine groups. This indicates that different triatomine groups have dissimilar chromosomal differentiation rates, as suggested for the C-heterochromatin variation [Panzer et al., 2010].

#### *Intraspecific Variability of rDNA Location*

Population studies were performed in the 3 main Chagas disease vectors (table 1). No intraspecific variation was revealed in *R. prolixus* and *T. dimidiata* populations. In *T. infestans*, we detected striking differences in rDNA location between both previously described chromosomal groups (Andean and non-Andean) (fig. 3). These groups can hybridize and produce viable progeny, and they are distinguishable by C-banding, flow cytometry [Panzer et al., 2004] and molecular markers [Bargues et al., 2006; Quisberth et al., 2011]. The variation in rDNA cluster location reveals that the differentiation process between both chromosomal groups of *T. infestans* involved significant genomic reorganization of essential coding sequences.

Although intraspecific variation of rDNA cluster location is relatively common in plants [Pedrosa et al., 2006], its occurrence in animals is exceptionally rare and it has only been reported in certain species of amphibians [Andronico et al., 1985] and fishes [Castro et al., 2001]. In

insects, there is only 1 description in the grasshopper species *Eyprepocnemis plorans* [Cabrero et al., 2003a, b]. The intraspecific variation in *E. plorans* involved an increase in the number of chromosomes which harbor a ribosomal cluster, resulting in populations with a variable number of rDNA-bearing chromosomes (from 4 to 8 chromosomes) [Cabrero et al., 2003a]. On the contrary, in *T. infestans* populations the rDNA cluster changes its location between autosomes and sex chromosomes (fig. 3). As far as we know, the complete transference of rDNA between different chromosome types (autosomes vs. sex chromosomes) has never been reported in any species. In conclusion, this is not only the first report of population polymorphism detected in Heteroptera and in holocentric chromosomes, but it is also the description of a novel type of intraspecific reorganization of rDNA clusters.

#### *Mechanisms of rDNA Variation*

The capability to relocate, expand and contract the number of copies is a well recognized property of rDNA. Changes in the location of rDNA loci could be the consequence of structural chromosome rearrangements that imply modifications in chromosome number, such as reported in plants [Hall and Parker, 1995] and certain groups of insects [Hirai et al., 1996; Bressa et al., 2009]. However, in Triatominae, given that the number of autosomes remains almost unchanged (77 of the 80 described species have 20 autosomes), it is possible to rule out this type of chromosomal rearrangements as the primary mechanism of variation in the location of rDNA loci.

The diversity in the rDNA position and its occurrence in more than one chromosome suggest that transposition [Schubert, 1984; Schubert and Wobus, 1985] and/or ectopic recombination [Hanson et al., 1996] are the mechanisms responsible for Triatominae rDNA changes. Certainly the occurrence of these mechanisms is largely controlled by chromosome proximity patterns in the nucleus. In triatomines, heterologous associations among heterosomes (Xs/Y sex chromosomes), as well as non-homologous autosomes, are very common phenomena and could favor the observed rDNA variation.

Sex chromosomes are achiasmatic but remain intimately associated during mitotic interphase and the first meiotic prophase. This heterologous association among sex chromosomes during cell divisions is particularly regular and it is present in all triatomine species [Panzera et al., 2010]. The large number of triatomine species with rDNA loci in 2 sex chromosomes (see table 1), may reflect the existence of chromosomal exchanges between X and Y sex chromosomes during this association.

Other triatomine species with autosomal heterochromatin present different kinds of chromosomal associations among non-homologous chromosomes, i.e. sex chromosomes with autosomes and/or autosomes with autosomes, giving rise to different types of chromocenters [for review see Panzera et al., 2010]. The existence of these heterologous associations should greatly facilitate the occurrence of ectopic recombination and transposition, and as a consequence, rDNA variation. Those groups of species with heterologous associations show greater variation in the chromosome position of the ribosomal loci, such as the *Infestans* subcomplex (table 1).

#### **Conclusions**

Our findings reveal 4 features of 45S rDNA loci not previously observed in Heteroptera: (1) high level of rDNA location variability within a chromosomal homogeneous group (Triatominae subfamily), (2) four chromosomal patterns of rDNA location within a single genus (*Triatoma*), (3) simultaneous presence of 45S rDNA clusters in 1 sex chromosome and 1 autosomal pair (*T. delponteii*, fig. 2k), and (4) detection of intraspecific variation in the rDNA cluster location (*T. infestans*, fig. 3). This conspicuous diversity shows that the genomes of the Triatominae species are very dynamic and have undergone several chromosomal reorganizations. Our results support the hypothesis that the chromosomal position of rDNA clusters is an important marker to evidence chromosomal differentiation in species karyotypically homogeneous in their chromosome number.

#### **Acknowledgements**

This work was partially funded by the 'Comisión Sectorial de Investigación Científica' (CSIC-Udelar-Uruguay). We are also thankful for additional national funds (PEDECIBA and ANII) and international collaboration from the AMSUD Pasteur Program and the NIH Project with Loyola University (Grant Number: 1R15AI079672-01A1). We are particularly grateful to Ellen Dotson (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Ga., USA) for the invaluable collaboration and for providing several specimens. We also thank the following ECLAT members for supplying triatomine material: J. Jurberg and C. Galvão (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil), D. Canale (Centro de Referencia de Vectores, Córdoba, Argentina), S.F. Brenière (IRD, La Paz, Bolivia), C. Monroy (Univ. San Carlos, Guatemala), N. Jaramillo (Univ. Antioquia, Medellín, Colombia), P.M. Salazar-Schettino (UNAM, Mexico), O. Fuentes (IPK, Cuba), and F. Vargas (Univ. Nacional de Trujillo, Peru).

## References

- Almeida MC, Goll LG, Artoni RF, Nogaroto V, Matiello RR, Vicari MR: Physical mapping of 18S rDNA cistron in species of the *Omo-phoita* genus (Coleoptera, Alticinae) using fluorescent in situ hybridization. *Micron* 41: 729–734 (2010).
- Andronico F, De Lucchini S, Graziani F, Nardi I, Batistoni R, Barsacchi-Pilone G: Molecular organization of ribosomal RNA genes clustered at variable chromosomal sites in *Triturus vulgaris meridionalis* (Amphibia, Urodela). *J Mol Biol* 186:219–229 (1985).
- Bardella VB, Gaeta ML, Vanzela AL, Azeredo-Oliveira MT: Chromosomal location of heterochromatin and 45S rDNA sites in four South American triatomines (Hemiptera: Reduviidae). *Comp Cytogenet* 4:141–149 (2010).
- Bargues MD, Klisiowicz DR, Panzera F, Noireau F, Marcilla A, et al: Origin and phylogeography of the Chagas disease main vector *Triatoma infestans* based on nuclear rDNA sequences and genome size. *Infect Genet Evol* 6:46–62 (2006).
- Bargues MD, Klisiowicz DR, González-Candelas F, Ramsey JM, Monroy C, et al: Phylogeography and genetic variation of *Triatoma dimidiata*, the main Chagas disease vector in Central America, and its position within the genus *Triatoma*. *PLOS Negl Trop Dis* 2:e233 (2008).
- Bizzaro D, Mandrioli M, Zanotti M, Giusti M, Manicardi GC: Chromosome analysis and molecular characterization of highly repeated DNAs in the aphid *Acyrtosiphon pisum* (Aphididae, Hemiptera). *Genetica* 108:197–202 (2000).
- Bressa MJ, Papeschi AG, Vítková M, Kubičková S, Fuková I, et al: Sex chromosome evolution in cotton stainers of the genus *Dysdercus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Cytogenet Genome Res* 125:292–305 (2009).
- Cabrero J, Camacho JPM: Location and expression of ribosomal RNA genes in grasshoppers: abundance of silent and cryptic loci. *Chromosome Res* 16:595–607 (2008).
- Cabrero J, Perfectti F, Gómez R, Camacho JPM, López-León MD: Population variation in the A chromosome distribution of satellite DNA and ribosomal DNA in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Chromosome Res* 11: 375–381 (2003a).
- Cabrero J, Bugrov A, Warchalowska-Sliwa E, López-León MD, Perfectti F, Camacho JP: Comparative FISH analysis in five species of Eyprepocnemid grasshoppers. *Heredity* 90:377–381 (2003b).
- Castro J, Rodríguez S, Pardo BG, Sánchez L, Martínez P: Population analysis of an unusual NOR-site polymorphism in brown trout (*Salmo trutta* L.). *Heredity* 86:291–302 (2001).
- Criniti A, Simonazzi G, Cassanelli S, Ferrari M, Bizzaro D, Manicardi GC: X-linked heterochromatin distribution in the holocentric chromosomes of the green apple aphid *Aphis pomi*. *Genetica* 124:93–98 (2005).
- Galvão C, Carcavallo RU, Rocha DS, Jurberg J: A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa* 202:1–36 (2003).
- Gomes de Oliveira S, de Cassia de Moura R, Barros e Silva AE, de Souza MJ: Cytogenetic analysis of two *Coprophanæus* species (Scarabaeidae) revealing wide constitutive heterochromatin variability and the largest number of 45S rDNA sites among Coleoptera. *Micron* 41:960–965 (2010).
- Gómez-Palacio A, Jaramillo-Ocampo N, Triana-Chávez O, Saldaña A, Calzada J, et al: Chromosome variability in the Chagas disease vector *Rhodnius pallescens* (Hemiptera: Reduviidae: Rhodniini). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103:160–164 (2008).
- Grozeva S, Kuznetsova V, Anokhin B: Bed bug cytogenetics: karyotype, sex chromosome system, FISH mapping of 18S rDNA, and male meiosis in *Cimex lectularius* Linnaeus, 1758 (Hemiptera: Cimicidae). *Comp Cytogen* 4:151–160 (2010).
- Grozeva S, Kuznetsova VG, Anokhin BA: Karyotypes, male meiosis and comparative FISH mapping of 18S ribosomal DNA and telomeric (TTAGG)<sub>n</sub> repeat in eight species of true bugs (Hemiptera, Heteroptera). *Comp Cytogen* 5:355–374 (2011).
- Hall KJ, Parker JS: Stable chromosome fission associated with rDNA mobility. *Chromosome Res* 3:417–422 (1995).
- Hanson RE, Islam-Faridi MN, Percival EA, Crane CF, Ji Y, et al: Distribution of 5S and 18S-28S rDNA loci in a tetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and its putative diploid ancestors. *Chromosoma* 105:55–61 (1996).
- Hirai H, Yamamoto MT, Taylor RW, Imai HT: Genomic dispersion of 28S rDNA during karyotypic evolution in the ant genus *Myrmecia* (Formicidae). *Chromosoma* 105:190–196 (1996).
- Hughes-Schrader S, Schrader F: The kinetochore of the Hemiptera. *Chromosoma* 12: 327–350 (1961).
- Kuznetsova VG, Grozeva SM, Nokkala S, Nokkala C: Cytogenetics of the true bug infraorder Cimicomorpha (Hemiptera, Heteroptera): a review. *ZooKeys* 154:31–70 (2011).
- Lent H, Wygodzinsky P: Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas disease. *Bull Am Mus Nat Hist* 163:123–520 (1979).
- Mandrioli M, Bizzaro D, Manicardi GC, Gionghi D, Bassoli L, Bianchi U: Cytogenetic and molecular characterization of a highly repeated DNA sequence in the peach potato aphid *Myzus persicae*. *Chromosoma* 108: 436–442 (1999a).
- Mandrioli M, Bizzaro D, Giusti M, Manicardi GC, Bianchi U: The role of rDNA genes in X chromosome association in the aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Genome* 42:381–386 (1999b).
- Morielle-Souza A, Azeredo-Oliveira MTV: Differential characterization of holocentric chromosomes in triatomines (Hemiptera, Triatominae) using different staining techniques and fluorescent in situ hybridization. *Genet Mol Res* 6:713–720 (2007).
- Nguyen P, Sahara K, Yoshido A, Marec F: Evolutionary dynamics of rDNA clusters on chromosomes of moths and butterflies (Lepidoptera). *Genetica* 138:343–354 (2010).
- Panzera F, Alvarez F, Sanchez-Rufas J, Pérez R, Suja JA, et al: C-heterochromatin polymorphism in holocentric chromosomes of *Triatoma infestans* (Hemiptera-Reduviidae). *Genome* 35:1068–1074 (1992).
- Panzera F, Pérez R, Panzera Y, Alvarez F, Scvortzoff E, et al: Karyotype evolution in holocentric chromosomes of three related species of triatomines (Hemiptera-Reduviidae). *Chromosome Res* 3:143–150 (1995).
- Panzera F, Hornos S, Pereira J, Cestau R, Canale D, et al: Genetic variability and geographic differentiation among three species of triatomine bugs (Hemiptera-Reduviidae). *Am J Trop Med Hyg* 57:732–739 (1997).
- Panzera F, Dujardin JP, Nicolini P, Caraccio MN, Rose V, et al: Genomic changes of Chagas disease vector, South America. *Emerg Infect Dis* 10:438–446 (2004).
- Panzera F, Ferrandis I, Ramsey J, Ordoñez R, Salazar-Schettino PM, et al: Chromosomal variation and genome size support existence of cryptic species of *Triatoma dimidiata* with different epidemiological importance as Chagas disease vectors. *Trop Med Intern Health* 11:1092–1103 (2006).
- Panzera F, Ferrandis I, Ramsey J, Salazar-Schettino PM, Cabrera M, et al: Genome size determination in Chagas disease transmitting bugs (Hemiptera-Triatominae) by flow cytometry. *Am J Trop Med Hyg* 76:516–521 (2007).
- Panzera F, Pérez R, Panzera Y, Ferrandis I, Ferreira MJ, Calleros L: Cytogenetics and genome evolution in the subfamily Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). *Cytogenet Genome Res* 128:77–87 (2010).
- Papeschi AG, Bressa MJ: Classical and molecular cytogenetics in Hemiptera. *Res Adv Entomol* 1:1–10 (2006a).

- Papeschi AG, Bressa MJ: Evolutionary cytogenetics in Heteroptera. *J Biol Res* 5:3–21 (2006b).
- Pedrosa HA, de Almeida CC, Mosiolek M, Blair MW, Schweizer D, Guerra M: Extensive ribosomal DNA amplification during Andean common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) evolution. *Theor Appl Genet* 112:924–933 (2006).
- Pérez R, Hernández M, Caraccio MN, Rose V, Valente SA, et al: Chromosomal evolution trends of the genus *Panstrongylus* (Hemiptera, Reduviidae), vectors of Chagas disease. *Infect Genet Evol* 2:47–56 (2002).
- Poggio MG, Bressa MJ, Papeschi AG: Cytogenetics male meiosis, heterochromatin characterization and chromosomal location of rDNA in *Microtomus lunifer* (Berg, 1900) (Hemiptera: Reduviidae: Hammacerinae). *Comp Cytogen* 5:1–22 (2011).
- Quisberth S, Waleckx E, Monje M, Chang B, Noireau F, Brenière SM: Andean and non-Andean ITS-2 and mtCytB haplotypes of *Triatoma infestans* are observed in the Gran Chaco (Bolivia): population genetics and the origin of reinfestation. *Infect Genet Evol* 11: 1006–1014 (2011).
- Raskina O, Barber JC, Nevo E, Belyayev A: Repetitive DNA and chromosomal rearrangements: speciation-related events in plant genomes. *Cytogenet Genome Res* 120:351–357 (2008).
- Roy V, Monti-Dedieu L, Chaminade N, Siljak-Yakovlev S, Aulard S, et al: Evolution of the chromosomal location of rDNA genes in two *Drosophila* species subgroups: *ananassae* and *melanogaster*. *Heredity* 94:388–395 (2005).
- Schofield CJ, Galvão C: Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Trop* 110:88–100 (2009).
- Schubert I: Mobile nucleolus organizing regions (NORs) in *Allium* (Liliaceae S. Lat) – inferences from the specificity of silver staining. *Plant Syst Evol* 144:291–305 (1984).
- Schubert I, Wobus U: In situ hybridization confirms jumping nucleolus organizing regions in *Allium*. *Chromosoma* 92:143–148 (1985).
- Severi-Aguiar GDC, Azeredo-Oliveira MTV: Localization of rDNA sites in holocentric chromosomes of three species of triatomines (Heteroptera, Triatominae). *Genet Mol Res* 4:704–709 (2005).
- Severi-Aguiar GDC, Lourenço LB, Bicudo HEMC, Azeredo-Oliveira MTV: Meiosis aspects and nucleolar activity in *Triatoma vitticeps* (Triatominae, Heteroptera). *Genetica* 126:141–151 (2006).
- Ueshima N: Cytotaxonomy of the Triatominae (Reduviidae: Hemiptera). *Chromosoma* 18: 97–122 (1966).
- World Health Organization: Report of the Scientific Working Group on Chagas Disease, Buenos Aires, Argentina 2005, Geneva, p 7 (2006).



# Chromosomal divergence and evolutionary inferences in Rhodniini based on the chromosomal location of ribosomal genes

Sebastián Pita<sup>1</sup>, Francisco Panzera<sup>1</sup>, Inés Ferrandis<sup>1</sup>,  
Cleber Galvão<sup>2</sup>, Andrés Gómez-Palacio<sup>3</sup>, Yanina Panzera<sup>1/+</sup>

<sup>1</sup>Sección Genética Evolutiva, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

<sup>2</sup>Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz,

Rio de Janeiro, RJ, Brasil <sup>3</sup>Grupo de Biología y Control de Enfermedades Infecciosas, Sede de Investigación Universitaria, Instituto de Biología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

*In this study, we used fluorescence in situ hybridisation to determine the chromosomal location of 45S rDNA clusters in 10 species of the tribe Rhodniini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). The results showed striking inter and intraspecific variability, with the location of the rDNA clusters restricted to sex chromosomes with two patterns: either on one (X chromosome) or both sex chromosomes (X and Y chromosomes). This variation occurs within a genus that has an unchanging diploid chromosome number (2n = 22, including 20 autosomes and 2 sex chromosomes) and a similar chromosome size and genomic DNA content, reflecting a genome dynamic not revealed by these chromosome traits. The rDNA variation in closely related species and the intraspecific polymorphism in Rhodnius ecuadoriensis suggested that the chromosomal position of rDNA clusters might be a useful marker to identify recently diverged species or populations. We discuss the ancestral position of ribosomal genes in the tribe Rhodniini and the possible mechanisms involved in the variation of the rDNA clusters, including the loss of rDNA loci on the Y chromosome, transposition and ectopic pairing. The last two processes involve chromosomal exchanges between both sex chromosomes, in contrast to the widely accepted idea that the achiasmatic sex chromosomes of Heteroptera do not interchange sequences.*

Key words: chromosomal evolution - Chagas disease vectors - Triatominae - holocentric chromosomes - rDNA variability

The subfamily Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) currently comprises 142 species of blood-sucking insects, assembled in five-six tribes and 15-19 genera (Galvão et al. 2003, Schofield & Galvão 2009, Rosa et al. 2012). The Rhodniini tribe is the second largest and includes two genera: *Rhodnius* (18 species) and *Psammostes* (3 species). Although the phylogenetic origin of many triatomine tribes and genera remains problematic (Hwang & Weirauch 2012), the Rhodniini tribe is considered monophyletic, comprising two groups, namely the robustus and pictipes lineages, with the *Psammostes* genus integrating the robustus lineage (Monteiro et al. 2000, 2002). Rhodniini species display different degrees of synanthropic behaviour from sylvatic to highly domestic (Abad-Franch et al. 2009). The domestic species are of great medical interest for their role as vectors of Chagas disease, particularly *Rhodnius prolixus* in Venezuela and Colombia (and also in parts of Central America) (Hashimoto & Schofield 2012), *Rhodnius pallescens* in Panama, Colombia, Costa Rica and Nicaragua (Calzada et al. 2010), *Rhodnius ecuadoriensis* in Ecuador and northern Peru (Cuba Cuba et al. 2002), *Rhodnius*

*stali* in Bolivia (Matias et al. 2003) and several species in the Amazon Region (Aguilar et al. 2007).

As in other Heteroptera, the Triatominae possess holocentric chromosomes characterised by a diffuse or non-localised centromere (Hughes-Schrader & Schrader 1961). The main source of karyotype variation in this subfamily involves changes in chromosome number, differences in C-heterochromatin (such as the number, size and location of C-blocks) and genomic DNA content (Panzera et al. 2007, 2010). However, Rhodniini karyotypes seem to be highly conserved, with no known variations either in the number of autosomes (20) or sex mechanism (XY in males, XX in females). In addition, Rhodniini species exhibit chromosomes of similar size and possess the lowest genomic DNA content of all the triatomines (Panzera et al. 2007). Only a few Rhodniini species present C-heterochromatin (*Rhodnius colombiensis*, *Rhodnius nasutus*, *R. pallescens* and *Rhodnius pictipes*) (Dujardin et al. 2002), with only one of these species exhibiting C-band polymorphisms (Gómez-Palacio et al. 2008, 2012).

Several authors have applied fluorescence in situ hybridisation (FISH) using rDNA probes to reveal chromosomal changes in the holocentric chromosomes of Heteroptera (Kuznetsova et al. 2011). Previous studies in Triatominae have demonstrated that the 45S rDNA clusters show remarkable variation in their chromosomal location, particularly in the genus *Triatoma* (Panzera et al. 2012).

The aim of this study was to determine whether the Rhodniini genus displays karyotype homogeneity, which involves the chromosomal position of active genes, such as ribosomal genes. We used FISH to analyse the chro-

Financial support: CSIC-Udelar, PEDECIBA, ANII  
+ Corresponding author: yaninapanzera@gmail.com  
Received 7 November 2012  
Accepted 7 February 2013

mosomal location of 45S rDNA clusters in the robustus and pictipes lineages and performed population analyses of the most important vector species (*R. prolixus*, *R. pallescens* and *R. ecuadoriensis*). The data obtained using this marker correlated with the evolutionary relationships established using molecular analyses.

#### MATERIALS AND METHODS

**Materials** - We studied the chromosomal location of 45S rDNA clusters in 10 *Rhodnius* species representing the two phylogenetic groups of the genus (Abad-Franch et al. 2009, Schofield & Galvão 2009): the robustus lineage (*Rhodnius milesi*, *R. nasutus*, *Rhodnius neglectus*, *Rhodnius neivai*, *R. prolixus* and *Rhodnius robustus*) and pictipes lineage (*R. ecuadoriensis*, *R. pallescens*, *R. pictipes* and *R. stali*). At least two male individuals were analysed for each species and individuals collected from natural populations were used when possible (Table). For the species analysed at the population level, at least three individuals were studied per location (Table). For *R. prolixus*, we studied specimens from additional localities to complement our previous results (Panzer et al. 2012). For *R. ecuadoriensis*, we studied populations from different countries, i.e., Peru and Ecuador. For *R. pallescens*, we included new populations from Colombia and Panama, representing the two evolutionary groups of the species recognised by morphometric, molecular and cytogenetic differences, as reported by Gómez-Palacio et al. (2008, 2012) (Table).

**FISH** - The FISH assays were conducted using squashed gonad preparations that had previously been fixed in 3:1 ethanol:acetic acid, as described by Panzer et al. (2012). A DNA plasmid harbouring an 807-bp region of the 18S rDNA gene of *Triatoma infestans* (accession Y18750) was used as a probe; the probe was labelled using the Nick Translation System (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) with Cy3-dUTP (GE Healthcare, Life Sciences, Oregon, USA). The slides were mounted using Vectashield H-100 (Vector Laboratories, Inc, Burlingame, California, USA) containing 2 µg/mL 4',6-diamidino-2-phenylindole.

**Microscopy and imaging** - The slides were analysed using a Nikon Eclipse 80i epifluorescence microscope. The images were obtained with a Nikon DS-5Mc-U2 digital, cooled camera using Nikon Nis Elements 3.1 Advanced Research software and processed with Adobe Photoshop® software. At least 30 meiotic metaphases (I or II) or diplotene stages were studied for each individual.

#### RESULTS

The mapping results are summarised in Table and are discriminated by species and populations; previous reports on rDNA cluster location in Rhodniini are also included. The 45S rDNA clusters have one or two chromosome *loci* per haploid genome, showing two chromosome location patterns: either on both sex chromosomes (X and Y chromosomes) or only on the X chromosome (Figs 1, 2). In all cases, the hybridisation signals were located in a terminal or subterminal chromosomal position. In all the species (except *R. stali*)

carrying two 45S rDNA *loci*, great differences in the signal intensities were observed and the intensity for the Y chromosome was reduced. Both chromosomal location patterns were observed in each phylogenetic group, as described below.

**Robustus lineage** - In *R. neivai*, *R. neglectus* and *R. milesi*, the rDNA clusters were located on both sex chromosomes (Fig. 1A, B, C, respectively), whereas the rDNA signal was detected on the X chromosome in *R. nasutus* and *R. robustus* (Fig. 1D, E). The *R. prolixus* population analyses did not reveal variability in the individuals from the new localities studied, with all presenting rDNA clusters on the X chromosome (Fig. 1F).

**Pictipes lineage** - In *R. pictipes* and *R. stali*, the rDNA clusters were located on the X and Y sex chromosomes (Fig. 2A, B, respectively). The same pattern was observed for *R. pallescens* among the individuals from the four populations studied, with the rDNA clusters located on the X and Y sex chromosomes, even in specimens with different amounts of C-heterochromatin (Fig. 2C). However, we observed striking intraspecific variability in *R. ecuadoriensis*. The population from Ecuador showed ribosomal genes located on both sex chromosomes (Fig. 2D), whereas the hybridisation signal was detected only on the X chromosome in the Peruvian population (Fig. 2E).

#### DISCUSSION

**Interspecific variability of the 45S rDNA cluster location** - Based on the FISH analyses performed on 13 Rhodniini species to date, eight of which are described for the first time in the present study, one or two 45S rDNA *loci* per haploid genome were observed. Two localisation patterns were revealed: either on both sex chromosomes (X and Y chromosomes) (8 species) or only on the X chromosome (4 species), with one species presenting both patterns (*R. ecuadoriensis*) (Figs 1, 2, Table). The number of rDNA *loci* was consistent with other Triatominae species, with the detection of up to two *loci* (see Panzer et al. 2012 for a review). In the Triatomini tribe, or within the genus *Triatoma*, the ribosomal genes showed four different chromosomal positions, including autosomes bearing 45S rDNA (Panzer et al. 2012). The Rhodniini tribe showed far less variability (rDNA *loci* restricted to the sex chromosomes), which might reflect their monophyletic origin, in contrast to the putative polyphyletic origin of the genus *Triatoma* (Hypsa et al. 2002, Hwang & Weirauch 2012). However, the Rhodniini variation in the ribosomal cluster position occurred despite their karyotype homogeneity, reflecting a genome dynamic that is not revealed by other chromosome traits. Different authors have proposed that changes in C-heterochromatin could affect the position and number of rDNA *loci* in several insect groups (Hirai et al. 1996, Criniti et al. 2005, Roy et al. 2005, Oliveira et al. 2010). Nevertheless, the position of rDNA *loci* in Rhodniini species and other triatomines does not appear to be associated with the presence, absence and/or variations in the amount of autosomal constitutive heterochromatin (i.e., *R. pallescens*) (Table).

TABLE  
Geographical origin and available data on 45S rDNA chromosomal location in Rhodniini species obtained by fluorescent in situ hybridization

Species	45S rDNA chromosomal location	Geographic origin	References
<i>Robustus lineage</i>			
<i>Rhodnius domesticus</i>	X and Y chromosomes, small signal in Y chromosome	Brazil, Santa Catarina (S)	Panzer et al. (2012)
<i>Rhodnius nasutus</i> (Fig. 1D)	X chromosome	Insectary Evandro Chagas Institute (IEC) (Pará, Brazil). Origin: ND	Present paper
<i>Rhodnius neglectus</i> (Fig. 1B)	X and Y chromosomes, small signal in Y chromosome	Brazil, Minas Gerais, Uberaba (S)	Present paper
<i>Rhodnius neivai</i> (Fig. 1A)	X and Y chromosomes, small signal in Y chromosome	Insectary Fiocruz (Rio de Janeiro, Brazil). Origin: Venezuela, Maracay (P)	Present paper
<i>Rhodnius milesi</i> (Fig. 1C)	X and Y chromosomes, small signal in Y chromosome	Insectary IEC (Brazil). Origin: Brazil, Pará, Bragança (S)	Present paper
<i>Rhodnius prolixus</i> (Fig. 1F)	X chromosome	Insectary CDC (Atlanta, USA). Origin: Colombia Colombia, Casanare (S) Guatemala, Las Palmas (D)	Panzer et al. (2012) Panzer et al. (2012) Panzer et al. (2012)
<i>Rhodnius robustus</i> (Fig. 1E)	X chromosome	Colombia, Magdalena, Santa Marta, Kasakúmaka (D) Insectary Fiocruz (Brazil). Origin: Venezuela, Cojedes (S) Insectary Fiocruz (Brazil). Origin: Perú, Loreto (S)	Present paper Present paper Present paper
<i>Psammolestes tertius</i>	X and Y chromosomes, small signal in Y chromosome	Insectary Araraquara (São Paulo, Brazil). Origin: Brazil, Ceará, Espírito Santo (S)	Panzer et al. (2012)
<i>Pictipes lineage</i>			
<i>Rhodnius colombiensis</i>	X chromosome	Colombia, Tolima, Coyaima, Totarco (S)	Panzer et al. (2012)
<i>Rhodnius ecuadoriensis</i> (Fig. 2D, E)	X and Y chromosomes, X chromosome	Insectary Univ. Antioquia (Colombia). Origin: Ecuador, Manabí (S) Peru, La Libertad, Gran Chimú (D) Origin: ND	Present paper Present paper
<i>Rhodnius pallescens</i> (Fig. 2C)	X and Y chromosomes, small signal in Y chromosome	Colombia, Norcasia, Caldas (S) Colombia, Magdalena, Santa Marta, San Sebastián de Buena Vista (S) Colombia, Magdalena, Santa Marta, Mendihuaca (S) Colombia, Sucre, Galeras (S) Panama, Chilibre (S) Insectary IEC (Brazil). Origin: Brazil, Pará, Bacarena (S) Insectary Fiocruz (Brazil). Origin: Bolivia, La Paz, Alto Beni (P)	Morielle-Souza and Azeredo-Oliveira (2007) Panzer et al. (2012) Present paper Present paper Present paper Present paper Present paper
<i>Rhodnius pictipes</i> (Fig. 2A)	X and Y chromosomes, small signal in Y chromosome		
<i>Rhodnius stali</i> (Fig. 2B)	X and Y chromosomes		

all of them have the same diploid chromosome number: 2n = 22 chromosomes (20 autosomes plus XY in males, XX in females). D: domiciliary; ND: not determined; P: peridomestic; S: sylvatic.

*Intraspecific variation of rDNA chromosomal location* - Population studies were performed on the three *Rhodnius* species which serve as the main vectors of Chagas disease (Table). No intraspecific variation was revealed in the *R. prolixus* and *R. pallelescens* populations. The uniformity of the ribosomal gene location in *R. prolixus*, including the sylvatic and domestic populations, was consistent with the molecular studies indicating low variability in this species (Monteiro et al. 2003). In *R. pallelescens*, the two evolutionary groups with morphometric and genetic divergence (Gómez-Palacio et al. 2008, 2012) also presented the same rDNA chromosome location. However, for *R. ecuadoriensis*, we detected striking differences in the rDNA location between the individuals from Peru and Ecuador (Fig. 2E, F). Molecular comparisons with mitochondrial sequences (cyto-

chrome b) also showed markedly divergent haplotypes in the populations from these countries, suggesting that these populations represent discrete groups or incipient species (Abad-Franch et al. 2003, Abad-Franch & Monteiro 2005). Considering that both populations show different affinities for domestic and sylvatic habitats (Grijalva et al. 2012), their identification as distinct genetic groups has important epidemiological consequences for vector control programmes (Abad-Franch et al. 2001). Further FISH studies with other Peruvian and Ecuadorean populations from different habitats and experimental crosses among them are crucial to determine whether the observed genetic variations reflect intraspecific polymorphisms or involve different species.

Intraspecific variation of rDNA cluster location is fairly common in plants (Pedrosa et al. 2006), is rare in such vertebrates as amphibians (Andronico et al. 1985) and fish (Castro et al. 2001), but is unusual in insects, with only one case reported in species with holocentric chromosomes (Panzeria et al. 2012). In Orthoptera and Coleoptera (Cabrero et al. 2003a, b, Cabral-de-Mello et al. 2011b, respectively), intraspecific variation involves a polymorphism in the number of chromosomes that harbour ribosomal clusters. With regard to holocentric chromosomes, the variation recently described in *T. infestans* populations involves the complete transfer of the rDNA locus from an autosomal position to the X chromosome (Panzeria et al. 2012). The polymorphism in *R. ecuadoriensis* described here is similar to that observed in Orthoptera and Coleoptera because it also represents a variation in the number of chromosomes carrying ribosomal genes (Fig. 2D, E). The intraspecific polymorphisms in the ribosomal cluster position in these two Triatominae species suggests that this character varies at a faster rate than that observed in other insects groups, particularly those with holocentric chromosomes.

*Taxonomic and evolutionary features* - According to the FISH results obtained for the 46 triatomine species studied to date, the ribosomal gene chromosomal location is a species-specific characteristic (Panzeria et al. 2012, this paper). Both cases of intraspecific variation detected in triatomines reflect recent divergence processes, which could lead to incipient speciation (*R. ecuadoriensis*) or a

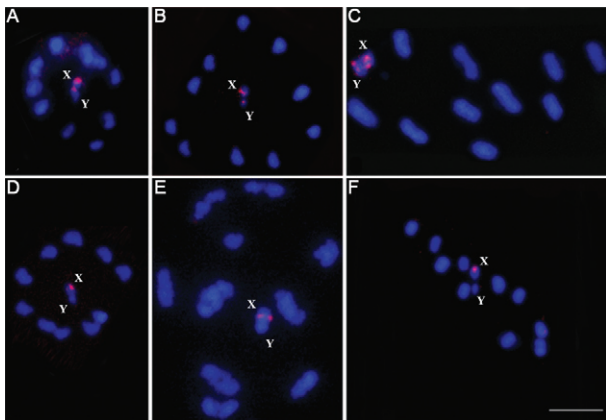


Fig. 1: tribe Rhodniini: robustus lineage. Interspecific variability in the chromosome location of the 45S rDNA by fluorescent in situ hybridization in male meiotic cells. All species have the same diploid chromosome number:  $2n = 22$  chromosomes (20 autosomes plus XY in males). The rDNA signals are located either on both sex chromosomes (A-C) or just on one sex chromosome (X chromosome) (D-F). A: *Rhodnius neivai*, metaphase II; B: *Rhodnius neglectus*, metaphase II; C: *Rhodnius milesi*, metaphase I; D: *Rhodnius nasutus*, metaphase II; E: *Rhodnius robustus*, diplotene; F: *Rhodnius prolixus*, metaphase II. Bar = 10  $\mu\text{m}$ .

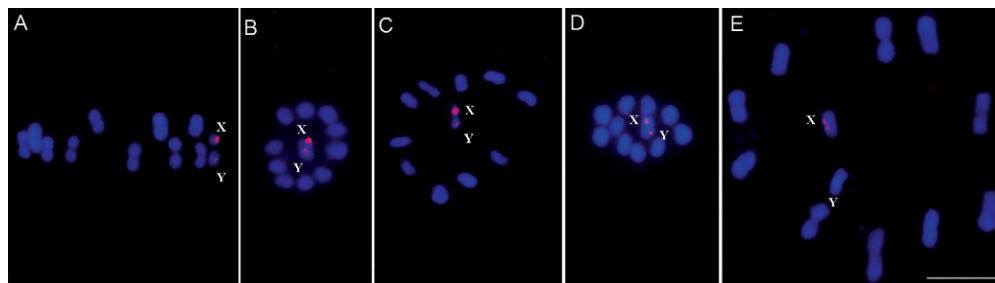


Fig. 2: tribe Rhodniini: pictipes lineage. Interspecific and intraspecific variability in the chromosome location of the 45S rDNA by fluorescent in situ hybridization in male meiotic cells. All species have the same diploid chromosome number:  $2n = 22$  chromosomes (20 autosomes plus XY in males). The rDNA signals are located on both sex chromosomes (A-D) and only in one sex chromosome (X chromosome) (E). A: *Rhodnius pictipes*, metaphase II; B: *Rhodnius stali*, metaphase II; C: *Rhodnius pallelescens*, metaphase II; D: *Rhodnius ecuadoriensis* from Ecuador, metaphase II; E: *Rhodnius ecuadoriensis* from Peru, metaphase I. Bar = 10  $\mu\text{m}$ .

marked population differentiation (*T. infestans*). In addition, closely related species, such as *R. colombiensis* and *R. pallescens* (Abad-Franch & Monteiro 2005), can be differentiated using this marker (Table), suggesting that the 45S chromosomal localisation of the ribosomal clusters could be an appropriate marker for the recognition and detection of recently diverged species or populations. FISH analyses of *R. robustus* (Monteiro et al. 2003) and/or *Triatoma sordida* (Noireau et al. 1999) cryptic species could help to test this hypothesis.

The determination of the chromosomal location of rDNA clusters is important to understanding karyotypic evolution in different insect taxa (Hirai et al. 1996, Roy et al. 2005, Cabrero & Camacho 2008, Oliveira et al. 2010), including lepidopteran species, which, similar to Heteroptera, also possess holocentric chromosomes (Nguyen et al. 2010). In several closely related species of Triatominae, such as the protracta and dispar complexes within the genus *Triatoma*, or in all *Panstrongylus* species, the chromosomal location of rDNA clusters is an evolutionarily conserved cytogenetic trait and closely related species display the same chromosomal positions (Panzeria et al. 2012). However, this character is not evolutionarily conserved in the Rhodniini tribe, as each of the two genetic lineages shows both patterns of chromosomal location (Table).

Considering the monophyletic origin of the Rhodniini tribe, we can hypothesise which of the two ribosomal genes locations is the ancestral form. Given the number of *Rhodnius* species with ribosomal *loci* on both sex chromosomes (8/13 species), we suggest that this pattern represents the primitive form; thus, species with rDNA clusters only on the X chromosome could reflect a loss of the Y chromosome ribosomal *locus*. In support of this idea, *Rhodnius domesticus* and *R. neivai*, which are considered to be ancient isolated species, present the X-Y pattern (Abad-Franch & Monteiro 2007). Additional evidence for the X-Y pattern as the ancestral location is provided by the variation observed in the present study for the *R. ecuadoriensis* populations from Peru. These populations exhibit rDNA clusters only on the X chromosome (Fig. 2F) and are believed to have derived from ancestral populations in central Ecuador (Abad-Franch et al. 2001, 2009, Grijalva et al. 2005), which show ribosomal genes on both sex chromosomes (Fig. 2E). An ancestral configuration of rDNA *loci* on both sex chromosomes has also been suggested in other insects, such as melanogaster group, whereby some species have also subsequently lost the ribosomal genes located on the Y chromosome (Roy et al. 2005).

Nevertheless, the alternative hypothesis, i.e., an ancestral location of the ribosomal genes on the X chromosome, should not be excluded, considering that a significant excess of gene movement from the X chromosome has been demonstrated in most species with the XY sex system (see Pease & Hahn 2012 for a review). This hypothesis would imply either a partial transfer of ribosomal genes from the X to the Y chromosome, as mediated through the transposition of mobile elements (Schubert & Wobus 1985) or chromosomal rearrangements promoted through ectopic recombination (homologous recombina-

tion between repetitive sequences of non-homologous chromosomes) (Hanson et al. 1996). In almost all of the Rhodniini species described in this paper (Figs 1, 2), the Y chromosome ribosomal signal was less intense than that observed for the X chromosome, indicating that the ribosomal cluster copy number is significantly lower on the Y chromosome. This low copy number supports the mechanism proposed by Dubcovsky and Dvorak (1995), which implies the dispersion of a single rDNA copy and the successive amplification of the copy number, suggesting an ancestral location of ribosomal genes on the X chromosome. In many organisms, rDNA clusters behave as mobile genetic elements due to the presence of transposable elements adjacent to the ribosomal genes (Schubert & Wobus 1985, Zhang et al. 2008). Several transposable elements have been described in Triatominae (Gilbert et al. 2010), including a non-long terminal repeat retrotransposon inserted inside the 28S rDNA sequence of *R. prolixus* (Jakubczak et al. 1991). Thus, we can envisage an rDNA cluster with associated transposable elements moving through genomes, as previously postulated for other insects (Cabrero & Camacho 2008, Nguyen et al. 2010, Cabral-de-Mello et al. 2011a). Such species as *T. infestans* and *R. ecuadoriensis*, which are polymorphic for the location of rDNA, would be excellent models for the identification of transposable elements and the analysis of their dispersal mechanisms.

Ectopic recombination and rDNA transposition indicate a heterologous association between sex chromosomes. As a rule, heteropteran sex chromosomes are considered asynaptic and achiasmatic during meiotic division and do not form synaptonemal complexes (Solari 1979, Ueshima 1979, Pigozzi & Solari 2003). In all triatomine species, sex chromosomes are intimately associated from early meiotic prophase until diakinesis, forming a positive heteropycnotic body (Panzeria et al. 2010). This close spatial proximity between sex chromosomes is an essential prerequisite for ectopic recombination and rDNA transposition. Thus, the existence of ribosomal *loci* on two sex chromosomes in 13 triatomine species from four different genera (*Rhodnius*, *Psammolestes*, *Eratyrus* and *Triatoma*) (Panzeria et al. 2012, this paper) suggests that chromosomal exchanges between achiasmatic sex chromosomes are more common than previously suspected, at least in this insect group.

Moreover, regardless of which ribosomal gene location is ancestral, the inter and intraspecific rDNA variation in Rhodniini indicates that rDNA transposition is independent of taxonomic units. Furthermore, the variation suggests that the three proposed mechanisms of rDNA change, i.e., the loss of rDNA *loci* on the Y chromosome, rDNA transposition and ectopic pairing between both sex chromosomes, could have occurred several times during the karyotypic evolution of the Rhodniini tribe.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

To Christopher J Schofield (LSHTM, London, UK), for valuable comments on the paper, and Aldo Valente (IEC, Pará, Brazil) and Franklin Vargas (Univ. Nacional de Trujillo, Peru), for supplying triatomine material.

## REFERENCES

- Abad-Franch F, Monteiro FA 2005. Molecular research and the control of Chagas disease vectors. *An Acad Bras Cienc* 77: 437-454.
- Abad-Franch F, Monteiro FA 2007. Biogeography and evolution of Amazonian triatomines (Hemiptera: Reduviidae): implications for Chagas disease surveillance in humid forest ecoregions. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102 (Suppl. 1): 57-70.
- Abad-Franch F, Monteiro FA, Jaramillo NO, Gurgel-Gonçalves R, Dias FBS, Diotaiuti L 2009. Ecology, evolution and the long-term surveillance of vector-borne Chagas disease: a multi-scale appraisal of the tribe Rhodniini (Triatominae). *Acta Trop* 112: 159-177.
- Abad-Franch F, Monteiro FA, Patterson JS, Miles MA 2003. Phylogenetic relationships among members of the Pacific *Rhodnius* lineage (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Infect Genet Evol* 2: 244-245.
- Abad-Franch F, Paucar CA, Carpio CC, Cuba Cuba CA, Aguilar VHM, Miles MA 2001. Biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) in Ecuador: implications for the design of control strategies. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 611-620.
- Aguilar HM, Abad-Franch F, Dias JCP, Junqueira ACV, Coura JR 2007. Chagas disease in the Amazon Region. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102 (Suppl. 1): 47-55.
- Andronico F, De Lucchini S, Graziani F, Nardi I, Batistoni R, Barsacchi-Pilone G 1985. Molecular organization of ribosomal RNA genes clustered at variable chromosomal sites in *Triturus vulgaris meridionalis* (Amphibia, Urodela). *J Mol Biol* 186: 219-229.
- Cabral-de-Mello DC, Moura RC, Martins C 2011a. Cytogenetic mapping of rRNAs and histone H3 genes in 14 species of *Dichotomus* (Coleoptera, Scarabaeidae, Scarabaeinae) beetles. *Cytogenet Genome Res* 134: 127-135.
- Cabral-de-Mello DC, Oliveira SG, Moura RC, Martins C 2011b. Chromosomal organization of the 18S and 5S rRNAs and histone H3 genes in Scarabaeinae coleopterans: insights into the evolutionary dynamics of multigene families and heterochromatin. *BMC Genet* 12: 88.
- Cabrero J, Bugrov A, Warchalowska-Sliwa E, López-León MD, Perfectti F, Camacho JP 2003a. Comparative FISH analysis in five species of Eyprepocnemidine grasshoppers. *Heredity (Edinb)* 90: 377-381.
- Cabrero J, Camacho JPM 2008. Location and expression of ribosomal RNA genes in grasshoppers: abundance of silent and cryptic loci. *Chromosome Res* 16: 595-607.
- Cabrero J, Perfectti F, Gómez R, Camacho JPM, López-León MD 2003b. Population variation in the A chromosome distribution of satellite DNA and ribosomal DNA in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Chromosome Res* 11: 375-381.
- Calzada JE, Pineda V, Garisto JD, Samudio F, Santamaría AM, Saldaña A 2010. Human trypanosomiasis in the eastern region of the Panama province: new endemic areas for Chagas disease. *Am J Trop Med Hyg* 82: 580-582.
- Castro J, Rodríguez S, Pardo BG, Sánchez L, Martínez P 2001. Population analysis of an unusual NOR-site polymorphism in brown trout (*Salmo trutta* L.). *Heredity (Edinb)* 86: 291-302.
- Criniti A, Simonazzi G, Cassanelli S, Ferrari M, Bizzaro D, Manicardi GC 2005. X-linked heterochromatin distribution in the holocentric chromosomes of the green apple aphid *Aphis pomi*. *Genetica* 124: 93-98.
- Cuba Cuba CA, Abad-Franch F, Rodríguez JR, Vásquez FV, Velásquez LP, Miles MA 2002. The triatomines of northern Peru, with emphasis on the ecology and infection by trypanosomes of *Rhodnius ecuadoriensis* (Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 175-183.
- Dubcovsky J, Dvorak J 1995. Ribosomal RNA multigene loci: nomads of the *Triticeae* genomes. *Genetics* 140: 1367-1377.
- Dujardin JP, Schofield CJ, Panzera F 2002. *Los vectores de la enfermedad de Chagas*, Académie Royale des Sciences D'Outre-Mer, Bruxelles, 189 pp.
- Galvão C, Carcavallo R, Rocha DS, Jurberg J 2003. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa* 202: 1-36.
- Gilbert C, Schaack S, Pace II JK, Brindley PJ, Feschotte C 2010. A role for host-parasite interactions in the horizontal transfer of transposons across phyla. *Nature* 464: 1347-1350.
- Gómez-Palacio A, Jaramillo-Ocampo N, Caro-Riaño H, Diaz S, Monteiro FA, Pérez R, Panzera F, Triana O 2012. Morphometric and molecular evidence of intraspecific biogeographical differentiation of *Rhodnius pallescens* (Hemiptera: Reduviidae: Rhodniini) from Colombia and Panama. *Infect Genet Evol* 12: 1975-1983.
- Gómez-Palacio A, Jaramillo-Ocampo N, Triana-Chávez O, Saldaña A, Calzada J, Pérez R, Panzera F 2008. Chromosome variability in the Chagas disease vector *Rhodnius pallescens* (Hemiptera, Reduviidae, Rhodniini). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 160-164.
- Grijalva MJ, Palomeque-Rodríguez FS, Costales JA, Davila S, Arcos-Teran L 2005. High household infestation rates by synanthropic vectors of Chagas disease in southern Ecuador. *J Med Entomol* 42: 68-74.
- Grijalva MJ, Suarez-Davalos V, Villacis AG, Ocaña-Mayorga S, Dangles O 2012. Ecological factors related to the widespread distribution of sylvatic *Rhodnius ecuadoriensis* populations in southern Ecuador. *Parasit Vectors* 5: 17.
- Hanson RE, Islam Faridi MN, Percival EA, Crane CF, Ji Y, McKnight TD, Stelly DM, Price HJ 1996. Distribution of 5S and 18S-28S rDNA loci in a tetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L) and its putative diploid ancestors. *Chromosoma* 105: 55-61.
- Hashimoto K, Schofield CJ 2012. Elimination of *Rhodnius prolixus* in Central America. *Parasit Vectors* 5: 45.
- Hirai H, Yamamoto MT, Taylor RW, Imai HT 1996. Genomic dispersion of 28S rDNA during karyotypic evolution in the ant genus *Myrmecia* (Formicidae). *Chromosoma* 105: 190-196.
- Hughes-Schrader S, Schrader F 1961. The kinetochore of the Hemiptera. *Chromosoma* 12: 327-350.
- Hwang WS, Weirauch C 2012. Evolutionary history of assassin bugs (Insecta: Hemiptera: Reduviidae): insights from divergence dating and ancestral state reconstruction. *PLoS ONE* 7: e45523.
- Hypsa V, Tietz D, Zrzavý J, Rego RO, Galvão C, Jurberg J 2002. Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the Asiatic clade. *Mol Phylogenet Evol* 23: 447-457.
- Jakubczak JL, Burke WD, Eickbush TH 1991. Retrotransposable elements RI and R2 interrupt the rRNA genes of most insects. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 3295-3299.
- Kuznetsova VG, Grozeva SM, Nokkala S, Nokkala C 2011. Cytogenetics of the true bug infraorder Cimicomorpha (Hemiptera, Heteroptera): a review. *Zookeys* 154: 31-70.
- Matias A, De la Riva J, Martínez E, Torrez M, Dujardin JP 2003. Domiciliation process of *Rhodnius stali* (Hemiptera: Reduviidae) in Alto Beni, La Paz, Bolivia. *Trop Med Int Health* 8: 264-268.
- Monteiro FA, Barrett TV, Fitzpatrick S, Córdón-Rosales C, Feliciani MD, Beard CB 2003. Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. *Mol Ecol* 12: 997-1006.

- Monteiro FA, Lazoski C, Noireau F, Solé-Cava AM 2002. Allozyme relationships among ten species of Rhodniini showing parafly of *Rhodnius* including *Psammolestes*. *Med Vet Entomol* 16: 83-90.
- Monteiro FA, Wesson DM, Dotson EM, Schofield CJ, Beard CB 2000. Phylogeny and molecular taxonomy of the Rhodniini derived from mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Am J Trop Med Hyg* 62: 460-465.
- Morielle-Souza A, Azeredo-Oliveira MTV 2007. Differential characterization of holocentric chromosomes in triatomines (Heteroptera, Triatominae) using different staining techniques and fluorescent in situ hybridization. *Genet Mol Res* 6: 713-720.
- Nguyen P, Sahara K, Yoshido A, Marec F 2010. Evolutionary dynamics of rDNA clusters on chromosomes of moths and butterflies (Lepidoptera). *Genetica* 138: 343-354.
- Noireau F, Zegarra M, Ordoñez J, Gutierrez T, Dujardin JP 1999. Genetic structure of *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) domestic populations from Bolivia: application on control interventions. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 347-351.
- Oliveira SG, Moura RC, Silva AEB, Souza MJ 2010. Cytogenetic analysis of two *Coprophanaeus* species (Scarabaeidae) revealing wide constitutive heterochromatin variability and the largest number of 45S rDNA sites among Coleoptera. *Micron* 41: 960-965.
- Panzer F, Ferrandis I, Ramsey J, Salazar-Schettino PM, Cabrera M, Monroy C, Bargues MD, Mas-Coma S, O'Connor JE, Angulo V, Jaramillo N, Pérez R 2007. Genome size determination in Chagas disease transmitting bugs (Hemiptera-Triatominae) by flow cytometry. *Am J Trop Med Hyg* 76: 516-521.
- Panzer F, Pérez R, Panzer Y, Ferrandis I, Ferreiro MJ, Calleros L 2010. Cytogenetics and genome evolution in the subfamily Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). *Cytogenet Genome Res* 128: 77-87.
- Panzer Y, Pita S, Ferreiro MJ, Ferrandis I, Lages C, Pérez R, Silva AE, Guerra M, Panzer F 2012. High dynamics of rDNA cluster location in kissing bug holocentric chromosomes (Triatominae, Heteroptera). *Cytogenet Genome Res* 138: 56-67.
- Pease JB, Hahn MW 2012. Sex chromosomes evolved from independent ancestral linkage groups in winged insects. *Mol Biol Evol* 29: 1645-1653.
- Pedrosa HA, de Almeida CC, Mosiolek M, Blair MW, Schweizer D, Guerra M 2006. Extensive ribosomal DNA amplification during Andean common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) evolution. *Theor Appl Genet* 112: 924-933.
- Pigozzi MI, Solari AJ 2003. Differential immunolocalization of a putative Rec8p in meiotic autosomes and sex chromosomes of triatomine bugs. *Chromosoma* 112: 38-47.
- Rosa JA, Rocha CS, Gardim S, Pinto MC, Mendonça VJ, Ferreira Filho JCR, Costa de Carvalho EO, Camargo LMA, Oliveira J, Nascimento JD, Cilense M, Almeida CE 2012. Description of *Rhodnius montenegrensis* n. sp. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the state of Rondônia, Brazil. *Zootaxa* 3478: 62-76.
- Roy V, Monti-Dedieu L, Chaminade N, Siljak-Yakovlev S, Aulard S, Lemeunier F, Montchamp-Moreau C 2005. Evolution of the chromosomal location of rDNA genes in two *Drosophila* species subgroups: ananassae and melanogaster. *Heredity (Edinb)* 94: 388-395.
- Schofield CJ, Galvão C 2009. Classification, evolution and species groups within the Triatominae. *Acta Trop* 110: 88-100.
- Schubert I, Wobus U 1985. In situ hybridization confirms jumping nucleolus organizing regions in *Allium*. *Chromosoma* 92: 143-148.
- Solari AJ 1979. Autosomal synaptonemal complexes and sex chromosomes without axes in *Triatoma infestans* (Reduviidae, Hemiptera). *Chromosoma* 72: 225-240.
- Ueshima N 1979. Hemiptera II: Heteroptera. In *Animal cytogenetics. Insecta*, Vol. 3, Part 6, 2nd ed., Gebrüder Borntraeger, Berlin-Stuttgart, 117 pp.
- Zhang X, Eickbush MT, Eickbush TH 2008. Role of recombination in the long-term retention of transposable elements in rRNA gene loci. *Genetics* 180: 1617-1626.