

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA

VEDADO EMPRÉSTIMO

CITOTAXONOMIA DE *Simulium (Psaroniocompsa) daltanhani* Hamada &
Adler, 1998 (DIPTERA: SIMULIIDAE) EM UM IGARAPÉ DA REGIÃO
AMAZÔNICA, BRASIL

ELENY DA SILVA PEREIRA

BIBLIOTECA DO INPA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biologia Tropical e Recursos
Naturais (PPG-BTRN) do convênio INPA/
UFAM, para obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas, área de concentração em
Entomologia

Manaus
2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA

BIBLIOTECA DO INPA

CITOTAXONOMIA DE *Simulium (Psaroniocompsa) daltanhani* Hamada &
Adler, 1998 (DIPTERA: SIMULIIDAE) EM UM IGARAPÉ DA REGIÃO
AMAZÔNICA, BRASIL.

ELENY DA SILVA PEREIRA

Dra. NEUSA HAMADA (Orientadora)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biologia Tropical e Recursos
Naturais (PPG-BTRN) do convênio INPA/
UFAM, para obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas, área de concentração em
Entomologia.

T
595.777
P436c

Manaus
2004

FICHA CATALOGRÁFICA

Pereira, Eleny da Silva

Citotaxonomia de *Simulium (Psaroniocompsa) daltanhani* Hamada & Adler, 1998 (Diptera: Simuliidae) em um igarapé da região Amazônica, Brasil / Eleny da Silva Pereira. -- Manaus, 2004.

xiii+ 49 f

Dissertação (mestrado)--INPA/ UFAM, 2004.

1. Simuliidae 2. Diptera 3. Citotaxonomia 4. Amazônia 5. *Simulium daltanhani*

CDD 19. ed. 595.77

SINOPSE

Cromossomos politênicos extraído de glândulas salivares de larvas de *Simulium daltanhani* Hamada & Adler coletados em um igarapé na Amazônia Central foram estudados. Os resultados indicam a presença de duas configurações cromossômicas ligadas ao sexo feminino e a ausência de polimorfismo na população estudada. Comparando o mapa cromossômico de *S. daltanhani* com o mapa de outras espécies do grupo *S. quadrifidum*, sugerimos que essa espécie não pertence a esse grupo de espécies uma vez que compartilham poucas seqüências no padrão de bandamento dos cromossomos politênicos.

Palavras-chave: Simuliidae 2. Diptera 3. Citotaxonomia 4. Amazônia 5. *Simulium daltanhani*

Key-words: Simuliidae 2. Diptera 3. Citotaxonomy 4. Amazônia 5. *Simulium daltanhani*

**A meus pais, José Maria e Maria
Senhorinha; meus irmãos, César,
Edgar e Eder e a minha avó Ana.**

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Pela conquista deste trabalho, quero agradecer:

- ❖ À minha orientadora, Dra. Neusa Hamada, por sua orientação firme, serena e principalmente pela confiança em mim depositada para a realização deste trabalho.
- ❖ Ao INPA-Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e à UFAM-Universidade Federal do Amazonas pelo apoio para a realização do curso e à CAPES- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de estudo.
- ❖ Aos referees e membros da banca na aula de qualificação, Dra. Antônia Franco, Dra. Cecília L Coscarón Arias, Dra. Eliana Feldberg, Dra. Rosaly Ale-Rocha, Dr. Sérgio Luiz Bessa Luz e Dra. Shirlei Maria Recco-Pimentel que contribuíram na melhoria do trabalho.
- ❖ Ao Cigs-Centro de Instrução de Guerra na Selva no nome do Capitão Amaral pela permissão ao acesso as áreas em que foram feitas as coletas de campo.
- ❖ Ao Sr. Roberto Stieger pelo apoio durante as excursões.
- ❖ Aos colegas Aldenira Fernandes, Jeferson Oliveira, Mirian Aguilar e Artêmio Silva, pela companhia e ajuda durante as coletas no campo.
- ❖ À Luanda Figueiredo e Francimeire Gomes, por facilitar os contatos com o Cigs para excursões.
- ❖ Ao Paulo e ao Rodrigo pelas dicas para revelação dos negativos.
- ❖ À Dra. Eliana Feldberg e Dr. Sérgio Luz, nos nomes de Aldaléia Santos e Cláudia Rios que pacientemente me acolheram para que eu pudesse fazer algumas fotos em seus equipamentos.
- ❖ Ao Márcio Contrin, pelo trabalho final das pranchas dos mapas.

- ❖ Aos meus colegas de turma, especialmente a Ana Paula, Aldenira Fernandes, Sheyla Couceiro, Teiamar Bobot e Francimeire Gomes, pelo companheirismo durante a realização das disciplinas.
- ❖ Aos meus colegas de laboratório, Aline Mattos, Ana Pés, Arlindo Filho, Beatriz Telles, Carlos Azevedo, Deyse Cristina, Domingos Leonardo, Jefferson Silva, Marcelo Creão, Miriam Aguilar, Patrícia Reis, Priscilla Tregue, Ranyse Querino, Rose Bastos, Ruth Ferreira, Sanny Bentes, Sheyla Couceiro, Teiamar Bobot e Yamile Alencar, pelas boas horas de convivência.
- ❖ Aos meus colegas Amanda Lima, Aldaléia Santos, Célia Perón, Daniel Lúcio, Lílian Figueiredo e Thieme Martiniano pelos momentos de descontração e anti-stress.
- ❖ Agradeço em especial aos meus pais Jose Maria e Maria Senhorinha pelos incentivos e ajuda imprescindíveis em todos os momentos.

SUMÁRIO

FICHA CATALOGRÁFICA	iii
SINOPSE.....	iii
DEDICATÓRIA.....	iv
AGRADECIMENTOS ESPECIAIS	v
SUMÁRIO.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABELA	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Aspectos gerais.....	1
1.2 Importância.....	3
1.3 Classificação.....	4
1.3.1 <i>Citotaxonomia</i>	5
1.4 Justificativa.....	9
2. OBJETIVOS	10
2.1 Geral.....	10
2.2 Específicos.....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 Área de estudo.....	10
3.2 Espécie estudada e espécies utilizadas na comparação citológica.....	11
3.2.1 <i>Espécie estudada</i>	11
3.2.2 <i>Espécies utilizadas na comparação citológica</i>	15

Programa Integrado de Pós-Graduação em Biologia
Tropical e Recursos Naturais - PIPG BTRN



CITOTAXONOMIA DE *Simulium (Psaroniocompsa) daltanhanii* Hamada & Adler, 1998 (DIPTERA: SIMULIIDAE) EM UM IGARAPÉ DA REGIÃO AMAZÔNICA, BRASIL

Eleny da Silva Pereira

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo de vida de <i>S.daltanhani</i>	2
Figura 2	Área de estudo-Base de Instrução de Guerra na Selva II, Manaus, Amazonas, Brasil.....	12
Figura 3	Esquema da localização do igarapé no km 8, na Base de Instrução de Guerra na Selva II, onde <i>Simulium daltanhani</i> foi coletado.....	13
Figura 4	Igarapé do km 8 dividida em dois ambientes.....	14
Figura 5	Gânglio subesofageano pigmentado de <i>S.daltanhani</i>	15
Figura 6	Larva de último estágio de <i>S. daltanhani</i> com o histoblasto totalmente formado.....	17
Figura 7	Formatos dos botões imaginais de macho e fêmea e células dos botões imaginais determinando o sexo das larvas.....	20
Figura 8	Substratos onde foram coletadas as larvas na área semi-aberta.....	24
Figura 9	Núcleo com cromossomos compactados e degradados.....	25
Figura 10	Idiograma de <i>S. daltanhani</i>	27
Figura 11	Cromossomos politênicos de glândulas salivares de larvas de <i>Simulium daltanhani</i> (Diptera: Simuliidae). Cromossomo I, braço curto (S).....	31

Figura 12	Cromossomos politênicos de glândulas salivares de larvas de <i>Simulium daltanhani</i> (Diptera: Simuliidae). Cromossomo I, braço longo (L).....	32
Figura 13	Cromossomos politênicos de glândulas salivares de larvas de <i>Simulium daltanhani</i> (Diptera: Simuliidae). Cromossomo II, braço curto (S).....	33
Figura 14	Cromossomos politênicos de glândulas salivares de larvas de <i>Simulium daltanhani</i> (Diptera: Simuliidae). Cromossomo II, braço longo (L).....	34
Figura 15	Cromossomos politênicos de glândulas salivares de larvas de <i>Simulium daltanhani</i> (Diptera: Simuliidae). Cromossomo III, braço curto (S).....	35
Figura 16	Cromossomos politênicos de glândulas salivares de larvas de <i>Simulium daltanhani</i> (Diptera: Simuliidae). Cromossomo III, braço longo (L).....	36
Figura 17	Idiograma dos cromossomos politênicos de <i>Simulium quadrifidum</i> , <i>Simulium cauchense</i> , <i>Simulium goeldii</i> , <i>Simulium ulyssesi</i> e <i>Simulium daltanhani</i> (Diptera: Simuliidae).....	37

ÍNDICE DE TABELA

Tabela 1	Número total de larvas de <i>S. daltanhani</i> (Diptera: Simuliidae) analisadas completamente e incompletamente ao nível citológico, e o número total de larvas com cromossomos degradados.....	26
----------	---	----

RESUMO

Semelhanças morfológicas entre espécies da família Simuliidae são comuns, o que torna difícil a identificação específica em alguns grupos de espécies; estudos sobre cromossomos politênicos de glândulas salivares têm contribuído para o esclarecimento da taxonomia de algumas espécies. *Simulium daltanhani* Hamada & Adler, 1998, espécie alvo deste estudo, pertence ao subgênero *Psaroniocompsa*, que apresenta várias espécies isomórficas. Foi colocada, junto com outras cinco espécies, no grupo *S. quadrifidum*. O objetivo geral do presente trabalho foi caracterizar citogeneticamente *S. daltanhani* por meio do padrão de bandamento de cromossomos politênicos para possibilitar comparações cromossômicas entre espécies do grupo *S. quadrifidum* e, futuramente, com outras espécies desse subgênero. Larvas foram coletadas em um igarapé, na área de preservação do Exército Brasileiro, localizada na rodovia AM 010, Km 54, noroeste da cidade de Manaus, Amazonas, Brasil. Larvas de último estágio foram coradas pelo método de Feulgen para a coloração dos cromossomos politênicos das glândulas salivares e dos botões imaginais das gônadas, para a identificação do sexo. Em *S. daltanhani*, o centrômero do cromossomo I é representado por uma banda escura, enquanto que nos cromossomos II e III a região centromérica é reconhecida por ser uma região expandida. A região organizadora do nucléolo (RON) está presente no braço curto do cromossomo I, próximo ao centrômero. Uma inversão heterozigota no braço longo do cromossomo II foi observada apenas em fêmeas dessa espécie, indicando ser esse o sexo heterogamético, no entanto 1,3% do total de larvas analisadas foram observadas sem essa inversão, apresentando a mesma seqüência padrão encontrada nos machos, mostrando assim a existência de duas configurações cromossômicas ligadas ao sexo feminino. Quando comparada às outras espécies do grupo *S. quadrifidum*, conhecidas cromossomicamente, *S. daltanhani* não apresentou muitas semelhanças no padrão de bandamento. A RON das espécies desse grupo não se encontra na mesma região, com exceção de *S. goeldii* e *S. ulyssesi*, como observado no grupo de espécies *S. perflavum*. Análises cromossômicas de espécies de outros grupos pertencentes ao subgênero *Psaroniocompsa* serão necessárias para se estabelecer a posição de *S. daltanhani* dentro do subgênero *Psaroniocompsa*.

ABSTRACT

Morphological similarities between species in the family Simuliidae are common, making it difficult to identify some groups to the species level; studies on polytene chromosomes of the salivary glands have contributed to the clarification of the taxonomy of some species. *Simulium daltanhani* Hamada & Adler, 1998, the species studied, belongs to the subgenus *Psaroniocompsa*, which includes several isomorphic species. It was placed with five other species in the *S. quadrifidum* species group. The objective of the current study was to characterize cytogenetically *S. daltanhani* using the banding pattern of polytene chromosomes to allow chromosomal comparisons between species in the *S. quadrifidum* species group and, in the future, with other species in the *Psaroniocompsa* subgenus. Larvae were collected in a stream, in a reservation area of the Brazilian Army located on Highway AM010, Km 54, northwest of Manaus city, Amazonas state, Brazil. Last-instar larvae were stained by the Feulgen method to stain the polytene chromosomes of the salivary glands and the gonad buds, in order to identify the gender. In *S. daltanhani*, the centromere of chromosome I is represented by a dark band, while in chromosome II and III the centromeric region is recognized as an expanded region. The nucleolar organizer region (NOR) is located on the short arm of chromosome I, near the centromere. A heterozygous inversion in the long arm of chromosome II was observed only in females, indicating that in this species, female is the heterogametic gender. Besides this, 1.3% of the female larvae analyzed did not have this inversion, indicating the existence of two sexual systems linked to the female gender. When compared to other species in the *S. quadrifidum* species group with polytene chromosomes described, *S. daltanhani* did not show many similarities in the banding pattern. The NORs of members of this species group species are not in the same region, except in *S. goeldii* and *S. ulyssesi*, as observed in the *S. perflavum* species group. It will be necessary to conduct chromosomal analysis of species in the other species groups belonging to the subgenus *Psaroniocompsa* in order to know the position of *S. daltanhani*.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais

A família Simuliidae pertence à ordem Diptera, possui ampla distribuição mundial e, de acordo com as regiões onde ocorrem, recebe diferentes denominações. No Brasil, suas espécies são conhecidas popularmente como piuns ou borrachudos.

A forma do corpo é totalmente diversa em todos os estágios do seu desenvolvimento, pois são insetos holometábolos, com quatro estágios de vida: ovo, larva, pupa e adulto (Fig. 1). A duração do ciclo de vida varia de acordo com as espécies e com fatores ambientais como temperatura e umidade. O estágio adulto apresenta dimorfismo sexual; além de diferenças na genitália, os sexos podem ser diferenciados pelo formato dos olhos. Os machos possuem olhos holópticos, cujas margens internas se tocam na região dorsal e os omatídeos superiores são diferenciados dos inferiores. As fêmeas possuem olhos dicópticos, separados e os omatídeos não são diferenciados. Os estágios imaturos habitam quase todos os ambientes de água corrente e límpida (Rey, 1973; Adler, 1994), os adultos têm habitat terrestre. Os criadouros dos estágios imaturos podem ser classificados como fixos, temporários e alguns são esporádicos (Briceño- Iragorry, 1943) e ocupam, principalmente, cachoeiras ou corredeiras e saídas de barragens, mas podem ocorrer em cursos d'água com pouca velocidade. O habitat de cada espécie é selecionado pela fêmea, de acordo com as condições físico-químicas dos criadouros (Hamada & McCreadie, 1999; Hamada & Adler, 2001).

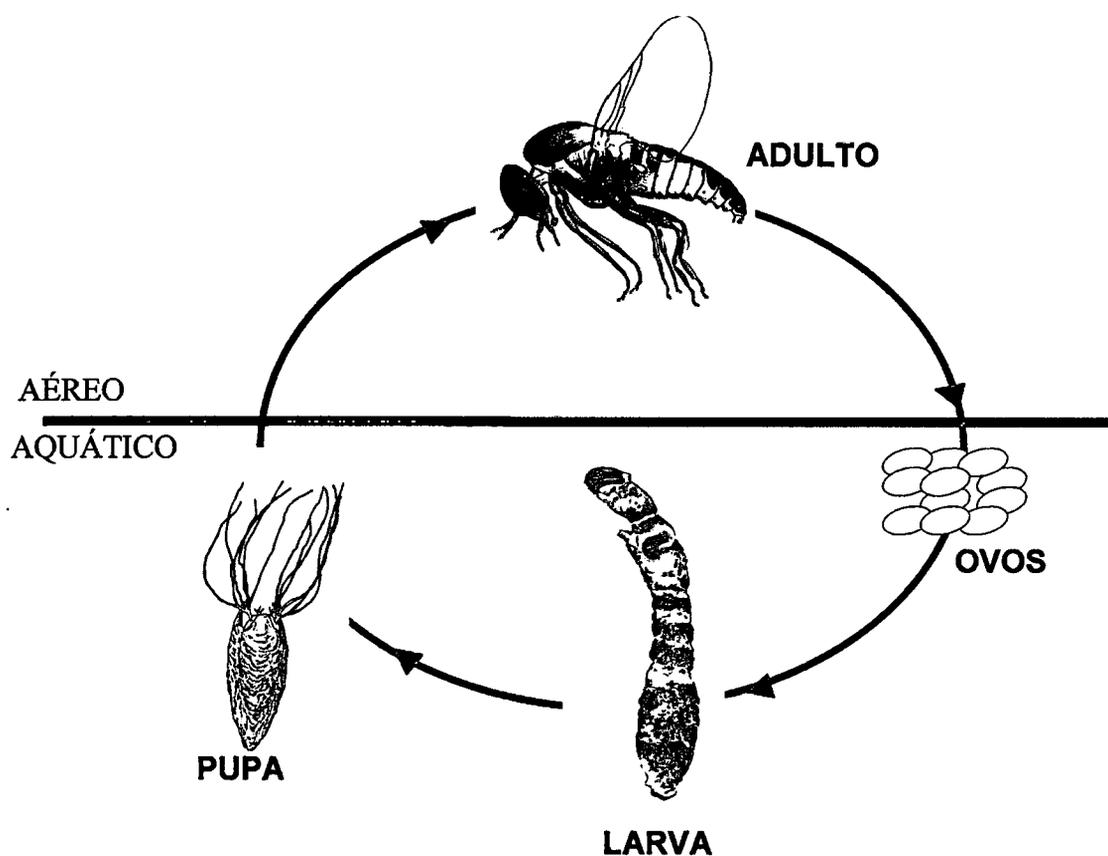


Figura 1– Ciclo de vida de *Simulium daltanhani* com os quatro estágios de desenvolvimento.

Desenho: Hamada, N.

As larvas são principalmente filtradoras não seletivas, alimentando-se de matéria orgânica compreendendo organismos planctônicos, perifíticos e até microinvertebrados (Alencar *et al.*, 2001). Os machos adultos alimentam-se de néctar de flores ou seiva de plantas (Ruas Neto *et al.*, 1984; Neves, 1991), enquanto que as fêmeas adultas, no geral são hematófagas, necessitando de sangue para o amadurecimento dos ovos.

Quanto à atividade hematofágica, os simulídeos são principalmente diurnos. Algumas espécies, de acordo com as condições ambientais, podem ser bimodais, como *Simulium guianense* Wise, que nos dias ensolarados apresenta um pico de atividade pela

manhã e outro pela tarde, sendo que a atividade aumenta quando a temperatura diminui (Py-Daniel *et al.*, 1999).

1.2 Importância

As formas imaturas dos simulídeos são abundantes na comunidade de insetos aquáticos sendo importantes na dieta alimentar de outros organismos. Contribuem para o fluxo de matéria orgânica na rede alimentar de outras formas jovens de insetos e também na dieta de peixes (Burton & McRae, 1972; Ruas Neto *et al.*, 1984; Adler, 1994; Alencar *et al.*, 1999; Andrade *et al.*, 2000). Muitas espécies são consideradas indicadores de qualidade de água, pois não se desenvolvem em ambientes poluídos (Adler, 1994).

Os adultos de algumas espécies são de grande interesse econômico, quando em alta densidade pois podem causar vários danos em áreas agrícolas reduzindo a qualidade do trabalho, prejudicando a produtividade de seres humanos e de animais (Souza, 1984; Adler & Mason, 1997). Na indústria turística, o grande fluxo desses insetos impede o acesso a áreas que poderiam ser exploradas economicamente (Araújo-Coutinho *et al.*, 1988). No entanto, a maior relevância desses insetos está relacionada à saúde, pois sendo as fêmeas hematófagas, são vetores e hospedeiros em potencial de vírus, bactérias, protozoárias e helmintos (Crosskey, 1990; Hamada, 1993; Adler, 1994). Na área veterinária, a importância dos simulídeos de maneira direta, está relacionada à transmissão de protozoários e filárias, que podem causar mortalidade em grandes populações de aves, prejudicando a produção. De maneira indireta, grande fluxo de simulídeos importunam animais durante a alimentação provocando “stress”, reduzindo a produção de alimentos de importância comercial (Campos-Gaona & Andrade, 1999).

Na área médica, algumas espécies são vetores de filárias como *Mansonella ozzardi* Manson, 1897, causadora da Mansonelose, e *Onchocerca volvulus* Leuckart, 1983, nematóide parasita de humanos, causador da Oncocercose, doença popularmente conhecida como cegueira dos rios (Marcondes, 2001). A fase adulta desses agentes etiológicos formam nódulos fibrosos pelo corpo causando lesões dermatológicas crônicas (Ramirez Pérez, 1985) além de causarem lesões oculares. A oncocercose é originária do Continente Africano, e foi registrada pela primeira vez no Brasil em 1967 (Sá & Maia- Herzog, 2002). Com isso, é importante que se conheça a distribuição de espécies vetores para se prever focos da oncocercose.

Existem 12 espécies do gênero *Simulium* na região Neotropical, que são consideradas vetores da oncocercose (Pérez, 1985). A maioria da população afetada na Guatemala, México, Venezuela, Colômbia e Brasil são indígenas. No foco amazônico do Brasil e Venezuela as principais espécies vetores dessa doença são: *Simulium oyapockense* s.l. Floch & Abonnenc, *Simulium roraimense* Nunes de Melo, *Simulium guianense* Wise, *Simulium exiguum* Roubaud, *Simulium incrustatum* Lutz, *Simulium metallicum* s.l. Bellardi e *Simulium rorotaense*, Floch e Abonnenc (Ramirez Pérez, 1985; Grillet *et al.*, 1994; Shelley *et al.*, 1997; Vivas- Martinez *et al.*, 1998; Medeiros & Py-Daniel, 1999; Shelley, 2002).

1.3 Classificação

Rubtsov (1974) relata que estudos taxonômicos sobre a família Simuliidae são divididos em duas linhas de pensamento distintas, uma seguida por autores norte-americanos e a outra, por autores russo-alemães. A linha norte-americana subdivide a família Simuliidae em duas sub-famílias: Parasimuliinae e Simuliinae e a russa-alemã, em quatro sub-famílias:

Parasimuliinae, Gymnopaediinae, Prosimuliinae e Simuliinae. No presente trabalho estamos seguindo a linha dos autores norte-americanos.

No Brasil ocorre apenas a sub-família Simuliinae, com as tribos Prosimuliini e Simuliini. A primeira tribo é representada no nosso país pelo gênero *Lutzsimulium* d'Andretta & d'Andretta e a segunda pelo gênero *Simulium* Latreille Crosskey & Howard, 1997.

Na região Neotropical, existem algumas controvérsias em relação à classificação de Simuliidae no nível genérico e subgenérico (e.g. Coscarón, 1987; Py-Daniel & Sampaio, 1994; Crosskey & Howard, 1997). Coscarón (1987) dividiu o gênero *Simulium* em 17 subgêneros, enquanto Crosskey & Howard (1997) dividiram-no em doze subgêneros. O subgênero *Psaroniocompsa* considerado por Crosskey & Howard (1997) é subdividido em cinco grupos de espécies: *S. amazonicum*, *S. siolii*, *S. incrustatum*, *S. quadrifidum* e *S. auristriatum*. Py-Daniel & Sampaio (1994) propuseram a elevação de todos os subgêneros da região Neotropical para gênero. Neste estudo iremos utilizar a classificação de Crosskey & Howard (1997) por ser uma classificação mais conservadora e utilizada mundialmente.

Aproximadamente 1 700 espécies de Simuliidae já foram descritas e nomeadas. Para a região Neotropical foram registradas aproximadamente 350 espécies de simulídeos (Campos-Gaona & Andrade, 1999) das quais 87 foram descritas para o Brasil e 45 registradas para a Amazônia (Crosskey & Howard, 1997).

1.3.1 Citotaxonomia

Bennett (1963) estudou a morfologia das glândulas salivares utilizando-a como uma ferramenta para auxiliar na identificação de simulídeos. Semelhanças morfológicas dos indivíduos são comuns entre algumas espécies de simulídeos, tornando difícil a identificação específica, quando apenas caracteres morfológicos convencionais são utilizados. Com isso,

houve a necessidade de se combinar a taxonomia convencional com outras técnicas taxonômicas. As abordagens não convencionais para taxonomia de simuliídeos incluem a citologia (e.g. Charalambous *et al.*, 1996; Hamada & Adler, 1999; Rios Velásquez *et al.*, 2002), a cromatografia de gás líquido (Crosskey, 1987) e as técnicas convencionalmente conhecidas como sistemática molecular (e.g. Post & Flook, 1992; Charalambous *et al.*, 1993; Wilson & Post, 1994; Tang *et al.*, 1995; Flook & Post, 1997; Higazi *et al.*, 2000).

A integração da taxonomia convencional com estudos citogenéticos tem sido de grande importância e tem contribuído muito para o esclarecimento da taxonomia de muitos grupos de espécies de Diptera, tais como Drosophilidae, Chironomidae e Culicidae (Rothfels, 1979; Coscarón-Arias, 1998). Atualmente, estudos similares estão sendo feitos para resolver problemas em Simuliidae, principalmente quando se trata de espécies crípticas (Shelley, 1988). Muitos taxons de simuliídeos constituem complexos de espécies, as quais se assemelham na morfologia, porém são geneticamente distintas e estão isoladas reprodutivamente (Mayr, 1942). Estas podem ser diferenciadas por meio de técnicas de citogenética a partir de estudos de diferentes características expressadas nos cromossomos politênicos das glândulas salivares.

Os cromossomos politênicos são também conhecidos como cromossomos gigantes, e foram descobertos em 1881 por Balbiani em glândulas salivares de chironomídeos (Guerra, 1988; Hoyos, 1990). Cada cromonema se apresenta como um longo fio de DNA e proteínas histônicas e não histônicas, intercaladas em espaços mais ou menos regulares por pontos de enovelamento que vão constituir os cromômeros. No início da politenização os cromossomos homólogos são reconhecidos pareando-se num processo chamado sinapse, sem separação das cromátides replicadas. Sofrem sucessivas endomitoses ou politenia que é o processo no qual os cromossomos se duplicam, sem que haja divisão celular. A espessura do

cromossomo politênico depende basicamente do número de endomitoses. Quando estão perfeitamente pareados, o local onde ocorre o cromômero aparece no cromossomo politênico como uma zona mais densa, denominada faixa. A largura da faixa depende do tamanho dos cromômeros que a formam ou ainda, se dois ou mais cromômeros estão tão próximos que impossibilita a distinção da interfaixa formando uma única banda. Em algumas condições, os cromômeros de uma determinada faixa podem se descondensar dando origem a uma estrutura denominada pufe, regiões de síntese de RNA. Os pufes são muito variados podendo ter dois extremos: um discreto alargamento da banda ou desaparecimento total da banda, restando apenas uma estrutura dilatada e de baixa densidade, formando pufes excepcionalmente grandes (Guerra, 1988). Esses pufes assumem formas diferenciadas e conservadas servindo assim como marcadores para distinguir os diferentes braços cromossômicos.

Os cromossomos politênicos são encontrados em certos órgãos de insetos. Em larvas de Diptera são encontrados em quase todos os órgãos, principalmente aqueles que compõem tecidos de secreção como os túbulos de Malpighi, reto, intestino e mais freqüentemente em glândulas salivares onde são mais desenvolvidos. São diversos em tamanho e em estrutura (Guerra, 1988).

De acordo com Hartl *et al.* (1988), os cromossomos politênicos são considerados atípicos e são formados nas células terminais, isto é, as células das larvas que contêm os cromossomos não se dividem novamente durante o desenvolvimento do mosquito e posteriormente desaparecem durante a formação da pupa. Procunier & Post (1986) encontraram cromossomos politênicos em túbulos de Malpighi de fêmeas adultas, entretanto, estes não foram úteis para estudos citológicos por não apresentarem boa qualidade de bandamento.

Com as diferenças e semelhanças presentes no padrão de bandamento dos cromossomos politênicos é possível que se faça o reconhecimento de complexos de espécies crípticas em morfoespécies aparentemente uniformes. Existem critérios citológicos para distinguir estas espécies, tais como inversões fixas e diferentes inversões polimórficas ou presença de bandas bem marcadas (heterobandas) (Bedo, 1979). Entretanto, esses critérios só são úteis na identificação de espécies que se encontram em simpatria onde a ausência de híbridos sugere isolamento reprodutivo (Coscarón- Arias, 1998).

A recente combinação do uso da morfotaxonomia e citotaxonomia tem contribuído muito para a taxonomia de muitos grupos de espécies de Simuliidae (Shelley, 1988). Estudos de cromossomos politênicos têm sido realizados em vários complexos de espécies, tais como: *Simulium damnosum* Theobald s.l. na África, *Simulium exiguum* Roubaud no Equador, *Simulium ochraceum* Walker no México e Guatemala e *Simulium metallicum* Bellardi na América Central e Venezuela (e.g. Grillet *et al.*, 1995; Mafuyai *et al.*, 1996; Conn *et al.*, 1997; Arteaga & Hoyos, 1999; Kruger & Garms, 1999), distinguindo espécies crípticas com habitats e capacidade vetorial diferentes (Higazi *et al.*, 2000). Análise citogenética associada a análises moleculares tem fornecido importantes informações, tais como demonstrado nos trabalhos de Tang *et al.* (1995, 1996), que conseguiram distinguir nove espécies crípticas do complexo *S. damnosum* s.l., estudando uma subregião do DNA mitocondrial (16s), sendo seis delas consideradas vetores em potencial da onconcerose.

Atualmente, menos de 10% do total de espécies descritas foram estudadas cromossomicamente (Crosskey, 1987). Na região Neotropical existem poucos estudos sobre cromossomos de simulídeos; no Brasil, estudos citotaxonômicos foram realizados por Charalambous *et al.* (1996) com *S. guianense*, Hamada & Adler (1999) estudaram *Simulium maroniense* Floch & Abonnenc, *Simulium trombetense* Hamada, *Simulium perflavum*

Roubaud, *Simulium rorotaense* Floch & Abonnenc, Luz (1999) estudou *Simulium oyapokense* Floch & Abonnenc e *Simulium roraimense* Nunes de Mello, Rios-Velásquez *et al.* (2002) estudaram *S. goeldii* e *S. ulyssesi*, Alvan-Aguilar (2002) estudou *S. quadrifidum* e *S. cauchense* e Campos-Gaona *et al.* (1996, 2001) estudaram *Simulium pertinax* Kollar.

1.4 Justificativa

A importância econômica e epidemiológica de espécies da família Simuliidae tem estimulado estudos em muitas áreas como a taxonomia, ecologia, manejo e citogenética (Crosskey, 1990). Muitas estruturas morfológicas são usadas na descrição de espécies de simuliídeos, sendo que em alguns casos não é possível a separação de espécies usando somente caracteres morfológicos. Técnicas citogenéticas, associadas a estudos ecológicos e moleculares, são usadas para determinar a distribuição de cada citótipo.

O subgênero *Psaroniocompsa* foi dividido por Crosskey & Howard (1997) em cinco grupos: *S. amazonicum*, *S. quadrifidum*, *S. auristriatum*, *S. siolii* e *S. incrustatum*. O grupo *S. amazonicum* e *S. quadrifidum* foram considerados por Py-Daniel (1983) e Coscarón (1987) como subgêneros *Cerqueirellum* e *Coscaroniellum* respectivamente. Py-Daniel & Sampaio (1994) posteriormente consideraram esses dois subgêneros como gêneros.

Simulium daltanhani foi descrita por Hamada & Adler (1998) e colocada no subgênero *Psaroniocompsa*. Py-Daniel & Coscarón (2001), ao descrever *S. ulyssesi*, colocou essa espécie no gênero *Coscaroniellum* (= grupo *S. quadrifidum*). Considerando que algumas espécies do grupo *S. quadrifidum* já foram estudadas citotaxonomicamente (Rios Velásquez *et al.*, 2002; Alvan-Aguilar, 2002), este trabalho pretende realizar um estudo citotaxonomico sobre a espécie *S. daltanhani*, fornecendo subsídios para melhor compreensão da taxonomia do subgênero *Psaroniocompsa sensu* Crosskey & Howard (1997).

2.OBJETIVOS

2.1 Geral

Caracterizar citogeneticamente *S. daltanhani* por meio do padrão de bandamento de cromossomos politênicos e estabelecer relações com as outras espécies do grupo *S. quadrifidum*.

2.2 Específicos

- Construir um mapa cromossômico para *S. daltanhani* por meio de microfotografias dos cromossomos politênicos;
- Verificar as semelhanças existentes na seqüência de bandamento dos cromossomos politênicos de *S. daltanhani* com as espécies *S. quadrifidum*, *S. cauchense*, *S. goeldii* e *S. ulyssesi*;
- Determinar se há polimorfismo na população de *S. daltanhani* estudada;
- Determinar se há cromossomos sexuais diferenciados na espécie *S. daltanhani*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de estudo

Os exemplares analisados foram coletados em uma área de preservação do Exército Brasileiro "Base de Instrução II (02°45'S e 59°57'W), a nordeste da cidade de Manaus, na rodovia AM 010, Km 54, no Km 08 deste ramal", Amazonas, Brasil (Figs. 2 e 3).

A área do igarapé, no qual foram feitas as coletas, possui aproximadamente 200 metros sendo ela dividida, de acordo com a cobertura vegetal, em dois ambientes distintos: área aberta e semi aberta (Fig. 4).

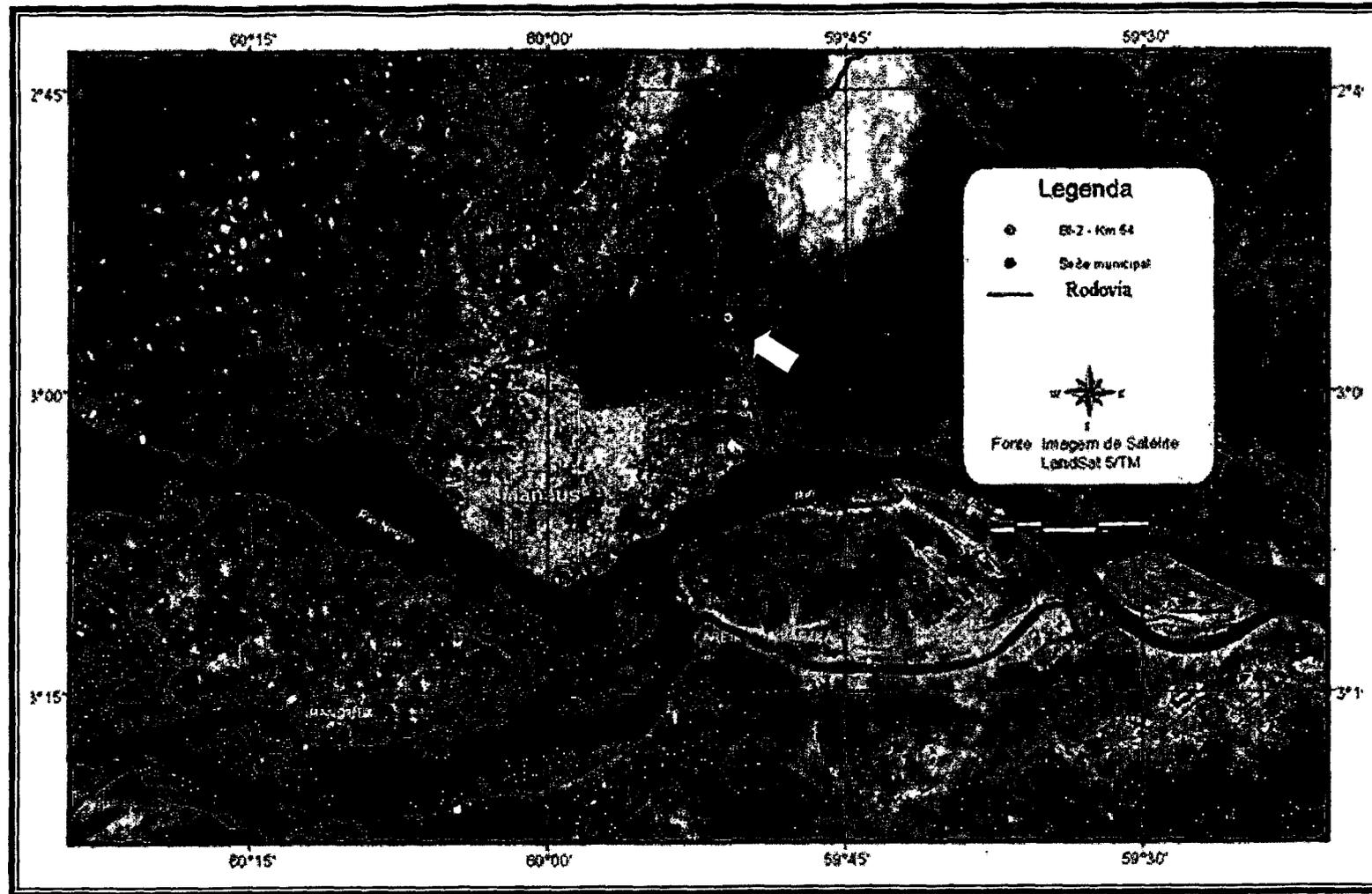


Figura 2- Seta mostrando área de estudo- Base de Instrução de Guerra na Selva II, Manaus, Amazonas, Brasil. Fonte: Ferreira (2003).

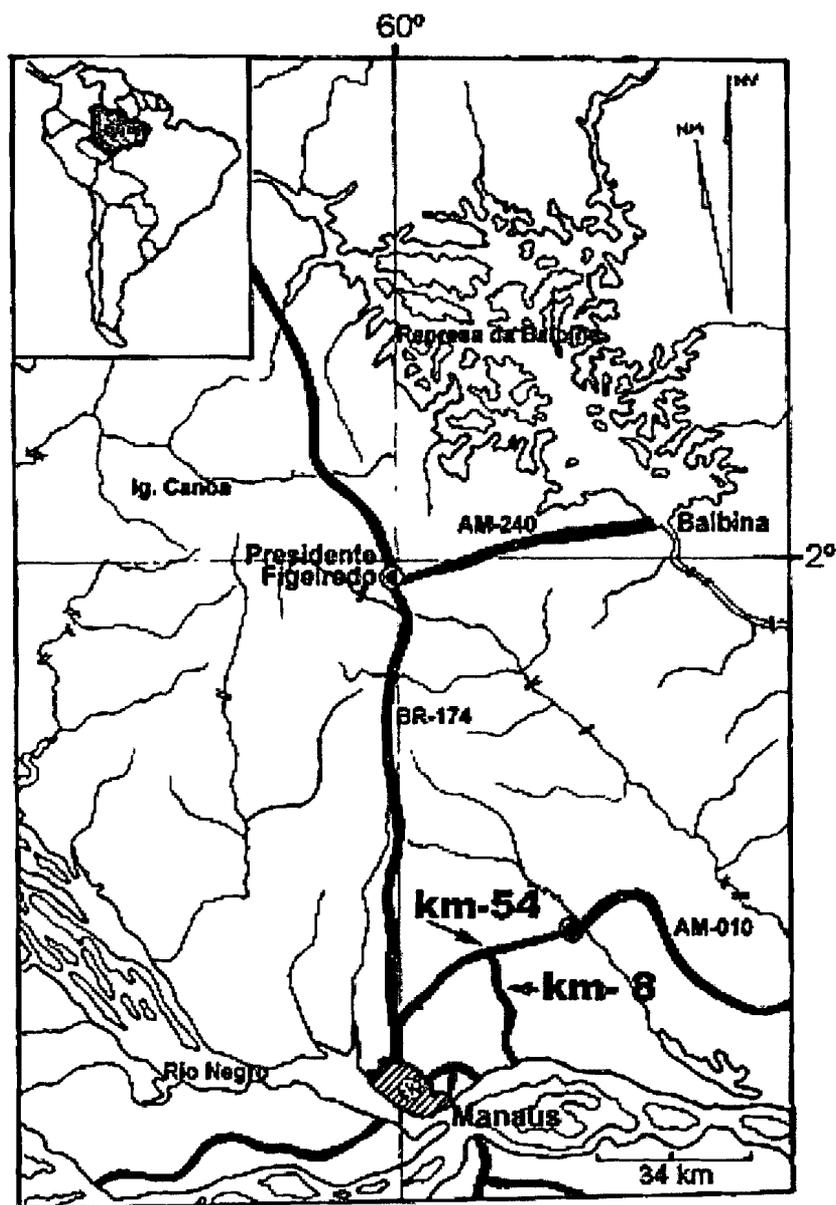


Figura 3- Esquema da localização do igarapé no km 8, na Base de Instrução de Guerra na Selva II, local de coleta de *Simulium daltanhani*. Fonte: Alencar (2003).

a)



b)



Figura 4- Igarapé do km 8, Base de Instrução de Guerra na Selva II. a) área aberta; b) área semi-aberta.



Figura 5- Gânglio subesofageano pigmentado de *S.daltanhani*.

3.2.2 Espécies utilizadas na comparação citológica

Simulium goeldii Cerqueira & Nunes de Melo, 1967 e *Simulium ulyssesi* (Py-Daniel & Coscarón, 2001)

S. goeldii foi descrita a partir de espécimes coletados no rio Tarumã, Manaus, Amazonas (Cerqueira & Nunes de Melo, 1967) e apresenta ampla distribuição na Amazônia (Crosskey & Howard, 1997). *S. ulyssesi*, por sua vez, só foi registrada em pequenos igarapés da Amazônia Central (Hamada & Adler, 2001, Rios-Velasquez *et al.*, 2002). Coscarón (1987) colocou *S. goeldii* no subgênero *Coscaroniellum* enquanto que Crosskey & Howard (1997), consideraram que a mesma não poderia ser colocada em nenhum subgênero existente. Estudos citogenéticos foram feitos sobre essas duas espécies por Rios-Velásquez *et al.* (2002), que apresentaram o mapa padrão para o grupo composto por essas duas espécies e, denominado grupo *S. goeldii*. Essas espécies podem ser diferenciadas por quatro inversões fixas e apresentam o organizador nucleolar na mesma posição, no braço curto do cromossomo I, próximo à região centromérica.

Simulium quadrifidum Lutz, 1917 e *Simulium cauchense* Floch & Abonnenc, 1946

S. quadrifidum possui ampla distribuição geográfica na região neotropical abrangendo o Brasil (Rondônia, Amapá, Amazonas, Pará e Roraima), Bolívia, Colômbia, Equador, Guiana e Suriname (Crosskey & Howard, 1997; Alvan-Aguilar, 2002). *S. cauchense* apresenta uma distribuição mais restrita abrangendo o Brasil (Amapá, Amazonas e Roraima), Guiana Francesa, Guiana e Venezuela (Crosskey & Howard, 1997; Alvan-Aguilar, 2002). Py-Daniel (1983) colocou estas duas espécies no subgênero *Coscaroniellum* sem apresentar os critérios para esta decisão, enquanto que Shelley (1988) as inclui no grupo *S. quadrifidum*, do subgênero *Psaroniocompsa*. Alvan-Aguilar (2002) estudou citogeneticamente estas duas espécies. Nenhum polimorfismo foi encontrado nas duas espécies, e elas se diferenciam por três inversões; o organizador nucleolar está localizado no cromossomo III, braço longo, próximo a área centromérica em *S. quadrifidum* e no cromossomo I, braço curto em *S. cauchense*.

3.3 Coleta e fixação dos exemplares

As larvas foram coletadas do substrato em diferentes áreas do igarapé com auxílio de pinças de ponta fina. Estas foram colocadas em frascos de vidro com fixador Carnoy (3 partes de álcool etílico absoluto e 1 parte de ácido acético glacial) e transportadas em caixa de isopor com gelo até ao laboratório. O Carnoy foi substituído três vezes no campo e uma no laboratório antes do seu armazenamento à 4°C no refrigerador.

3.4 Obtenção dos cromossomos politênicos

No laboratório, as larvas foram triadas sob microscópio estereoscópio e identificadas até espécie, utilizando-se a chave de identificação de Hamada & Adler (2001).

As larvas de último estágio, que se caracterizam pelo completo desenvolvimento do histoblasto branquial (Fig. 6), foram separadas e coradas para análise dos cromossomos das glândulas salivares.

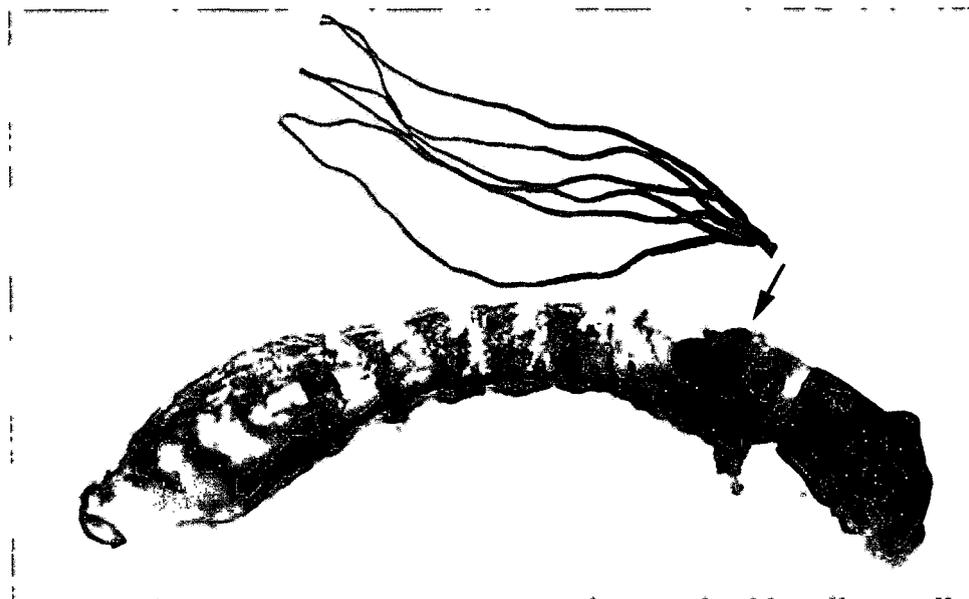


Figura 6– Larva de último estágio com o histoblasto totalmente formado.

Três técnicas têm sido utilizadas para o estudo de cromossomos politênicos de Simuliidae: método de Feulgen (Rothfels & Dunbar, 1953), método de Feulgen com modificações de Charalambous *et al.* (1996) e o método de orceína ou carmim (Bedo, 1975). A duas primeiras, além de análise dos cromossomos, permitem a identificação do sexo da larva, pois coram os botões imaginais das gônadas, enquanto que a terceira fornece alta resolução de bandas, porém não permite a identificação do sexo, tornando o processo mais lento (Rothfels, 1979).

Considerando que em simulídeos nem sempre existem cromossomos sexuais diferenciados, neste trabalho foram utilizadas as técnicas de Feulgen e Feulgen modificada por Charalambous.

3.4.1 Técnicas de Coloração

Técnica de Feulgen (Rothfels & Dunbar, 1953)

- Fazer um corte longitudinal (ventral) no abdome da larva já fixada;
- Colocar a larva em água destilada durante 20 minutos e posteriormente remover a secreção glandular em papel de filtro úmido;
- Deixar a larva por 10 minutos em ácido clorídrico 1N à 65°C (pré -aquecido por 30 minutos a 65°C), na estufa;
- Corar as larvas em corante Feulgen por 60 minutos;
- Colocar as larvas em água sulfurada por 12 minutos;
- Lavar as larvas em água destilada, por um minuto, duas vezes;
- Refrigerar as larvas coradas em água destilada até a montagem da lâmina para análise em microscópio óptico com objetiva de imersão.

Técnica de Charalambous (Charalambous *et al.* 1996)

- Fazer um corte longitudinal (ventral) no abdome da larva já fixada;
- Colocar a larva em água destilada durante 30 minutos e posteriormente remover a secreção glandular em papel de filtro úmido;
- Deixar a larva por 30 minutos em ácido clorídrico 5N.
- Lavar as larvas em água destilada durante um minuto;
- Corar as larvas em corante Feulgen por 30 minutos;
- Colocar as larvas em água sulfurada por 10 minutos;
- Lavar as larvas em água destilada, por um minuto, duas vezes;
- Refrigerar as larvas coradas em água destilada até a montagem das lâminas para análise em microscópio óptico em objetiva de imersão.

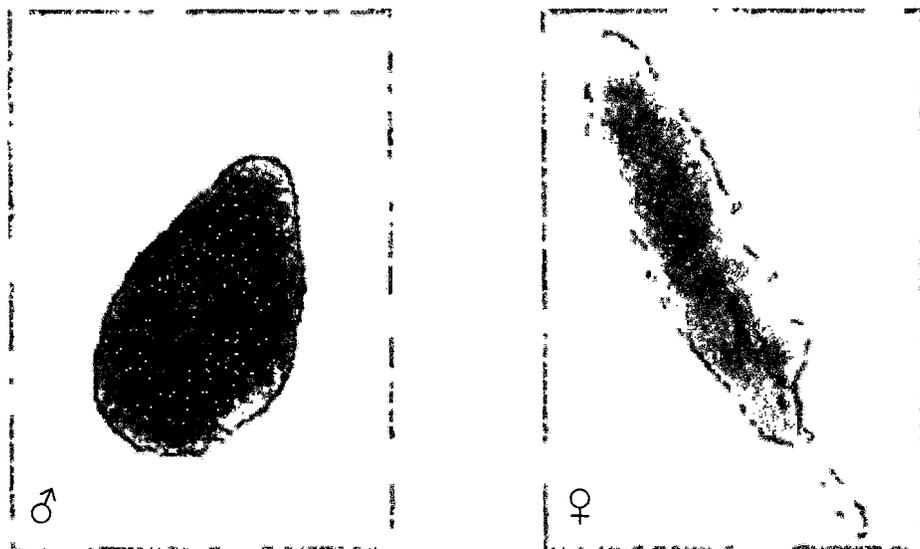
Para a visualização dos cromossomos foram feitas preparações temporárias de lâminas. O sexo da larva foi determinado *in situ*, pelo formato dos botões imaginais: os machos possuem gônadas com formato esférico enquanto que as fêmeas possuem gônadas com formato ovóide (Fig. 7a). Posteriormente, para confirmação do sexo, foram feitas observações citológicas dos botões imaginais. Os botões imaginais dos machos apresentam células diferenciadas enquanto que as fêmeas apresentam células semelhantes (Fig. 7b).

3.4.2 Preparação das lâminas

As glândulas salivares contendo os cromossomos politênicos corados foram retiradas da região abdominal das larvas e transferidas para uma lâmina com uma gota de ácido acético glacial a 50%, posteriormente a gota foi coberta cuidadosamente com uma lamínula e examinadas ao microscópio óptico com aumento de 1000 vezes em objetiva de imersão. Para cada indivíduo, foi preparada uma lâmina.

As carcassas foram guardadas em microtúbulos de plásticos com álcool 80%. Alguns espécimes foram depositados na coleção de invertebrados do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, Amazonas, Brasil.

a)



b)

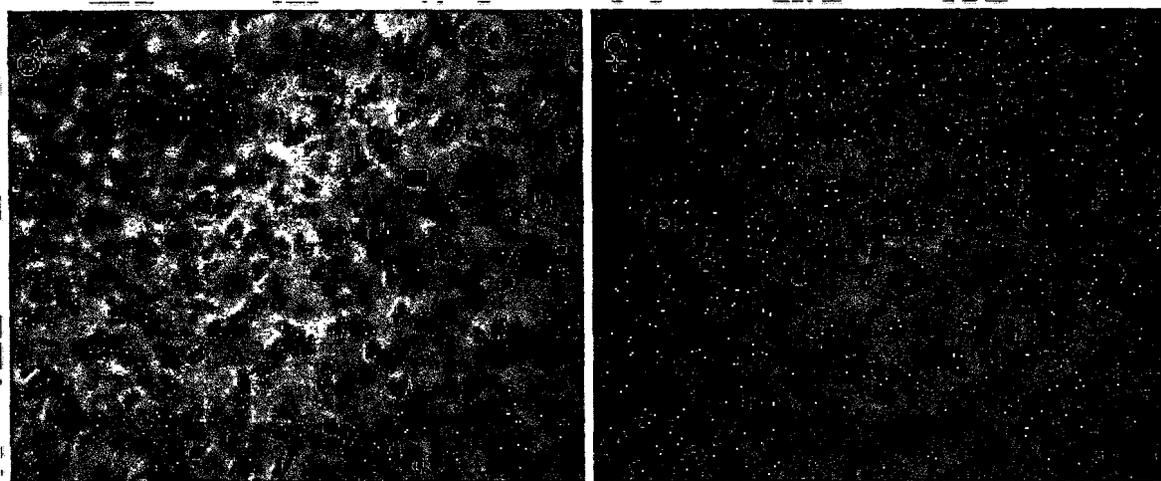


Figura 7- Determinação do sexo: a) formato dos botões imarginais de macho e fêmea; b) células dos botões imarginais de macho e fêmea. Nota: foto em (a) aumento de 50X em microscópio estereoscópio; em (b) aumento de 400X em microscópio óptico.

3.4.3 Construção do mapa cromossômico

Os núcleos foram fotografados em microscópio óptico com aumento de 1000 vezes em óleo de imersão, usando filmes preto e branco AGFA, ASA 25 e 100 e Imagelink ASA 25. Os negativos foram revelados no laboratório de Insetos Aquáticos na Coordenação de Pesquisa em Entomologia utilizando revelador KODAK D-76. Após revelados, os negativos foram “scaniados” e as melhores fotos, que continham pedaços nítidos de seqüências facilmente identificáveis, foram separadas, recortadas e montadas para construção do mapa cromossômico utilizando o programa Adobe Photoshop Elements versão 9.0 seguindo a nomenclatura de Rothfels *et al.*, 1977.

3.4.4 Nomenclatura dos cromossomos politênicos

Os Simuliidae possuem, no geral, três pares de cromossomos homólogos, pareados. Estes são numerados com números romanos, de acordo com o seu comprimento, sendo o cromossomo I maior que o II e este maior que o III. Possuem centrômeros localizados na região mediana ou submediana, as regiões centroméricas em muitas espécies são caracterizadas por regiões expandidas. Em espécies que não apresentam essa região expandida, a localização é determinada pela presença de pareamento ectópico ou por comparação com espécies próximas que possuem o centrômero expandido. Para numerar as regiões de bandas, os cromossomos são divididos em 100 seções, começando no braço curto do cromossomo I (IS) e terminando no braço longo do cromossomo III (IIIL). Por convenção, o cromossomo I é dividido em 41 seções, o II em 30 e o III em 29 (Rothfels & Dunbar, 1953). A identificação dos braços cromossômicos é feita por marcadores específicos, conhecidos também como universais, por exemplo, o IS (braço curto do cromossomo I) apresenta uma série de bandas finas na região terminal denominada “turkey tail” (Tt); o IIS (braço curto do

cromossomo II) apresenta o “Ring of Balbiani” (RB) e o “trapeze” (T); o IIL (braço longo do cromossomo II) apresenta o marcador “three sharp” (‘3’), localizadas próximas ao centrômero e o “Parabalbiani” (Pb), de posição variável de acordo com a espécie. O IIIS (braço curto do cromossomo III) apresenta como marcadores o “Blister” (Bl) e o “capsule” (Ca). A região organizadora do nucléolo tem localização fixa em cada espécie, mas pode ocorrer em qualquer um dos cromossomos em espécies diferentes. Geralmente, a RON se encontra na mesma posição em espécies próximas ou do mesmo grupo (Rothfels, 1987; Hamada & Adler, 1999).

Em cromossomos politênicos de Simuliidae é muito comum a ocorrência de inversões. Inversões fixas e polimórficas são numeradas, de acordo com a ordem de descobrimento, por letras ou números sendo que as inversões fixas são sublinhadas no mapa, no texto e no idiograma, e as inversões flutuantes não (Moulton & Adler, 1997). Estas podem ser pericêntricas (incluem o centrômero) ou paracêntricas (não incluem o centrômero) e heterozigotas ou homozigotas; é mais fácil visualizar inversões heterozigotas pois, geralmente formam alças bem evidentes. As inversões homozigotas são reconhecidas por meio de cuidadosa comparação das seqüências de bandas de cada cromossomo com o mapa padrão estabelecido para a espécie em estudo ou com a espécie com a qual está sendo comparada. As inversões ligadas ao cromossomo X são representados por colchetes em linhas pontilhadas enquanto que as inversões ligadas ao cromossomo Y são representadas por colchetes em linhas tracejadas (Bedo, 1984).

O padrão de bandamento dos cromossomos politênicos de *S. daltanhani* foi comparado com o mapa padrão de *S. quadrifidum* e *S. cauchense* (Alvan-Aguilar, 2002), e com o mapa padrão de *S. goeldii* e *S. ulysseesi* (Rios-Velásquez *et al.* 2002) para verificar as semelhanças entre essas espécies.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Simulium daltanhani ao ser descrita, foi coletada em três localidades: Manaus, Presidente Figueiredo e Itacoatiara (Hamada & Adler, 1998). Neste estudo os exemplares foram coletados somente na Reserva do Cigs - Centro de Instrução de Guerras na Selva, Manaus, pois nas outras localidades os criadouros apresentaram baixa densidade larval. As larvas foram coletadas na área semi-aberta do igarapé, em diferentes substratos, principalmente em folhas decíduas e verdes (Fig. 8).

Foram analisadas 296 larvas, das quais 137 machos e 159 fêmeas. Desse total, 33 lâminas de machos e 36 de fêmeas foram lidas completamente (Tab. 1). O número de indivíduos analisados está diretamente relacionado com o número de lâminas confeccionadas, ou seja, para cada indivíduo foi feita a preparação de uma lâmina. A baixa percentagem (23%) de lâminas completamente lidas foi decorrente do fato de um grande número de indivíduos apresentaram cromossomos com pouca nitidez, cromossomos degradados ou muito compactados, impossibilitando a identificação dos braços e leitura do padrão de bandamento (Fig. 9). Podemos atribuir estes resultados a vários fatores como: método de coleta do material examinado ou ainda a influência de alguns fatores físicos-químicos ambientais onde os imaturos se desenvolvem, tais como temperatura e alimentação podem contribuir para a baixa qualidade dos cromossomos (McCreadie & Colbo, 1992).

Aproximadamente 1 500 fotos foram feitas, algumas foram tomadas para a construção do mapa cromossômico de *S. daltanhani*. Esta espécie possui três pares de cromossomos homólogos bem pareados. O maior, o cromossomo I, é metacêntrico enquanto os outros dois, cromossomos II e III são menores e submetacêntricos. O centrômero no cromossomo I está representado por uma banda característica, bem marcada com um aspecto

a)

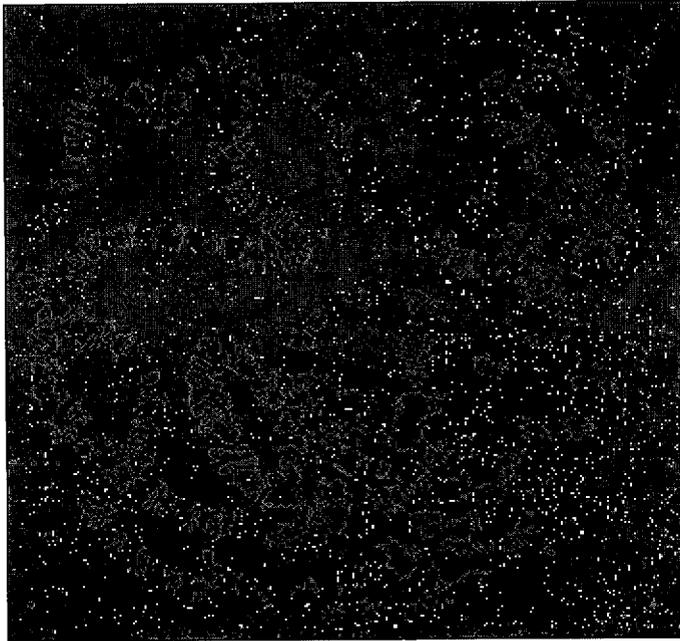


b)



Figura 8– Substratos nos quais foram coletadas as larvas da área semi- aberta: a) folhas secas; b) folhas verdes.

a)



b)

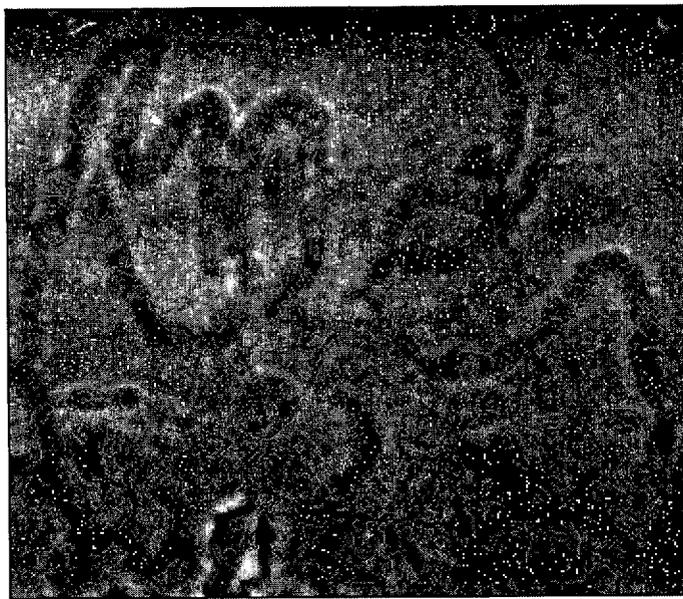


Figura 9- (a) núcleo com cromossomos completamente compactados; (b) núcleos com cromossomos degradados.

Tabela 1- Número total de larvas de *S. daltanhani* (Diptera: Simuliidae) analisadas completamente e incompletamente a nível citológico, e o número total de larvas com cromossomos degradados em diferentes coletas. Nota: III s/i (número total de larvas com inversão heterozigota); III s/s (número total de larvas com inversão homozigota).

Coletas	Larvas analisadas									
	Total		Degradadas		Completamente		Incompletamente			
	machos	fêmeas III s/i III s/s	machos	fêmeas	machos	fêmeas	machos	fêmeas	machos	fêmeas
10.03.2000	28	22	19(68%)	17(77%)	08(29%)	02(9%)	01(4%)	03(14%)		
28.02.2002	37	31	32(86%)	27(87%)	03(8%)	03(10%)	02(5%)	01(3%)		
21.08.2002	19	20	05(26%)	02(10%)	07(37%)	11(52%)	07(37%)	08(38%)		
21.05.2003	37	40	11(30%)	12(29%)	13(35%)	12(29%)	13(35%)	17(41%)		
22.08.2003	16	44	06(38%)	28(64%)	02(13%)	08(18%)	08(50%)	08(18%)		
Total	137	157	73	86	33	36	31	37		

pesado; já nos cromossomos II e III a região centromérica está representada por uma região expandida facilmente reconhecida com uma banda bem marcada.

O complemento cromossômico foi dividido em 100 seções aproximadamente iguais para facilitar na leitura do padrão de bandamento e numerado, começando na região distal em relação ao centrômero do braço curto do cromossomo I e terminando na região distal em relação ao centrômero do braço longo do cromossomo III. As divisões foram feitas aleatoriamente sempre comparando com o mapa padrão de *S. quadrifidum* e *S. goeldii* (Fig. 10).

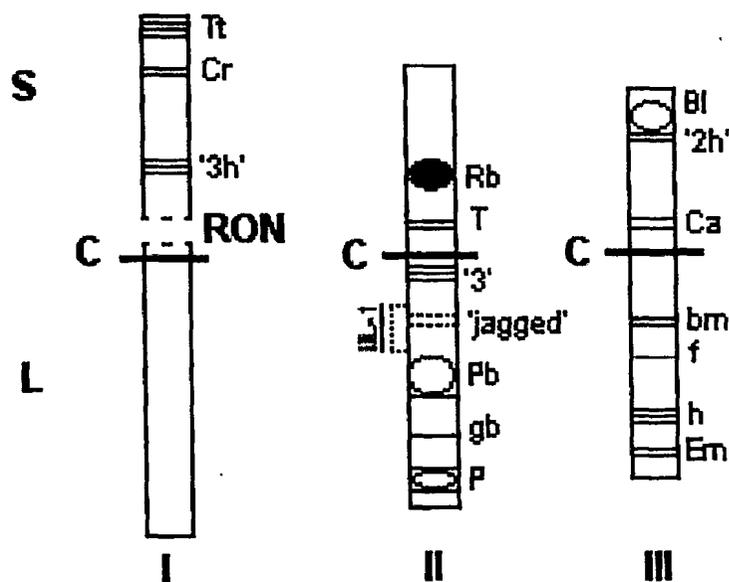


Figura 10- Idiograma de *S. daltanhani* mostrando os braços cromossômicos e os marcadores correspondentes a cada braço.

Cromossomo I

O cromossomo I foi dividido em 41 seções; o braço curto contendo as seções de 1 a 20 e o braço longo as seções de 21 a 41. A região organizadora do nucléolo pode ser reconhecida por ser uma região altamente expandida, de fácil reconhecimento e dotada de uma série de bandas que se rompem entre as seções 18 e 19 do braço curto, próximo à área centromérica. O braço curto foi caracterizado por ter na seção 1 os marcadores "Turkey tail", "crack" e "tree heavy" na seção 3 e 13 respectivamente. Não foi observada nenhuma inversão nesse cromossomo (Figs. 11 e 12).

Cromossomo II

O cromossomo II foi dividido em 30 seções; o braço curto contendo as seções de 42 a 55 e o braço longo, as seções de 56 a 71. O braço curto pode ser reconhecido pelo marcador "Ring of Balbiani" na seção 48 e por três bandas, conhecidas como "trapeze" na seção 54 (Fig. 13). O braço longo é facilmente reconhecido pela presença de três bandas finas "three sharp" na seção 56, adjacente ao centrômero e pelos marcadores "jagged", "Parabalbiani", "gray band" e pufe nas seções 60, 63, 64 e 70, respectivamente (Fig. 14). Foi observada uma inversão heterozigota, somente no braço longo de fêmeas, denominada III-1; apenas 1,3 % das fêmeas não apresentaram essa inversão.

Cromossomo III

O cromossomo III foi dividido em 29 seções; o braço curto abrangeu as seções de 72 a 82 e o braço longo, as seções 83 a 100. Este cromossomo foi caracterizado pela presença do "blister", "two heavy" ('2h') e o "capsule" que estão localizados nas seções 74, 75 e 79 respectivamente, no braço curto (Fig. 15). O braço longo pode ser reconhecido pelos

marcadores “basal marker”, “fuzzy”, “three heavy band” e “end marker” encontrados nas seções 86, 87, 97 e 99 respectivamente (Figura 16). Não foi encontrada nenhuma inversão neste cromossomo.

Os marcadores foram constantes em todos os núcleos e exemplares analisados. Os idiogramas dos mapas cromossômicos das espécies que foram comparadas com *S. daltanhani* estão representados na Fig. 17. A região organizadora do nucléolo (RON) não se encontra na mesma posição em todas as espécies colocadas no grupo *S. quadrifidum*. Em *S. goeldii* e *S. ulyssesi* a RON se encontra na mesma posição, nas seções 20 e 21 do braço curto do cromossomo I. Em *S. cauchense*, a RON está localizada nas seções 19 e 20 do braço curto do cromossomo I e, em *S. quadrifidum*, a RON está localizada na seção 83 do braço longo do cromossomo III. Em *S. daltanhani*, a RON está localizada nas seções 23 e 24 do braço longo do cromossomo I. Embora a maioria das espécies estudadas apresentem a RON no cromossomo I esta, com exceção de *S. goeldii* e *S. ulyssesi* não se encontra na mesma posição. Como regra geral, espécies pertencentes ao mesmo grupo de espécies ou espécies próximas apresentariam a RON na mesma região cromossômica (Rothfels, 1987).

Ao descreverem *S. daltanhani*, Hamada & Adler (1998) não a colocaram em nenhum grupo de espécies. Py-Daniel & Coscarón (2001), no entanto, ao descreverem *S. ulyssesi* a posicionaram no gênero *Coscaroniellum* (= grupo *S. quadrifidum*) sem apresentar as razões para essa decisão. Citologicamente, os pares de espécies *S. quadrifidum* - *S. cauchense* e *S. goeldii* - *S. ulyssesi*, sem dúvida são espécies estreitamente relacionadas, uma vez que se diferenciam por poucas inversões, mantendo, portanto, o padrão de bandamento dos cromossomos politênicos conservado. O único grupo de espécies estudado citotaxonomicamente no Brasil foi o grupo *S. perflavum*, no qual as quatro espécies estudadas apresentam a mesma seqüência de bandas se diferenciando por poucas inversões e apenas

uma delas apresenta a região organizadora nucleolar localizada em diferente posição (Hamada & Adler, 1999).

Em Simuliidae não existe um cromossomo sexual diferenciado como em outros grupos de organismos, tais como os mosquitos da família Culicidae em que o primeiro par cromossômico é o par sexual enquanto que o segundo e o terceiro são autossomos (Rafael, 2001). Acredita-se que os genes que determinam o sexo em Simuliidae podem estar presentes em várias regiões em qualquer um dos braços cromossômicos, obedecendo a um sistema de transposons (Hoyos, 1990). Talvez isto explique as várias configurações citológicas encontradas para o sistema de cromossomos sexuais de Simuliidae.

Algumas inversões heterozigotas ou homozigotas pericêntricas podem estar ligadas ao cromossomo X ou Y. Marcadores como heterobanda ou cromossomos extranumerários como o cromossomo B, também podem está ligados ao sexo. No presente estudo, foram encontradas duas configurações de cromossomos sexuais ligadas ao sexo feminino. Uma inversão heterozigota envolvendo as seções 60, 61, 62, 63, 64, 65 e 66 foi observada, apenas em fêmeas, no braço longo do cromossomo II; essa inversão estava ausente em 1,3% das larvas fêmeas examinadas. Embora o número de indivíduos examinados tenha sido baixo, aparentemente o fator sazonalidade (maio/agosto) não está associado à presença dessas duas configurações do cromossomo sexual feminino. É comum encontrar inversões heterozigotas ligadas ao sexo masculino (Basrur, 1962; Rothfels, 1979; Rothfels, 1981) porém, na região amazônica, nas espécies *S. argentiscutum* Shelley & Luna Dias, *S. oyapockense* e *S. cauchense* as fêmeas é que são heterogaméticas (Procunier *et al.*, 1987; Alvan-Aguilar, 2002; Matos, 2003). Hadi *et al.* (1995) também encontraram inversões heterozigotas em fêmeas de *S. bidentatum* no Japão, sendo este o primeiro registro desta inversão para a região Oriental.

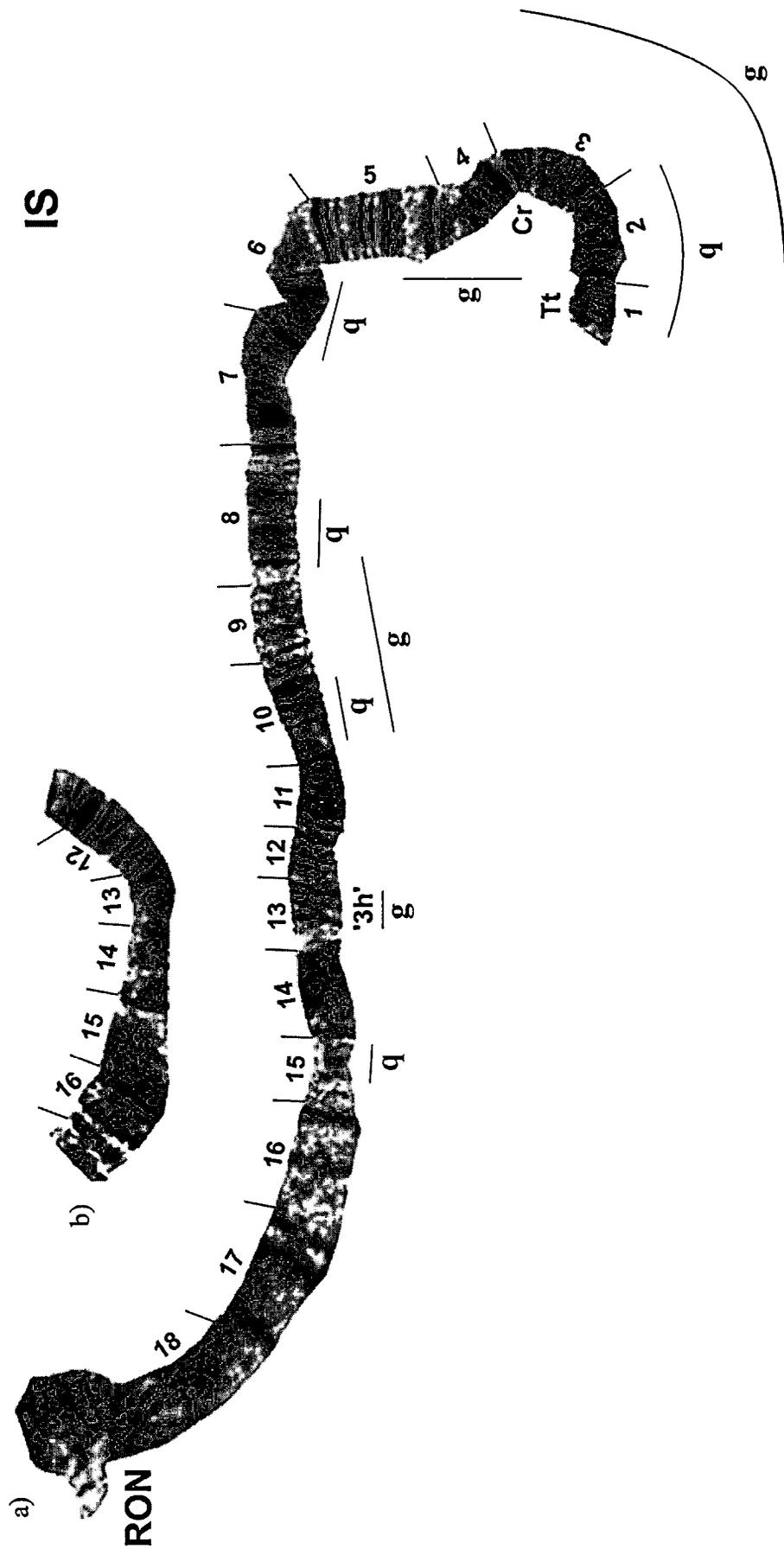


Figura 11- Cromossomo politênico I- braço curto (S) de *Simulium daltanhani*. a) Região do organizador nucleolar (RON), "three heavy" ('3h'), "crack" (Cr) e "Turkey tail" (Tt); segmentos semelhantes ao mapa padrão de *S. quadrifidum* (q) e segmentos semelhantes ao mapa padrão de *S. goeldii* (g). b) algumas seqüências correspondentes ao braço inteiro.

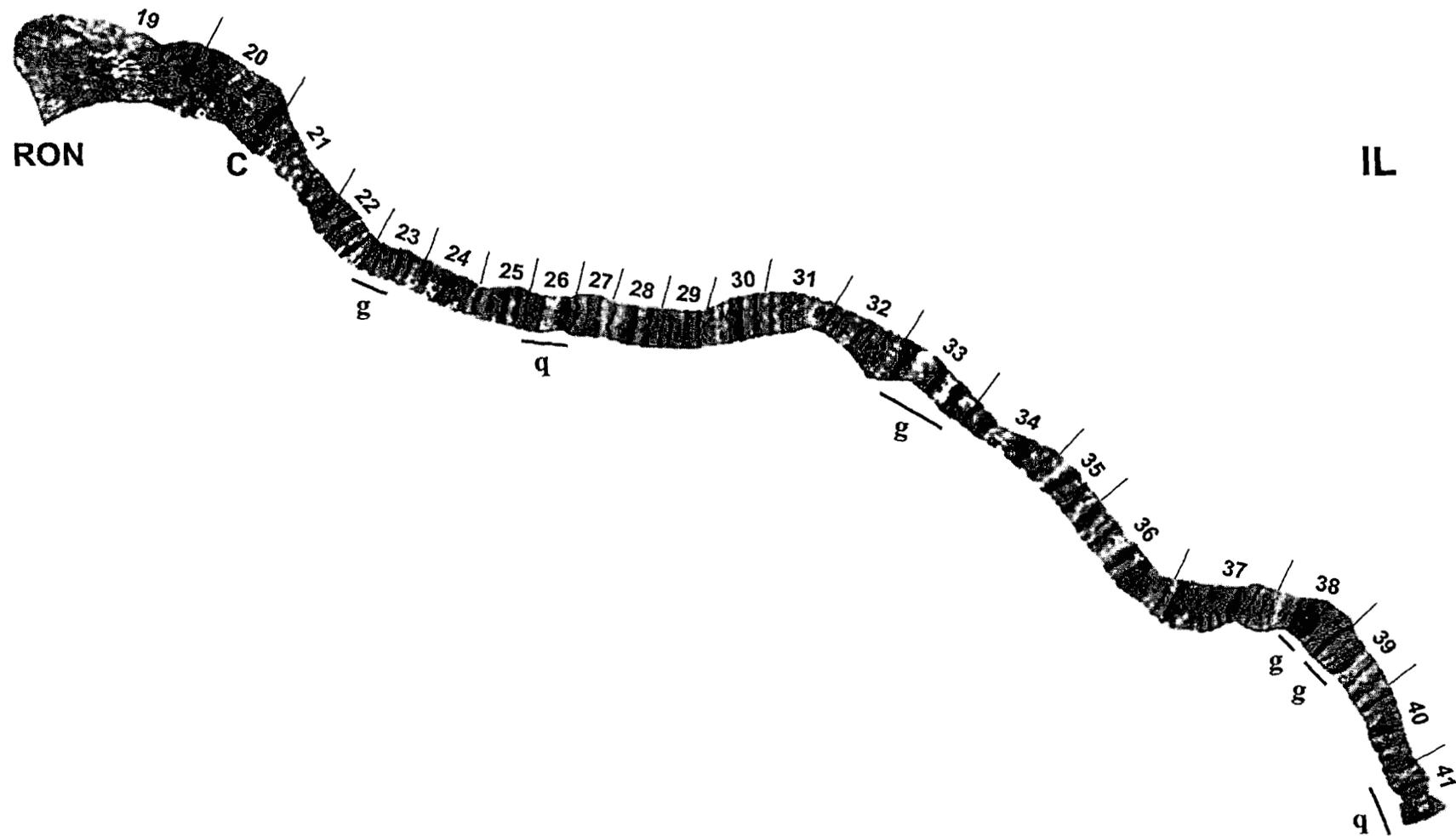


Figura 12- Cromossomo politênico I-braço longo (L) de *Simulium daltanhani*. Região do organizador nucleolar (RON). Centrômero (C), segmentos semelhantes ao mapa padrão de *S. quadrifidum* (q) e segmentos semelhantes ao mapa padrão de *S. goeldii* (g).

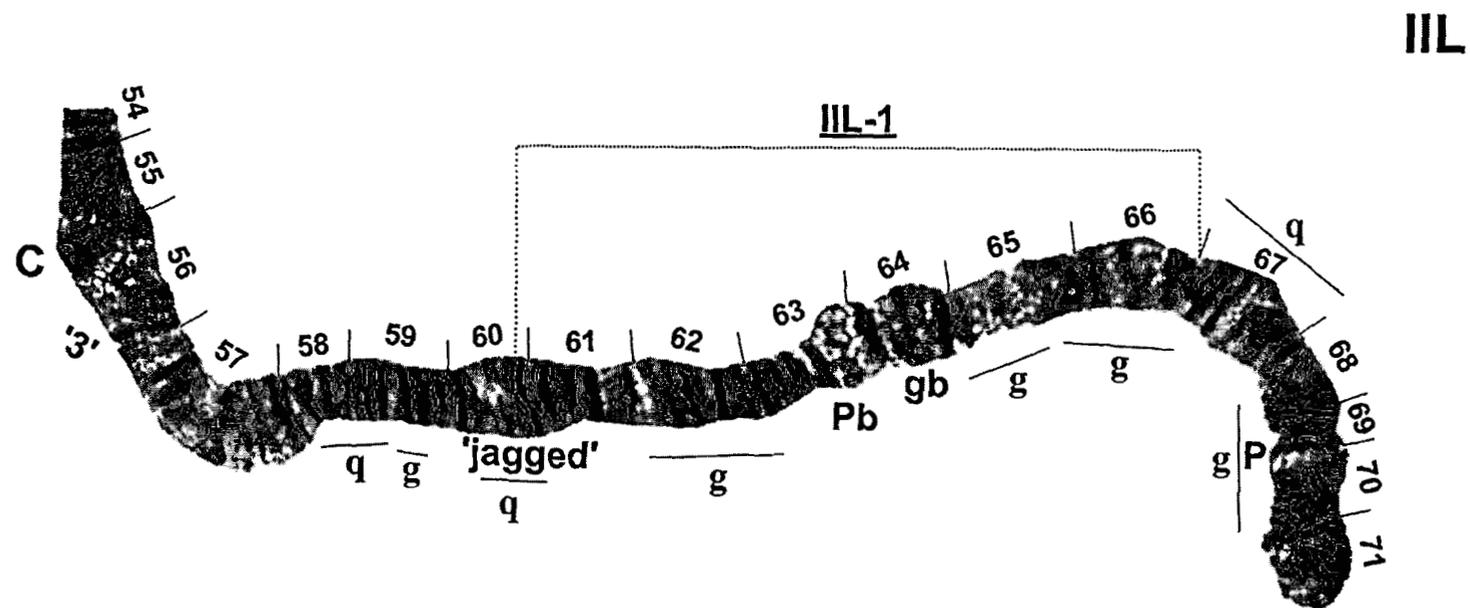
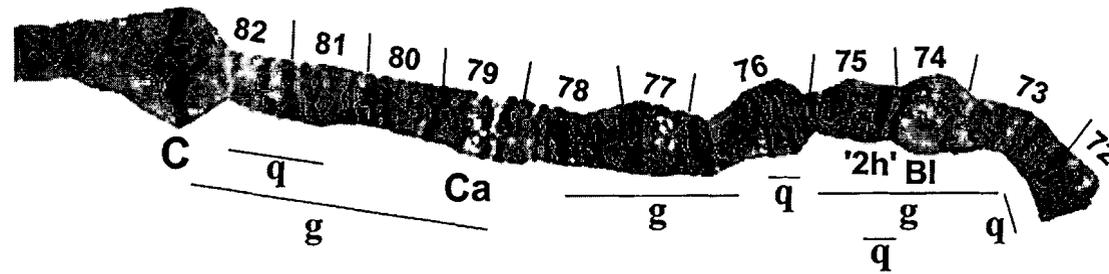


Figura 14- Cromossomo politênico II- braço longo (L) de *Simulium daltanhani*. Centrômero (C), "three sharp" ('3'), 'jagged', "Parabalbani" (Pb), "gray band" (gb) "pufe"(P); segmentos semelhantes ao mapa padrão de *S. quadrifidum* (q) e segmentos semelhantes ao mapa padrão de *S. goeldii* (g). Inversão heterozigota, ligada ao cromossomo X. (III-1). Obs. Linhas tracejadas indicam que o exato ponto de quebra da inversão, não foi definido.



IIIS

Figura 15 - Cromossomo politênico III- braço curto (S) de *Simulium daltanhani*. Centrômero (C), “capsule” (Ca), “two heavy” (‘2h’), Blister (BI); segmentos semelhantes ao mapa padrão de *S. quadrifidum* (q) e segmentos semelhantes ao mapa padrão de *S. goeldii* (g).

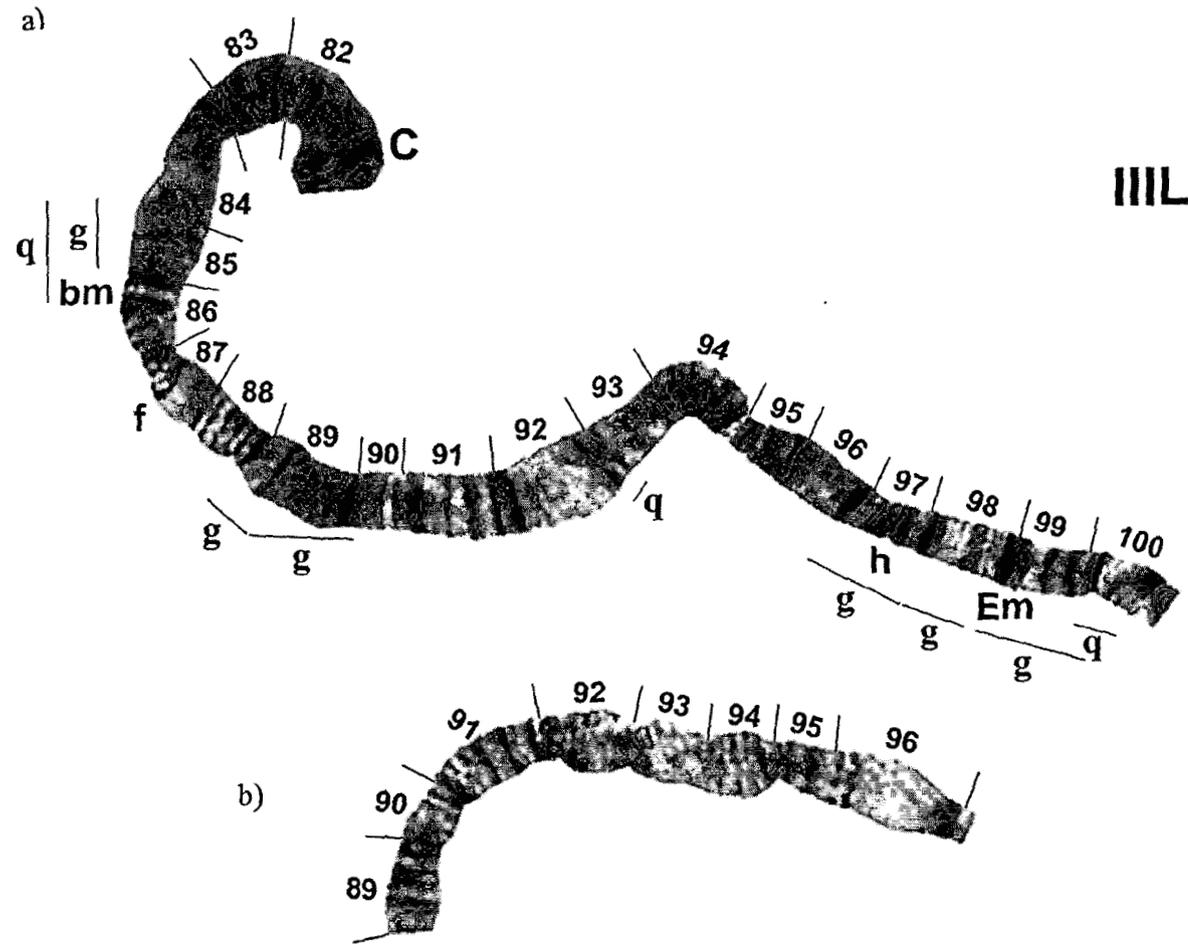


Figura 16- Cromossomo politênico III- braço longo (L) de *Simulium daltanhani*. a) Centrômero (C), "basal marker" (bm), "fuzzy" (f), "three heavy band" (h), "end marker" (Em), segmentos semelhantes ao mapa padrão de *S. quadrifidum* (q) e segmentos semelhantes ao mapa padrão de *S. goeldii* (g). b) algumas seqüências correspondentes ao braço inteiro.

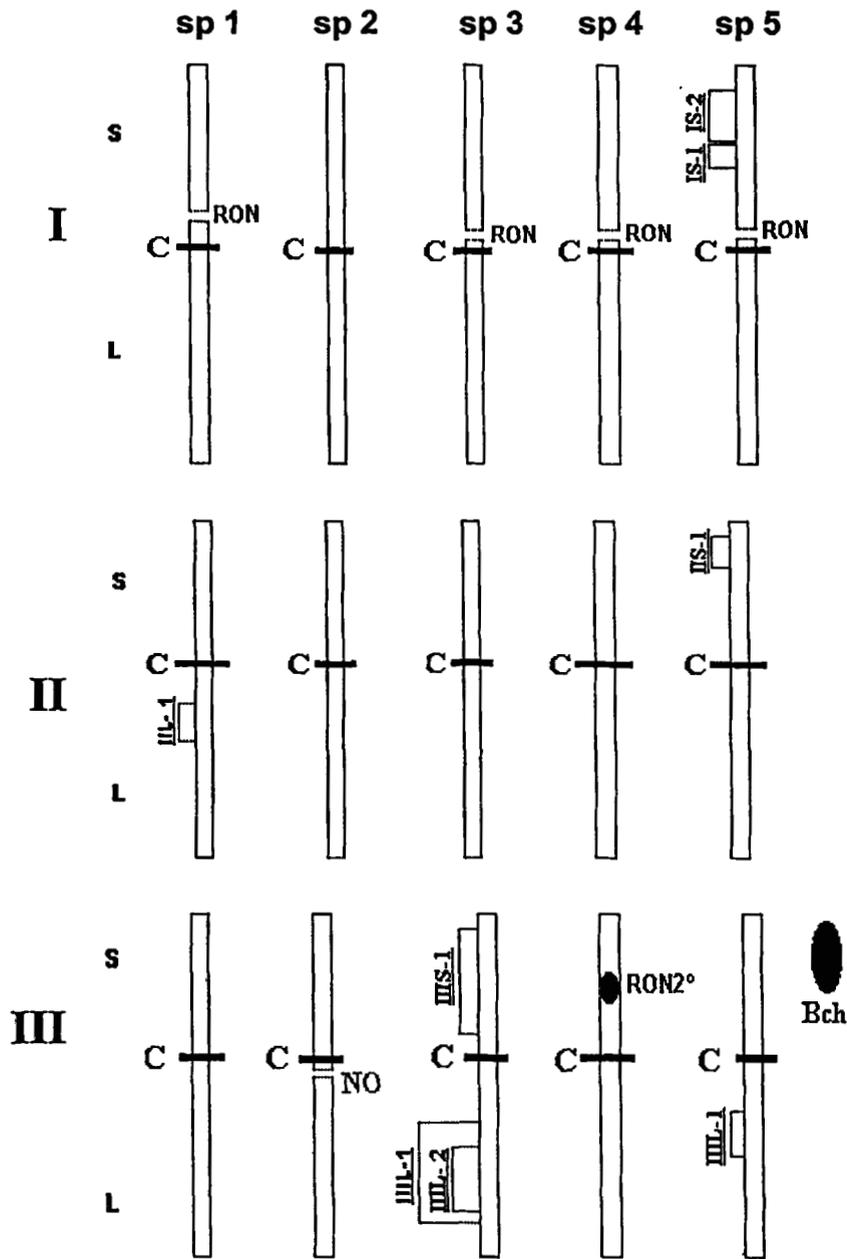


Figura 17 - Idiograma dos cromossomos politênicos: *Simulium daltanhani* (sp 1) *Simulium quadrifidum* (sp 2); *Simulium cauchense* (sp 3); *Simulium goeldii* (sp 4), *Simulium ulyssesi* (sp 5). Cromossomos I (I), cromossomo II (II), cromossomo III (III), braço curto (S), braço longo (L), centrômero (C), região do organizador nucleolar (RON), cromossomo extranumérico B(Bch) e região do organizador nucleolar secundário (RON2°). Em *S. daltanhani* a inversão III-1 na condição heterozigota, representa um marcador sexual ligada ao cromossomo X. Em *S. ulyssesi*, as inversões fixas IS-1, IS-2, IIS-1, IIIL-1 estão representadas por um colchete ao lado esquerdo do cromossomo. Em *S. cauchense*, as inversões fixas IIIS-1, IIIL-1 e IIIL-2 também estão representadas por um colchete no lado esquerdo do cromossomo. A inversão IIIL-2 em *S. cauchense* na condição heterozigota, representa um marcador sexual ligada ao cromossomo X.

Utilizamos polimorfismo quando se trata de uma inversão flutuante presente na população, independente do sexo, i.e., ocorre tanto em machos quanto em fêmeas. Não foi observado polimorfismo intra-específico na população de *S. daltanhani* estudada. Esse fato tem sido comum em espécies estudadas no Brasil, onde *S. pertinax*, *S. perflavum*, *S. quadrifidum*, *S. cauchenche*, *S. goeldii* e *S. ulyssesi* também não apresentaram polimorfismo (Hamada e Adler, 1999; Campos-Gaonia *et al.*, 2001; Alvan-Aguilar, 2002; Rios-Velásquez *et al.*, 2002).

Com as diferenças observadas no padrão de bandamento das espécies estudadas, não foi possível propor um mapa padrão para estabelecer relações entre as cinco espécies que compõem o grupo *S. quadrifidum* (com exceção de *S. cerradense*, que não foi estudada citologicamente). O padrão de bandamento dos cromossomos de *S. daltanhani* conforme visto anteriormente é muito diferente das outras quatro espécies (*S. quadrifidum* - *S. cauchense*; *S. goeldii* - *S. ulyssesi*), sugerindo que essas pertençam a três grupo de espécies distintos ainda não conhecidos, necessitando de mais estudos de espécies que pertençam a outros grupos do subgênero *Psaroniocompsa*.

5. CONCLUSÃO

- Não foi observado polimorfismo na população de *S. daltanhani* examinada.
- Duas configurações cromossômicas diferentes foram encontradas ligadas ao sexo feminino (X0Y0, X1Y0).
- Com as diferenças citológicas encontradas entre as espécies consideradas neste estudo, podemos sugerir que estas pertençam a três grupos distintos de espécies. Porém, estudos sobre cromossomos politênicos das outras espécies pertencentes aos outros grupos de espécies do subgênero *Psaroniocompsa* serão necessários para auxiliar no posicionamento de *S. daltanhani* dentro desse subgênero.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adler, P.H. 1994. Simuliidae. p.478-487. In: Morse, J.C.; Yang, L.; Tian, L. (eds.). *Aquatic Insects of China useful for monitoring water quality*. University Hohal..
- Adler, P.H.; Mason, P.G. 1997. Black flies (Diptera: Simuliidae) of east-central Saskatchewan, with descriptions of new species and implications for pest management. *The Canadian Entomologist*, 129: 81-91.
- Alencar, Y.B. 2003. *Potencial biotecnológico, taxonomia e distribuição de fungos Trichomyces (Zygomycota) associados às larvas de Simuliidae (Diptera: Nematocera) em igarapés da Amazônia Central, Brasil*. Tese de Doutorado. Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia/ Universidade Federal do Amazonas. Manaus, Amazonas, Brasil. 193p.
- Alencar, Y.B.; Hamada, N.; Magni-Darwich, S. 1999. Stomach content analysis of potential predators of Simuliidae (Diptera: Nematocera) in two lowland forest streams, Central Amazonia, Brazil. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 28(2): 327-332.
- Alencar, Y.B.; Ludwig, T.A.V.; Soares, C.C.; Hamada, N. 2001. Stomach Content Analyses of *Simulium perflavum* Roubaud 1906 (Diptera: Simuliidae) larvae from streams in Central Amazônia, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96 (4): 561-576.
- Alvan-Aguilar, M.A. 2002. *Estudos Citotaxonômicos e moleculares de Simulium quadrifidum Lutz, 1917 e Simulium cauchense Floch & Abonnenc, 1946 (Diptera: Simuliidae) na Amazônia, Brasil*. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia/ Universidade Federal do Amazonas. Manaus, Amazonas, Brasil. 90p.
- Andrade, H.T.A.; Nascimento, R.S.S.; Gurgel, H.C.B.; Medeiros, J.F. 2000. Simuliidae (Diptera) integrantes da dieta de *Poecilia vivipara* Bloch & Schneider, 1801

- (Atheriniformes; Poeciliidae) no Rio Ceará Mirim, Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. *Entomologia y Vectores*, 7(1): 119-122.
- Araújo-Coutinho, C.J.P.C.; Maia-Herzog, M.; Souza, B.C. 1988. Levantamento das espécies do gênero *Simulium* Latreille (Diptera: Simuliidae) no litoral norte do estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Entomologia*, 32 (1):11-17.
- Arteaga, L.T.; Hoyos P.M. 1999. New Cytotype in the *Simulium metallicum* Complex (Diptera: Simuliidae) from Cundinamarca, Colômbia. *Entomological Society of America*, 36(2): 133-140.
- Basrur, P.K. 1962. The salivary gland chromosomes of seven species of *Prosimulium* (Diptera: Simuliidae) from Alaska and British Columbia. *Canadian Journal of Zoology*, 40: 1019.
- Bedo, D.G.1975. Polytene chromosomes of three species of blackflies in the *Simulium pictipes* group (Diptera: Simuliidae). *Canadian Journal of Zoology*, 53: 1147- 1164.
- Bedo, D.G. 1979. Cytogenetics and Evolution of *Simulium ornatipes* Skuse (Diptera: Simuliidae). II. Temporal variations in chromosomal polymorphisms and homosequential sibling species. *Evolution*, 33(1): 296-308.
- Bedo, D.G.1984. Sibling species and sex chromosome differentiation in *Simulium neornatipes* (Diptera: Simuliidae). *Canadian Journal Genetic Cytological*, 26: 318-325.
- Bennett, F.G. 1963. The salivary gland as an aid in the identification of some simuliids. *Journal of Zoology*, 41: 947-952.
- Briceño-Iragorry, L. 1943. Nota sobre simulídeos Del Valle de Caracas. *Boletín del laboratorio de la clinica Luis Razetti*, 3(10): 181-186.

- Burton, G.J.; McRae, T.M. 1972. Observations on Trichopteran Predators of Aquatic Stages of *Simulium damnosum* and other *Simulium* species in Ghana. *Journal of Medical Entomology*, 9(4): 289-294.
- Campos- Gaona, J.; Andrade, C.F.S. 1999. Aspectos da Entomologia Médica e Veterinária dos borrachudos (Diptera, Simuliidae) – Biologia, Importância e controle. *Revista Lecta*, 17 (1): 51-65.
- Campos- Gaona, J.; Recco- Pimentel, S.M.; Andrade, C.F.S. 1996. Polytene chromosome analysis of a population of *Simulium pertinax* (Diptera: Simuliidae). *Brazilian Journal of Genetics*, 19(1): 47-52.
- Campos- Gaona, J.; Andrade, C.F.S.; Recco- Pimentel, S.M. 2001. Chromosomal comparisons among and within populations of *Simulium (Chirostilbia) pertinax* (Diptera, Simuliidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96(3): 365-369.
- Cerqueira, N.L.; Nunes de Melo, J.A. 1967. Simuliidae da Amazônia II: Descrição de *Simulium goeldii* sp.n. (Diptera: Nematocera). *Amazoniana*, 2:125-130.
- Charalambous, M.; Shelley, A.; Herzog, M.M.; Luna Dias, A.P.A. 1996. Four new cytotypes of the onchocerciasis vector blackfly *Simulium guianense* in Brazil. *Medical and Veterinary Entomology*, 10: 111-120.
- Charalambous, M.; Ready, P.D.; Shelley, A. J.; Ardube, M.; Lowry, C.A. 1993. Cytological and isoenzyme analysis of the Bucay and Quevedo Cytotypes of the Onchocerciasis vector *Simulium exiguum* (Diptera: Simuliidae) in Ecuador. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 88(1): 39-48.
- Conn, J.E.; Mitchell, S.E.; Cockburn, A.F. 1997. Mitochondrial DNA variation within and between two species of neotropical Anopheline mosquitoes (Diptera: Culicidae). *The Journal of Heredity*, 88(2): 98-107.

- Coscarón-Arias, C.L. 1998. The Polytene Chromosomes of *Cnesia dissimilis* (Edwards) and three species of *Gigantodax* Enderlein (Diptera: Simuliidae) from Latin National park (Argentina). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93(4): 445- 458.
- Coscarón, S. 1987. El género *Simulium* Latreille en la región Neotropical: Análisis de los grupos supraespecíficos, especies que los integran y distribución geográfica (Simuliidae: Diptera). *Museo Paraense Emilio Goeldi, Coleção Emílio Snethlage*, 111pp.
- Crosskey, R.W. 1987. The future of black fly taxonomy. p.11-23. In: Kim, K.C.; Merritt, R.W.(eds.). *Black flies-Ecology, population management and Annotated world list*. Pennsylvania State University, University Park and London, USA. 528p.
- Crosskey, R.W. 1990. Life in the water. p. 89-245. In: Jhon Wiley and Sons. (eds.). *The natural history of Blackflies*. The British Museum of Natural History, London, 711p.
- Crosskey, R.W.; Howard, T. M. 1997. A new taxonomic and geographical inventory of blackflies (Diptera: Simuliidae). *The Natural History Museum*, 144 p.
- Ferreira, R.L.M. 2003. *Preferência alimentar, atividade de vôo diurna e anual, comportamento de ataque, preferência por habitat e idade fisiológica de adultos de mutucas (Diptera: Tabanidae) na Amazônia Central, Brasil*. Tese de Doutorado. Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia/ Universidade Federal do Amazonas. Manaus, Amazonas, Brasil. 163p.
- Flook, P.K.; Post, R.J. 1997. Molecular population studies of *Simulium damnosum* s.l. (Diptera: Simuliidae) using a novel interspersed repetitive DNA marker. *Heredity*, 79: 531-540.
- Grillet, M.E.; Barrera, R.; Conn, J. 1995. *Simulium mettalicum* cytospecies e larval habitat characterization in the Altamira focus of onchocerciasis, northern Venezuela. *Medical and Veterinary Entomology*, 9: 195-201.

- Grillet, M.E.; Botto, C.; Basañez, M.G.; Barrera, R. 1994. Vector competence of *Simulium mettalicum* s.l. (Diptera: Simuliidae) in two endemic áreas of human onchocerciasis in northern Venezuela. *Annals of tropical Medicine and Parasitology*, 88(1): 65-75.
- Guerra, M. 1988. *Introdução à Citogenética Geral*. Guanabara S. A., Rio de Janeiro. 142 p.
- Hadi, U.K.; Takaoka, H.; Aoki, C. 1995. Larval polytene chromosomes of three Japanese blackflies species (Diptera: Simuliidae). *Medical Entomological Zoology*, 47(1): 47-54.
- Hamada, N. 1993. Abundância de larvas de *Simulium goeldii* (Diptera: Simuliidae) e caracterização de seu habitat numa floresta de terra firme, na Amazônia Central. *Boletim do Museo Paraense Emilio Goeldi*, 9(2): 203-218.
- Hamada, N.; Adler, P. 1998. A new species of *Simulium* (Diptera: Simuliidae) from open areas in Central Amazonia, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93(3): 317-325.
- Hamada, N.; Adler, P. 1999. Cytotaxonomy of four species in the *Simulium perflavum* species group (Diptera: Simuliidae) from Brazilian Amazonia. *Systematic Entomology*, 24: 273-278.
- Hamada, N.; McCreadie, J.W. 1999. Environmental factors associated with the distribution of *Simulium perflavum* (Diptera: Simuliidae) among streams in Brazilian Amazonia. *Hydrobiologia*, 397: 71-78.
- Hamada, N.; Adler, P.H. 2001. Bionomia e chave para imaturos e adultos de *Simulium* (Diptera: Simuliidae) na Amazônia Central, Brasil. *Acta Amazonica*, 31(1): 109-132.
- Hartl, D.L.; Freifelder, D.; Snyder, L.A. 1988. Basic genetics. Jones and Bartlett Publishers, Boston, USA. 505 p.
- Higazi, T.B.; Boakye, D.A.; Wilson, M.D.; Mahmoud, B.M. Baraka, O.Z.; Mukhtar, M.M.; Unnasch, T.R. 2000. Cytotaxonomic and Molecular Analysis of *Simulium*

(*Edwardsellum*) *damnosum* sensu lato (Diptera: Simuliidae) from Abu Hamed, Sudan.

Entomological Society of America, 37(4): 547-553.

Hoyos, P.M. 1990. La importancia de los cromosomas politenicos en la determinacion taxonomica de los simulidos. *Revista de la Academia Colombiana Ciencias*, 16(66): 511-520.

Kruger, A.; Garms, R. 1999. Verification of the synonymy of *Simulium damnosum* cytoform 'Nyamagasani' with *Simulium kilibanun* Gouteux (Diptera: Simuliidae) together with descriptive data on related forms. *Bulletin of Entomological Research*, 89: 533-541.

Luz, S.L.B. 1999. *Sistemática integrada de Simulium oyapockense* (Floch & Abonnenc, 1946) e *Simulium roraimense* (Nunes de Mello, 1974), vetores de *Onchocerca volvulus* no foco amazônico de oncocercose humana do Brasil. Tese de doutorado, FIOCRUZ. Rio de Janeiro, 109p.

Mafuyai, H.B.; Post, R.J.; Vajime, C.G.; Molyneux, D.H. 1996. Cytotaxonomic identifications of the *Simulium damnosum* complex (Diptera: Simuliidae) from Nigeria. *Tropical Medicine and International Health*, 1(6):779-785.

Marcondes, C.B. 2001. *Entomologia: Médico e Veterinário*. Ed. Atheneu, São Paulo 432pp.

Mattos, A.A.2003. Citotaxonomia de *Simulium argentiscutum* Shelley & Luna Dias (Diptera: Simuliidae). Anais da XII Jornada de Iniciação Científica do PIBIC/INPA/CNPq. Manaus, AM. 65-66.p.

Mayr, E. 1942. *Systematics and the origin of species* Columbia. Univ. Press, New York.

McCreadie, J.W.; Colbo, M.H. 1992. Spatial distribution patterns of larval cytotypes of the *Simulium venustum/verecundum* complex (Diptera: Simuliidae) on the Avalon Peninsula, Newfoundland: factors associated with cytoptype abundance and composition. *Canadian Journal Zoology*. 70: 1389-1396.

- Medeiros, J.F.; Py-Daniel, V. 1999. Atividade hematofágica e Infecção de três espécies de Simuliidae (Diptera: Culicomorpha) em Xitei/ Xidea, área indígena Yanomami, Roraima, Brasil. *Entomologia y Vectores*, 6 (3): 210-226.
- Moulton, J.K.; Adler, P.H. 1997. The genus *Ectemnia* (Diptera: Simuliidae): Taxonomy, polytene chromosomes, new species, and phylogeny. *Canadian Journal Zoology*, 75: 1896-1915.
- Neves, D.P. 1991. Parasitologia Humana. 8 ed. Editora Atheneu. p.379-382.
- Pérez, J.R. 1985. Vectores de la oncocercosis humana en la region Neotropical. *Bolletín of Sanit Panam*, 98(2):117-135.
- Post, R.J.; Flook, P.K. 1992. DNA probes for the identification of members of the *Simulium damnosum* complex (Diptera: Simuliidae). *Medical and Veterinary Entomology*, 6: 379-384.
- Procunier, W.S.; Post, R.J. 1986. Development of a method for the cytological identification of man-biting sibling species within the *Simulium damnosum* complex. *Tropenmedizin und Parasitologie*, 13: 85-98.
- Procunier, W.S.; Shelley, A.J.; Azurbe, M. 1987. Cytological identifications of *Simulium oyapockense* manabi form (Diptera: Simuliidae): a potential vector of onchocerciasis in Ecuador. *Tropical Medici Parasitological*, 38:71.
- Py-Daniel. 1983. Caracterização de dois novos subgêneros em Simuliidae (Diptera: Culimorpha) Neotropical. *Amazoniana* 7(2): 159- 223.
- Py-Daniel, V.; Sampaio, R.T.M. 1994. *Jalacingomyia* gen. n. (Cuolicomorpha): a ressurreição de Gymnopauidinae; a eliminação do nível tribal; apresentação de novos caracteres e a

- redescrição dos estágios larval e pupal de *Simulium colombaschense* (Fabricius, 1787) (Diptera: Simuliidae). *Memórias do CAICET*, 4: 101-148.
- Py-Daniel, V.; Coscarón, S. 2001. Simuliidae (Diptera: Culicomorpha) no Brasil. III. Sobre o *Coscaroniellum ulyssesi* sp. n. *Entomologia y Vectores*, 8(1): 51-64.
- Py-Daniel, V.; Passos, M.C.V.; Medeiros, J.F. Andrezza, R. 1999. Dinâmica da atividade hematofágica (Preferências horárias- Tópicas) e estado reprodutivo das fêmeas de *Thyrsopelma guianense* (Wise, 1911) (Diptera, Culicomorpha, Simuliidae), principal vetor da filaria *Onchocerca volvulus* (Leuckart, 1893) no Brasil. *Entomologia y vectores*, 6(4): 339-360.
- Rafael, M.S. 2001. *Mapeamento físico dos genes ribossomais e hsp70 em cromossomos politênicos e mitóticos de Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi Root, 1926 e Anopheles (N.) nuneztovari Gabaldón, 1940 (Diptera, Culicidae), Amazônia, Brasil*. Tese de Doutorado. Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia/ Universidade Federal do Amazonas. Manaus, Amazonas, Brasil. 108p.
- Ramírez-Pérez, J. 1985. Vectores de la oncocercosis humana en la region neotropical. *Boletim de la Oficina Sanitaria Panamericana*, 98(2): 117-135.
- Rey, L. 1973. Parasitologia. Editora Guanabarra, Rio de Janeiro. 681p.
- Rios-Velásquez, C.; Hamada, N.; Adler, P.H. 2002. Cytotaxonomy of *Simulium goeldii* Cerqueira & Nunes De Mello and *Simulium ulyssesi* (Py- Daniel & Coscarón) (Diptera: Simuliidae) in Central Amazônia, Brazil. *Insect Systematics and Evolution*, 33(1):113-120.
- Rothfels, K.H.; Feraday, R.; Kaneps, A. 1977. A cytological description of sibling species of *Simulium venustum* and *S. verecundum* with standard maps for the subgenus *Simulium* Davies (Diptera). *Canadian Journal Zoology*, 56: 1110-1128.

- Rothfels, K.H. 1979. Cytotaxonomy of blackflies (Simuliidae). *Annual Review of Entomology*, 24: 507-539.
- Rothfels, K.H. 1981. Cytological approaches to the study of blackflies systematics and evolution. In: Stock, M.W. (ed.). Application of genetics and cytological in insects systematics and evolutions. *Proc. Symp. Natl. Meeting of the Entomological Soc. of Amer.* Univ. of Idaho, Moscow, 152 p.
- Rothfels, K.H. 1987. Cytological approaches to Black fly taxonomy. p.39-52. In: Kim, K. C.; Merritt, R.W. (eds.). *Black flies- Ecology, Population, management and Annotated world list*. Pennsylvania State University, University Park and London, USA. 528p.
- Rothfels, K.; Dunbar, R.W. 1953. The salivary gland chromosomes of the black fly *Simulium vittatum* Zett. *Canadian Journal Zoology*, 31: 226-241.
- Ruas Neto, A.L.; Caldas, E.P.; Souza, M.A.T. 1984. Programa estadual de controle de borrachudos: controle dos simulídeos no Rio Grande do sul, aspectos gerais. *Boletim da Saúde*, 11(2): 4-7.
- Rubtsov, I.A. 1974. Evolution, Phylogeny and Classification of the Family Simuliidae (Diptera) Trudy Zoologicheskogo. Instituta- Akademyia Nauk USSR, 53: 230-281.
- Sá, M.R.; Maia-Herzog, M. 2002. Dengue? Aguardem a epidemia de oncocercose. Disponível em: <<http://www.insightnet.com.br/inteligencia/num16/m0516.htm>>. Acesso em: 04/12/2002.
- Shelley, A.J. 1988. Biosystematics and medical importance of the *Simulium amazonicum* group and the *Simulium exiguum* complex in Latin America. pp. 37: 203-220. In: Stock, M.W. (ed.). *Service Biosystematics of Haematophagous Insects*. Systematics Association Special. Clarendon Press, Oxford.

- Shelley, A.J. 2002. Human onchocerciasis in Brazil: an overview. *Cadernos De Saúde Pública*, 18(5): 1167- 1177.
- Shelley, A.J.; Lowry, C.A.; Maia- Herzog, M.; Luna-Dias, A.P.A.; Moraes, M.A.P. 1997. Biosystematic studies on the Simuliidae (Diptera) of the Amazonia onchocerciasis focus of Brazil. *Bulletin of the British Museum (National History)- Entomology Series*, 66: 1-21.
- Souza, M.A.T. 1984. Atendimento médico por picadas de Simulídeos. *Boletim Da Saúde*, 11(2):8-11.
- Tang, J.; Toè, L.; Back, C.; Zimmerman, P.A.; Pruess, K.; Unnasch, T.R. 1995. The *Simulium damnosum* species complex: phylogenetic analysis and molecular identification based upon mitochondrially encoded gene sequences. *Insect Molecular Biology*, 4(2): 79-88.
- Tang, J.; Toè, L.; Back, C.; Unnasch, T.R. 1996. Intra-specific Heterogeneity of the rDNA Internal Transcribed Spacer in the *Simulium damnosum* (Diptera: Simuliidae) Complex. *Molecular Biology and Evolution*, 13(1): 244-252.
- Vivas-Martínez, S.; Basáñez, M.G.; Grillet, M.G.; Weiss, H.; Botto, C.; García, M.; Villamizar, N.J.; Chavasse, D.C. 1998. Onchocerciasis in the Amazonian focus of Southern Venezuela: altitude and blackfly species composition as predictors of endemicity to select communities for ivermectin control programmes. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene*, 92: 613-620.
- Wilson, M.D.; Post, R.J. 1994. Integration of Morphometric, Cytogenetic and Molecular Techniques: A Case Study of *Simulium damnosum*. p. 215-224. In: Hawksworth, D.L. (ed.). *The identification and Characterization of Pest Organisms*. Wallingford: CAB International.

3.3 Coleta e fixação dos exemplares.....	16
3.4 Obtenção dos cromossomos politênicos.....	16
3.4.1 <i>Técnicas de Coloração</i>	18
3.4.2 <i>Preparação das lâminas</i>	19
3.4.3 <i>Construção do mapa cromossômico</i>	21
3.4.4 <i>Nomenclatura dos cromossomos politênicos</i>	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5. CONCLUSÃO.....	39
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40