

QL523
R4S353



UNIVERSIDAD
DE LOS ANDES
MÉRIDA VENEZUELA

Universidad de Los Andes
Centro de Microscopía Electrónica, Facultad de Medicina
Postgrado en Ciencias Médicas Fundamentales

**EL COMPORTAMIENTO PREDADOR EN EL GÉNERO *BELMINUS*: IMPLICACIONES
PARA LA SUBFAMILIA TRIATOMINAE.**

CLAUDIA MAGALY SANDOVAL

Mérida 2013

**EL COMPORTAMIENTO PREDADOR EN EL GÉNERO *BELMINUS*: IMPLICACIONES
PARA LA SUBFAMILIA TRIATOMINAE.**

Trabajo presentado por MSc. Claudia Magaly Sandoval. E. 84.405.845. No. pasaporte colombiano 63.502.051. Ante el Consejo de la Facultad de Medicina de la Universidad de Los Andes, como requisito parcial exigido por el Postgrado en Ciencias Médicas Fundamentales de la Universidad de Los Andes, para optar al título de Doctor en Ciencias Médicas Fundamentales.

Bajo la tutoría de la Dra. ELSA NIEVES

Autor: MSc. Claudia Magaly Sandoval

Tutor: Dra. Elsa Nieves, Laboratorio de Parasitología Experimental, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

Asesores:

Dr. Jorge Rabinovich, Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores, La Plata, Argentina (Análisis de tablas de vida).

Dr. Elis Aldana, Laboratorio Herman Lent, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela (Análisis de la plasticidad fenotípica y estudio de la morfología de los huevos).

Dra. Silvia Catalá, Laboratorio Chagas, CRILAR, Centro Regional de Investigaciones Científicas y Transferencia Tecnológica (CRILAR), Anillaco-La Rioja, Argentina (Análisis del fenotipo antenal).

Dr. Fernando A Monteiro, Departamento de Medicina Tropical, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil (Obtención de secuencias de 28SD2 y citocromo b).

Dr. Ascanio Rojas. Centro de Cálculo, Universidad de los Andes, CECALCULA, Mérida, Venezuela. (Análisis filogenético)

Publicaciones:

SANDOVAL CM, MEDONE P, NIEVES E, JAIMES DA, ORTIZ N, RABINOVICH J. Demographic fitness of *Belminus ferroae* (Hemiptera: Triatominae) on three different hosts under laboratory conditions. EN PRENSA *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 108(7): 000-000, November 2013

SANDOVAL CM, NIEVES E, ANGULO V, ALDANA E 2011. Description of the cave organ in three species of the genus *Belminus* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) by optical and scanning electron microscopy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106(6): 769-772.

SANDOVAL CM, NIEVES E, ANGULO V, ROSA ARISTEU, ALDANA E. 2011. Morphology of the eggs of the genus *Belminus* (Hemiptera: Reduviidae: (Triatominae) by optical and scanning electron microscopy. *Zootaxa* 2970: 33–40.

Presentaciones en congresos:

Fenotipo de las antenas en tres especies del género *Belminus* (Hemiptera: Triatominae)". XIV Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical y X Simposio PECET, Medellín, Colombia, 2009.

Tipos morfológicos de sensilia en la antena de *B. herreri* y *B. ferroae*. Jornadas Venezolanas de Microbiología "Dra. Beatriz Nieves Blanco". Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela, 2009.

Estudio sobre el género *Belminus* (Hemiptera: Triatominae). XIV Encuentro anual del grupo Arthromint. Ilha Grande, Rio de Janeiro, Brasil, 2010.

Plasticidad fenotípica en la morfología del ala en *B. ferroae* (Hemiptera: Triatominae) en relación con el hospedador. LXII convención Anual de Asovac, Caracas, 2012.

Financiamiento

Proyectos:

Estudio de aspectos biofisiológicos y morfológicos en *Belminus ferroae* y su significancia en la evolución de la hematofagia en la subfamilia Triatominae. **No. C-1605-0803-A. 2008** CONSEJO DE DESARROLLO CIENTIFICO HUMANISTICO Y TECNOLOGICO, ULA, MÉRIDA. Responsable: Dra. Elsa Nieves-ULA.

Ciclo de vida de *Belminus ferroae* y estudio morfológico de los adultos por microscopía electrónica de barrido. **No. C-1605-0803-ED. 2008.** CONSEJO DE DESARROLLO CIENTIFICO HUMANÍSTICO Y TECNOLÓGICO, ULA, MÉRIDA. Responsable: Dra. Elsa Nieves-ULA.

Beca y pasantía de investigación a estudiante de postgrado. **No. L-C-18-08-04. 2008.** LOCTI Responsable Dra. Elsa Nieves-ULA. Empresa Aportante: Lácteos ANDIMERCA

Estudio de infestaciones domiciliarias por especies de *Belminus* en la frontera colombo-venezolana: Implicación como vectores de la Enfermedad de Chagas y en la definición de la subfamilia Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). **No. 2829. 2011.** FONACIT. Ministerio del Poder Popular para la Ciencia, la Tecnología e Industrias Intermedias. Responsable: Claudia Magaly Sandoval.

Dedicatoria

A Claudia Fernanda mi hija, a Saira y Susi mis hermanas, a María mi madre, a las tías Teresa, Paulina y Francisca, y a las abuelas Anita y Eva. A todas esas vidas entrelazadas, algunas recientemente apagadas, pero que con sus diversos tonos y colores impregnaron la mía.

www.bdigital.ula.ve

Macondo era ya un pavoroso remolino de polvo y escombros centrifugado por la cólera del huracán bíblico, cuando Aureliano saltó once páginas para no perder el tiempo en hechos demasiado conocidos, y empezó a descifrar el instante que estaba viviendo, descifrándolo a medida que lo vivía, profetizándose a sí mismo en el acto de descifrar la última página de los pergaminos, como si se estuviera viendo en un espejo hablado. Entonces dio otro salto para anticiparse a las predicciones y averiguar la fecha y las circunstancias de su muerte. Sin embargo, antes de llegar al verso final ya había comprendido que no saldría jamás de ese cuarto, pues estaba previsto que la ciudad de los espejos (o los espejismos) sería arrasada por el viento y desterrada de la memoria de los hombres en el instante en que Aureliano Babilonia acabara de descifrar los pergaminos, y que todo lo escrito en ellos era irreplicable desde siempre y para siempre porque las estirpes condenadas a cien años de soledad no tenían una segunda oportunidad sobre la tierra.

Gabriel García Márquez, **Cien años de Soledad**

www.bdigital.ula.ve

Cuántas palabras, cuántas nomenclaturas para un mismo desconcierto. A veces me convezó de que la estupidez se llama triángulo, de que ocho por ocho es la locura o un perro.

Julio Cortázar, Rayuela

vii

Atribución - No Comercial - Compartir Igual 3.0 Venezuela
(CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Agradecimientos

A Elsa Nieves, por aceptarme en su laboratorio, darme su respaldo y asumir el reto de dirigir este trabajo.

A Elis Aldana, por su amistad, y las tantas conversaciones y enseñanzas, que guiaron y dieron luz a esta tesis.

A Jorge Rabinovich y a Paula Medone, quienes además del aporte indiscutible en el análisis demográfico y la formación que adquirí durante el desarrollo de ese capítulo, agradezco la calidez humana y la motivación con la cual siempre estuvo impregnado el trabajo en sus diferentes etapas.

A Reinaldo Gutiérrez Marín, por su trabajo e inquebrantable amistad de tantos años, que fueron fundamentales no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino en los trabajos que la precedieron y que marcaron la ruta.

A Diego Alexander Jaimes y a Nelci, por su amistad e invaluable trabajo y entusiasmo, que sin duda ayudaron a sacar a flote esta tesis.

A Rocío Cárdenas por mantenerse cerca, solidaria y siempre con un buen apunte que a cualquiera hace sentir más liviano.

A Eulides Pabón y Omar Rodríguez, técnicos de Enfermedades Transmitidas por Vectores, ETV, de la Secretaría de Salud de Norte de Santander, Cúcuta, Colombia, por su compañía y respaldo en las labores de campo.

A Patricia Cuervo, por su cariño, compañía y solidaridad tan oportunos y necesarios en Río.

A Fernando Monteiro, y su equipo de trabajo, Karina, José y Marcio, con quienes además de la rutina de la biología molecular, compartí muy gratos momentos en Río.

A Cleber Galvão, quien siempre ha estado dispuesto a brindarme su apoyo en los diversos trabajos con los *Belminus*.

João Aristeu de la Rosa, por su colaboración en los análisis de microscopía electrónica de barrido.

A Victor Angulo y Lida Esteban del CINTROP-UIS por facilitar material biológico de las especies *B. corredori* y *B. herreri*

A Silvia Catalá, David Gorla, Laura, Ivanna y Luciana del CRILAR, quienes en el apacible y recóndito Anillaco, con su ejemplo de perseverancia en el trabajo con las vinchucas, me motivaron cada día a no desfallecer en este intento. Al personal de la CNEA, Pancho, Pablo, Aldo y Américo, quienes al compás de hermosas chacareras hicieron amenos mis días en Anillaco.

A Ascanio Rojas por ayudarme a transitar entre los árboles.

A Fernando Otálora quien revisó y enriqueció con sus comentarios y observaciones la tesis. A todo el personal del IVIC, Mérida por la amistad y el apoyo brindado durante el desarrollo de este trabajo.

A Yesenia Sánchez por su compañía y los lazos de amistad que se entretejieron en el LAPEX a través de las interminables horas de corridas electroforéticas.

Al personal del LAPEX (Sonia, Maritza y la profe Maritza), por el apoyo brindado durante estos años.

Al chino Scorza y a Laurita, por todo lo que ha significado la amistad entre nuestros hogares.

A la profesora Milagros Oviedo, por su cariño y amistad incondicional.

A Alcedo Mora, por acogernos en su hogar durante nuestra llegada a Mérida, y por todo el cariño que nos ha brindado desde entonces.

A las familias de las comunidades de Santa Catalina y San Alberto de Toledo Norte de Santander que nos permitieron ingresar a sus hogares y siempre nos recibieron con una sonrisa.

A Milton Prada, mi compañero de vida, quien me animó a aventurme como en otras tantas ocasiones, y con su complicidad y paciencia logré llegar a la orilla.

www.bdigital.ula.ve

Resumen

Los insectos de la subfamilia Triatominae son ampliamente reconocidos por su papel como vectores del parásito *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas. La principal característica biológica que define a esta subfamilia, es su obligado comportamiento hematofágico. Sin embargo, diversos trabajos en especies de *Belminus* vienen señalando de manera reiterada el hábito predador en este género. Debido a este peculiar comportamiento, el presente estudio se propuso como objetivos: i. Determinar en condiciones de laboratorio, algunos parámetros demográficos y reproductivos en *B. ferroae* alimentado con tres diferentes hospedadores (roedor, cucarachas y *Rhodnius prolixus*) y estimar el *fitness* (r_0) con cada uno, a fin de identificar el hospedador natural de esta especie; ii. Analizar la plasticidad fenotípica en *B. ferroae* relacionada con el hospedador, e incriminar por esta vía, el principal hospedador dentro de los domicilios con la técnica de la morfometría geométrica; iii. Ampliar el estudio morfológico de *B. corredori*, *B. herreri* y *B. ferroae*, a través del análisis del fenotipo antenal y del exocorión del huevo; iv. Probar la hipótesis que sugiere que las especies de *Belminus* podrían ser un linaje de Reduviidae en un estado temprano de adaptación a la hematofagia, esto a través de las reconstrucciones filogenéticas de la subfamilia con dos marcadores moleculares (28SD2 y el citocromo b) y el método de máxima verosimilitud. Los resultados de esta tesis revelan que los artrópodos (cucarachas), son los principales hospedadores naturales de *B. ferroae*, basados en un mayor *fitness* demográfico (r_0) respecto a un hospedador vertebrado (roedor); además, se demuestra por primera vez la existencia de un Triatominae, sin un comportamiento hematofágico obligado. El análisis morfométrico de la variación en la conformación alar, permitió identificar un fenotipo relacionado con el hospedador e incriminar a las cucarachas como la principal fuente de alimento utilizada por *B. ferroae* dentro de los domicilios. Los estudios morfológicos también permitieron una apropiada reclasificación de los individuos a su especie y mostraron una mayor similaridad de estas especies con Triatomini, esto último mantiene correspondencia con los resultados del estudio filogenético. Ambos análisis filogenéticos fueron consistentes en recuperar al género *Belminus* anidado dentro de Triatominae. La tribu Bolboderini no fue recuperada con el marcador 28SD2. Finalmente, este trabajo señala el inconveniente taxonómico que representa la existencia en la subfamilia de una especie con un comportamiento principalmente predador y apunta hacia la necesidad de ampliar la definición de los Triatominae propuesta por Lent & Wygodzinsky (1979).

Palabras clave: *Belminus*, Triatominae, demografía, *fitness*, predación, hematofagia, taxonomía.

Abstract

Triatominae are widely recognized for their role as vectors of the parasite *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. One of the main biological characteristics of this subfamily is their obligate haematophagous condition. However, several works in *Belminus* species showed the behavior predator of this genus. Due to this peculiar behaviour, the aims of this study were: i. To determine several demographic and reproductive parameters of *B. ferroae* fed on three different hosts (mice, cockroaches and *Rhodnius prolixus*) and relate *B. ferroae* fitness (as measured by r_0) to the natural hosts; ii. Analyze plasticity phenotypic related to the host in *B. ferroae* and to incriminate the main host of *B. ferroae* inside the domiciles by means of the morphometric geometric technique; iii. Extend morphological analysis in *B. corredori*, *B. herreri* and *B. ferroae*, through antennal phenotype and the eggs study. Lastly, the hypothesis that suggests *Belminus* species as a Reduviidae lineage at an early stage of adaptation to haematophagy was also tested, carrying out phylogenetics reconstructions with molecular data (28SD2 and cob b) and the maximum likelihood method. The present study revealed a higher demographic fitness related to the cockroach, supporting the idea that these arthropods are the main natural host of *B. ferroae* and showed for the first time the existence of a Triatominae species without obliged bloodsucking behavior. Morphometrics analyses of shape variation allowed to incriminate cockroaches like the main food source used by *B. ferroae* inside the domiciles. Morphological studies allowed appropriate reclassification of individuals to their putative species and higher similarity from this species with Triatomini. Both phylogenetics analyses were consistently recovered the *Belminus* genus as nested within Triatominae, but not for Bolboderini tribe. Finally, this work shows the taxonomic problem that represents the existence of a species with a mainly predator behavior in the subfamily and would point toward the need for a broader definition of the Triatominae proposed by Lent & Wygodzinsky (1979).

Key words: *Belminus*, Triatominae, demography, fitness, predator, hematophagy, taxonomy

Tabla de contenido

Dedicatoria	vi
Agradecimientos.....	viii
Resumen	x
Abstract	xi
Índice de Tablas.....	xixvii
Índice de Figuras	xix
Capítulo I . Consideraciones generales sobre la biología, la ecología y la evolución de los Triatominae..	
.....	1
1. Introducción	1
2. Biología e importancia de los Triatominae	2
3. Origen de la subfamilia Triatominae	6
4. ¿Cuándo surgieron los Triatominae, son antiguos o recientes?	9
5. Hospedadores invertebrados de los Triatominae	11
6. Biología y Taxonomía del género <i>Belminus</i> (Reduviidae: Triatominae).....	12
6.1 Comportamiento alimentario en el género <i>Belminus</i>	15
7. Justificación y planteamiento del problema	17
8. Referencias	19
Capítulo II. Estudio de los aspectos demográficos y reproductivos en la especie <i>B. ferroae</i> con tres hospedadores (cucaracha, roedor y un Triatominae, <i>R. prolixus</i>), bajo condiciones de laboratorio.....	25
1. Introducción	25
2. Consideraciones generales del análisis de las tablas de vida	26
3. Objetivo general	29
4. Objetivos específicos.....	29
5. Materiales y métodos	29
5.1 Origen de las cohortes	29
5.2 Procedimientos experimentales.....	29
5.3 Análisis estadísticos.....	31
6. Resultados	33

6.1 Estadísticos vitales y reproductivos.....	33
6.2 Parámetros de crecimiento poblacional.....	39
7. Discusión.....	42
8. Referencias.....	46
Capítulo III. Análisis de la plasticidad fenotípica alar en <i>B. ferroae</i> alimentada con dos potenciales hospedadores: un artrópodo (<i>Blaberus</i> sp.) y un vertebrado (<i>Mus musculus</i>).	52
1. Plasticidad fenotípica	52
1.2 Estudio de la plasticidad fenotípica en Triatominae en diversos contextos ecológicos.....	53
1.3 Estudio de la plasticidad fenotípica de los Triatominae en condiciones de laboratorio	54
1.4 Uso potencial del análisis de la plasticidad fenotípica en <i>B. ferroae</i> para predecir el principal hospedador en los domicilios	54
2. Importancia de la morfometría geométrica en el análisis de la variación morfológica	55
2.1 Consideraciones generales de la morfometría geométrica	56
2.1.1 El Tamaño	56
2.1.2 La Conformación.....	56
2.1.3 La Alometría	58
3. Objetivo general	58
4. Objetivos específicos.....	58
5. Materiales y Métodos	59
5.1 Origen de la población.....	59
5.2 Procedimientos experimentales.....	59
5.2.1 Mantenimiento de los parentales.....	59
5.2.2 Mantenimiento de los grupos experimentales.....	60
5.2.3 Montaje de alas para el análisis de la variación fenotípica alar	61
5.2.4 Captura y digitalización de imágenes.....	62
5.2.5 Análisis estadístico	63
6. Resultados	65
6.1 Estimación del error para la variable tamaño centroide entre diferentes sesiones fotográficas.....	65
6.2 Análisis del tamaño centroide	66
6.3 Análisis de la Conformación alar	74

6.3.1	Análisis de la conformación alar en los machos de <i>B. ferroae</i>	80
6.3.2	Análisis del efecto alométrico en la conformación alar	85
6.3.3	Visualización de los cambios de la conformación entre pares de configuraciones.....	88
7.	Discusión	91
7.1	El tamaño alar.....	91
7.2	La conformación alar.....	95
8.	Conclusiones.....	99
9.	Referencias.....	99
Capítulo IV. Ampliación del análisis morfológico en <i>B. corredori</i> , <i>B. ferroae</i> y <i>B. herreri</i> y la evaluación de sus estatus taxonómicos.		109
1.	Introducción	109
1.1	El fenotipo antenal en los Triatominae.....	110
1.1.1	Morfología de la antena en Triatominae	110
1.1.2	Tipos de sensilia presentes en las antenas de los Triatominae	111
1.1.3	Importancia del estudio del fenotipo antenal en los Triatominae (Hemiptera: Reduviidae).....	113
1.2	La morfología del huevo y la importancia de su estudio en Triatominae	115
1.3	Utilidad del citocromo b en el estudio de la Sistemática en Triatominae	118
2.	Objetivo general	118
3.	Objetivos específicos.....	118
4.	Materiales y métodos	119
4.1	Material biológico utilizado en el análisis morfológico de la antena.....	119
4.2	Material biológico utilizado en el análisis morfológico de los huevos	120
4.3	Material biológico utilizado para la obtención de las secuencias de ADN del citocromo b	120
4.4	Procedimientos experimentales.....	121
4.4.1	Análisis de receptores antenales por microscopía óptica y electrónica de barrido	121
4.4.2	Preparación de los huevos para el análisis morfológico.....	122
4.4.3	Procedimiento para la obtención de secuencias de ADN del citocromo b.....	123
4.5	Análisis estadístico	125
5.	Resultados	126
5.1	Antenas.....	126

5.1.1 Características generales de la antena	126
5.1.2 Tipos morfológicos de sensilia identificados por MEB	127
5.1.3 Fenotipo antenal	130
5.4 Huevos	136
5.4.2 Aspectos macroscópicos	136
5.4.3 Aspectos microscópicos	137
5.4.4 Resultados del análisis filogenético a través del citocromo b	143
6 Discusión	147
6.1 Antenas	147
6.1.1 Cambios en el fenotipo antenal durante el desarrollo	148
6.2 Huevos	149
6.3 Análisis de secuencias del citocromo b	152
7 Conclusiones	153
8 Referencias	153
Capítulo V. ¿Son los <i>Belminus</i> un taxón válido de los Triatominae? Una aproximación a través de la reconstrucción filogenética de la subfamilia con dos marcadores moleculares (28SD2 y citocromo b)....	162
1. Introducción	162
2. Objetivo general	163
3. Objetivos específicos	163
4. Materiales y Métodos	163
4.1 Material biológico utilizado para la obtención de las secuencias de ADN de la subunidad ribosomal 28SD2	163
4.2 Extracción ADN	164
4.3 Amplificación ADN por reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)	164
4.4 Purificación del ADN	165
4.5 Secuenciamiento de ADN	165
4.6 Alineamiento de las secuencias ADN de la subunidad ribosomal 28SD2 y Citocromo b	166
4.7 Análisis filogenéticos utilizando el marcador 28SD2 y el citocromo b	166
5. Resultados	167

6.	Discusión	173
7.	Conclusiones	176
8.	Referencias	177
	Capítulo VI. Discusión general	180
1.	Referencias	183
	Anexos (Publicaciones).....	185

www.bdigital.ula.ve

Índice de Tablas

Tabla 1. Clasificación de los Triatominae (Hemiptera: Reduviidae)	3
Tabla 2. Nombre, definición, símbolos y fórmulas de los parámetros poblaciones.....	32
Tabla 3. Estadísticos vitales de <i>B. ferroae</i> alimentado con tres diferentes hospedadores.....	35
Tabla 4. Parámetros reproductivos de <i>B. ferroae</i> alimentado con tres diferentes hospedadores	36
Tabla 5. Parámetros de crecimiento poblacional estimados en <i>B. ferroae</i> alimentada con tres diferentes hospedadores	40
Tabla 6. Tamaño de muestra, media y desviación estándar del tamaño centroide en cada grupo de estudio y discriminado por sexo	67
Tabla 7. Comparación del tamaño centroide entre los parentales y la progenie de <i>B. ferroae</i> alimentada por hemolinfagia (cucaracha) y hematofagia (roedor) en laboratorio.....	68
Tabla 8. Comparación del tamaño centroide entre generaciones contemporáneas de <i>B. ferroae</i> criada en laboratorio y alimentada por hemolinfagia (cucaracha) o hematofagia (roedor)	69
Tabla 9. Comparación del tamaño centroide entre las generaciones contemporáneas alimentadas exclusivamente con un hospedador en laboratorio cucaracha o hematofagia.....	70
Tabla 10. Distancias de Mahalanobis entre los fenotipos de conformación alar de las hembras criadas en laboratorio (hemolinfagia o hematofagia) y las hembras parentales obtenidas mediante ACV ..	77
Tabla 11. Distancias de Mahalanobis entre los fenotipos de conformación alar de hembras criadas en laboratorio (hemolinfagia vs. hematofagia)	78
Tabla 12. Distancias de Mahalanobis entre los fenotipos de conformación alar de las hembras criadas en laboratorio con un mismo hospedador.....	79

Tabla 13. Distancias de Mahalanobis entre los fenotipos de conformación alar de los machos criados en laboratorio (hemolinfagia y hematofagia) y los machos parentales	82
Tabla 14. Distancias de Mahalanobis entre los fenotipos de conformación alar de los machos criados en laboratorio (hemolinfagia vs. hematofagia).....	83
Tabla 15. Distancias de Mahalanobis entre los fenotipos de conformación alar de los machos criados en laboratorio con un mismo hospedador.....	84
Tabla 16. Tipos de sensilia registradas en las antenas en Triatominae	114
Tabla 17. Región geográfica de origen, hábitat y número de especímenes del género <i>Belminus</i> utilizados en el análisis del fenotipo antenal	120
Tabla 18. Promedio y desviación estándar del número de sensilia por segmento y tipo de receptor.....	131
Tabla 19. Promedio y desviación estándar del número de sensilia por segmento y tipo de receptor en la antena de los machos y las hembras de <i>B. herreri</i> , <i>B. corredori</i> y <i>B. ferroae</i>	132
Tabla 20. Distancias de Mahalanobis entre especies (por sexo) después de ejecutar el análisis discriminante	135
Tabla 21. Promedio, desviación estándar y coeficiente de variación del tamaño de los huevos medidos en milímetros y número de aerópilos y micrópilos en las especies <i>B. corredori</i> , <i>B. herreri</i> y <i>B. ferroae</i>	137
Tabla 22. Promedio y desviación estándar del número de celdas poligonales presentes en el borde del opérculo de las especies <i>B. corredori</i> , <i>B. herreri</i> y <i>B. ferroae</i>	142
Tabla 23. Sitios variables para un fragmento de 537 pares de bases del gen de <i>citocromo b</i> observados en ocho haplotipos encontrados en 33 secuencias del género <i>Belminus</i>	144
Tabla 24. Fuente y números de acceso para las secuencias de 28SD2 y citocromo b utilizadas en este estudio	168

Índice de Figuras

Figura 1. Mapa de la distribución de casos humanos de infección por <i>Trypanosoma cruzi</i> , basados en estimaciones oficiales y en el estatus de transmisión vectorial.....	4
Figura 2. Ciclo de vida de <i>R. prolixus</i> mostrando los diferentes estadios.....	5
Figura 3. <i>Panstrongylus geniculatus</i> alimentándose por hemolinfagia en un Lepidoptera Saturniidae <i>Eacles</i> sp.....	11
Figura 4. Mapa de la distribución geográfica del género <i>Belminus</i> (Hemiptera: Triatominae).....	13
Figura 5. Fotografías de las ocho especies que conforman el género <i>Belminus</i> (Hemiptera: Triatominae).....	14
Figura 6. Registro fotográfico de los comportamientos alimentarios de <i>Belminus</i> spp. bajo condiciones de laboratorio.....	16
Figura 7. Supervivencia de la hembra edad - específica y fecundidad edad- específica de la hembra para <i>B. ferroae</i> alimentada con cucaracha, roedor y <i>R. prolixus</i>	37
Figura 8. Intermitencia entre posturas (semanas) para la cohorte alimentada con cucaracha, roedor y <i>R. prolixus</i>	38
Figura 9. Valores reproductivos edad - específicos para <i>B. ferroae</i> alimentada con cucaracha, roedor y <i>R. prolixus</i>	41
Figura 10. Distribución estable de las edades para las diferentes cohortes de <i>B. ferroae</i> alimentadas con cucaracha, roedor y <i>R. prolixus</i>	42
Figura 11. Condiciones de cría de <i>B. ferroae</i> en laboratorio	61
Figura 12. Montaje en lámina de las alas de <i>B. ferroae</i>	62
Figura 13. Puntos anatómicos de referencia (PAR) tipo I, digitalizados en el ala izquierda para el análisis de tamaño y conformación en <i>B. ferroae</i>	63
Figura 14. Media, error estándar y desviación estándar del tamaño centroide en las hembras	71
Figura 15. Media, error estándar y desviación estándar del tamaño centroide en los machos	72

Figura 16. Dimorfismo sexual. media, error estándar y desviación estándar del tamaño centroide en hembras y machos	73
Figura 17. Espacio de la función canónica mostrando la distribución de los fenotipos de conformación alar de las hembras en las tres generaciones de laboratorio y los parentales	76
Figura 18. Espacio de la función canónica mostrando la localización de los fenotipos de conformación alar en los machos de las seis generaciones de laboratorio y los parentales.	81
Figura 19. Efecto alométrico. Análisis de regresión entre las variables de conformación y el tamaño centroide en las hembras.	86
Figura 20. Efecto alométrico. Análisis de regresión entre las variables de conformación y el tamaño centroide en los machos	87
Figura 21. Visualización de la deformación de la conformación alar en las hembras a través de los gráficos “soft wireframes”.....	89
Figura 22. Visualización de la conformación alar en machos por pares a través de gráficos de “soft wireframes”	90
Figura 23. Micrografía de la antena de <i>B. ferroae</i> (Hemiptera: Triatominae) mostrando los diferentes segmentos	111
Figura 24. Representación esquemática de un huevo en los Triatominae	116
Figura 25. Fotografía de gel de agarosa mostrando la amplificación de un fragmento de 537 pb del citocromo b.....	124
Figura 26. Fenotipo Antenal de <i>Belminus</i> spp.	128
Figura 27. Fenotipo antenal de ninfas de V estadio. Flagelo I.....	129
Figura 28. Análisis de componentes principales (ACP)	134
Figura 29. Análisis discriminante ejecutado con cuatro variables de la antena en adultos hembras	135
Figura 30. Huevos de <i>Belminus</i> sp.	136
Figura 31. Lámina 1	139
Figura 32. Lámina 2	140
Figura 33. El Análisis discriminante ejecutado con tres variables del opérculo en <i>B. herreri</i> (1), <i>B. ferroae</i> (2) y <i>B. corredori</i> (3)	142

Figura 34. Árbol filogenético con 33 secuencias de citocromo b, usando el método de Neighbor Joining	145
Figura 35. Árbol filogenético con 33 secuencias de citocromo b, usando el método de Máxima Verosimilitud.....	146
Figura 36. Fotografía de un gel de agarosa mostrando la amplificación de un fragmento de aproximadamente 640pb de 28SD2	165
Figura 37. Filogenia de la subfamilia Triatominae con el marcador nuclear 28SD2 por el método de máxima verosimilitud (LN=-5668,3926) y 1000 bootstrap.....	171
Figura 38. Filogenia de la subfamilia Triatominae con el citocromo b por el método de máxima verosimilitud (LN= -6077.41525) bajo el modelo HKY85 y 100 bootstrap.....	172

www.bdigital.ula.ve

Capítulo 1. Consideraciones generales sobre la biología, la ecología y la evolución de los Triatominae

1. Introducción

Los Hemiptera son un linaje de insectos bastante antiguo con fósiles conocidos desde el Pérmico (Grimaldi & Ingles 2005). Es un grupo monofilético basado en la estructura de sus partes bucales que se caracteriza por un labio que encierra los estiletes maxilares y mandibulares. De este orden existen aproximadamente 82.000 especies descritas y comprende tres infraórdenes: Stenorrhyncha, Auchenorrhyncha y Heteropteroidea, éste último contiene el clado Coleorrhyncha + Heteroptera (Forero 2008).

Heteroptera alberga más de 40.000 especies descritas y se define por las siguientes sinapomorfias: la presencia de gula, la presencia de glándulas metatorácicas y abdominales y una fuerte reducción del tentorium (Forero 2008). Miembros de este grupo muestran un amplio rango de adaptaciones a diversos hábitats y estrategias de historia de vida, que incluye la fitofagia, la predación y la hematofagia (Weirauch & Schuh 2011). Sin embargo, en sólo tres familias de Heteroptera (Cimicidae, Polytetidae y Reduviidae) se desarrolló el hábito hematofágico como estrategia adaptativa. Los Cimicidae conocidos comúnmente como “chinchas de cama” son un taxón altamente especializado que se alimenta principalmente de sangre de humanos, aves, roedores y murciélagos (Reinhardt & Siva-Jothy 2007). Los Polytetidae son hematófagos obligados y permanentes de murciélagos (Dick et al. 2009). Por último, los Reduviidae son el clado de heterópteros que contiene el mayor número de especies depredadoras de artrópodos, con 25 subfamilias reconocidas y aproximadamente 6.800 especies descritas; actualmente se reconocen fósiles de esta familia de los períodos Jurásico y Cretácico (Hwang & Weirauch 2012). Dentro de la familia Reduviidae, los Triatominae forman una subfamilia distintiva que agrupa a insectos hematófagos, que se alimentan de diversos vertebrados nidificadores entre los que se puede incluir al humano (Gorla et al. 1997).

2. Biología e importancia de los Triatominae

Los Triatominae están definidos por el hábito hematófago obligado y las adaptaciones morfológicas asociadas (Lent & Wygodzinsky 1979). Este grupo de insectos se distribuye principalmente en América, desde EEUU hasta la Argentina, con unas pocas especies en Asia, África e India. Actualmente la subfamilia comprende 144 especies, organizadas en cinco tribus y quince géneros (Tabla 1). Además de la importancia ecológica dentro de los Heteroptera, su popularidad reside en que actúan como vectores del parásito *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana. Las especies de mayor importancia por el directo compromiso en el ciclo doméstico de la transmisión pertenecen a los géneros *Rhodnius*, *Triatoma* y *Panstrongylus* (Schofield & Galvão 2009, Jurberg et al. 2009, Ayala 2009, Moncayo & Silveira 2010, Rosa et al. 2012).

La principal ruta de la transmisión del parásito *T. cruzi* es la vectorial, la cual ocurre cuando las personas entran en contacto con heces de triatominos infectadas y se considera a esta vía como la responsable del 80% de los casos en el mundo. Otras vías identificadas son la transfusión de sangre infectada, el trasplante de órganos, la transmisión oral por alimentos contaminados, la transmisión congénita y los accidentes en los laboratorios (WHO 2010). Se estima que entre 60 y 90 millones viven en áreas de riesgo y que 10 millones de personas se encuentran infectadas con *T. cruzi* en 21 países de Latinoamérica (Figura 1). La persistencia de la enfermedad en estos países, supone un grave problema de salud pública (WHO 2010).

Tabla 1. Clasificación de los Triatominae (Hemiptera: Reduviidae)

Tribus	Géneros	Número de especies
Alberproseniini	<i>Alberprosenia</i>	2
Bolboderini	<i>Belminus</i>	8
	<i>Bolbodera</i>	1
	<i>Microtriatoma</i>	2
	<i>Parabelminus</i>	2
Cavernicolini	<i>Cavernicola</i>	2
Rhodniini	<i>Psammolestes</i>	3
	<i>Rhodnius</i>	17
Triatomini	<i>Dipetalogaster</i>	1
	<i>Eratyrus</i>	2
	<i>Hermanlenticia</i>	1
	<i>Linshcosteus</i>	6
	<i>Panstrongylus</i>	14
	<i>Paratriatoma</i>	1
	<i>Triatoma</i> ^a	81
Total	15	144

Fuentes: Schofield & Galvão, 2009; Ayala 2009; Jurberg et al., 2009; Rosa et al. 2012, Gonçalves et al. 2013. **a.** Incluye a los géneros *Meccus* (complejo *phyllosoma*), *Mepraia* (complejo *spinolai*) y *Nesotriatoma* (complejo *flavida*) reconocidos por Galvão et al. (2003).

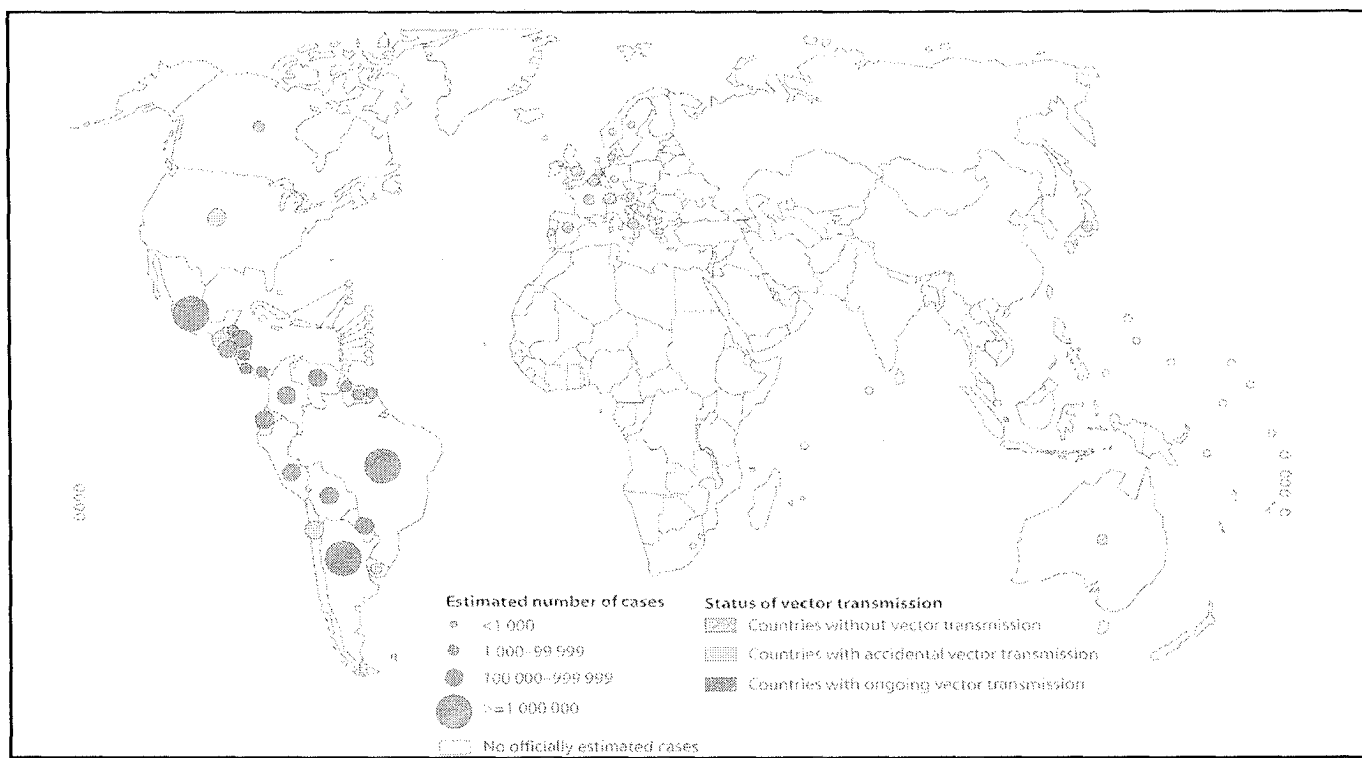


Figura 1. Mapa de la distribución de casos humanos de infección por *Trypanosoma cruzi*, basados en estimaciones oficiales y en el estatus de transmisión vectorial. Fuente: WHO 2010.

Los Triatominae presentan un ciclo de vida incompleto (hemimetábolo) compuesto por el huevo, cinco estadios ninfales y el imago (Figura 2). Las ninfas difieren, entre otros caracteres, de los adultos en que presentan sólo rudimentos alares, aparentes en los últimos estadios ninfales, y genitales no desarrolladas. Sin embargo ellas ocupan el mismo hábitat, se alimentan sobre los mismos hospedadores y son susceptibles a la infección por *T. cruzi*. En general el ciclo de vida se desarrolla en un rango de temperatura entre 20-30°C, el tiempo de duración del ciclo es variable con especies que pueden culminarlo en aproximadamente tres meses, como es el caso del género *Rhodnius* o entre seis y ocho meses para las especies de *Triatoma*. Un insecto de esta subfamilia puede tomar entre 8-9 veces su peso en sangre. Los Triatominae adoptaron comportamientos y patrones de actividad circadiana inversos a los de sus hospedadores, en consecuencia exhiben hábitos típicamente nocturnos (Lent & Wygodzinsky 1979, Noireau et al. 2009).

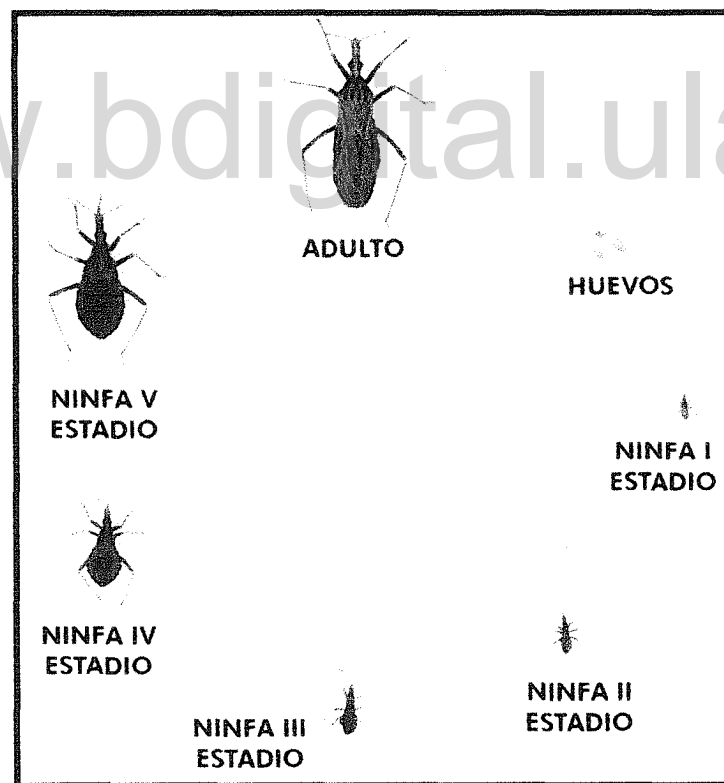


Figura 2. Ciclo de vida de *R. prolixus* mostrando los diferentes estadios

3. Origen de la subfamilia Triatominae

Se plantea que la subfamilia Triatominae evolucionó a partir de reduviideos predadores que contaban con pre-adaptaciones morfológicas, como piezas bucales picadoras, además de un comportamiento agresivo y activo para la búsqueda de la presa y eficientes enzimas digestivas que facilitaron la transición hacia la hematofagia. El comportamiento hematófago en estos insectos fue probablemente ocasional y una eventual oportunidad los llevó a una hematofagia completa a través de la continua asociación con el hospedador vertebrado (Lehane 2005). Aunque las posibles razones que motivaron el cambio hacia el comportamiento hematófago no son claras, se sugiere que fue debido a la necesidad de acumular nutrientes en cantidad suficiente para poner los huevos (Waage 1979, Lukashevich & Mostovski 2003).

Esta parte de la hipótesis sobre el origen del comportamiento hematófago es aceptada por la mayoría de la comunidad científica (Galvão 2003). Sin embargo, la actual controversia reside en si ellos derivaron de un ancestro predador en el cual evolucionó el hábito hematófago (origen monofilético) o de dos o más ancestros predadores que desarrollaron la hematofagia (origen difilético ó polifilético) (Schaefer 2005).

Usinger (1944) fue el primer autor que propuso el origen monofilético de la subfamilia, en el sentido que el hábito hematófago se originó una sola vez. Esta hipótesis fue posteriormente acogida y desarrollada por Lent & Wygodzinsky (1979), basada en tres apomorfias 1) la presencia de hábito hematófago, 2) la presencia de una conexión membranosa entre el segundo y tercer segmento rostral que permite flexionar el tercer segmento rostral y 3) la pérdida de glándulas abdominales de olor (Galvão 2003).

La hipótesis de la polifilia para los Triatominae fue propuesta por Schofield (1988). En la cual su autor expone que no solamente los Rhodniini, si no que otros géneros clasificados dentro de los Triatomini (*Dipetalogaster*, *Panstrongylus* y *Eratyrus*) pueden representar grupos no relacionados, que se originaron de diferentes reduvidos. Desde este punto de vista se recrea un escenario que es consistente con la aparente separación geográfica de los triatominos, con la ocurrencia de especies del género *Linshcosteus* y *Triatoma* en Asia, así como la ausencia de triatominos selváticos en África (Gorla et al.1997). En consecuencia, la hipótesis de polifilia explicaría de una mejor manera la distribución geográfica, las asociaciones con los hospedadores, y las actuales adaptaciones mostradas por especies y

grupos de especies a tipos particulares de hábitat. Esta hipótesis también se fundamenta teniendo en cuenta las diferencias en los parámetros poblacionales, los caracteres morfológicos (Catalá 1997), las diferencias en los componentes antihemostáticos de la saliva de Rhodniini y Triatomini (Ribeiro et al. 1998) y la diversidad entre las secuencias nucleotídicas de las dos tribus (Marcilla et al. 2001). El escenario evolutivo que se vislumbra más probable a la luz de este razonamiento es que el hábito hematófago se originó varias veces dentro de Triatominae, y en efecto la subfamilia representa un ensamble polifilético de especies, definido sobre la base de los caracteres apomórficos convergentes relacionados a la hematofagia (Hypsa et al. 2002).

En la última década numerosos estudios han explorado las relaciones filogenéticas de los Triatominae con las demás subfamilias de Reduviidae. No obstante estas permanecen controversiales. Hypsa et al. (2002) emprendieron el primer trabajo de filogenia molecular de la subfamilia, que incluyó 57 taxones de Triatominae con representantes del Nuevo y del Viejo Mundo. Además con diferentes grupos externos pertenecientes a Reduviidae y no Reduviidae. Los autores de este trabajo concluyen que la monofilia de Triatominae se soporta bien por las observaciones derivadas de su estudio. Se comprueba la parafilia de *Rhodnius* con respecto a *Psammolestes* como lo habían expuesto Lyman et al. (1999). Este hallazgo ilustró de manera clara como los cambios morfológicos y ecológicos resultan en la pérdida de los caracteres diagnósticos que se espera fuesen compartidos por los miembros de un mismo grupo monofilético. Los géneros *Panstrongylus*, *Dipetalogaster*, *Eratyrus* y las especies del clado asiático se agruparon con el género *Triatoma*. En consecuencia, los autores sugieren que al menos la hipótesis de orígenes separados de los géneros que conforman la tribu Triatomini no parece ser cierta.

Posteriormente, Paula et al. (2005) presentan la primera evidencia del origen polifilético de los Triatominae, al analizar la filogenia molecular de la subfamilia con el marcador mitocondrial 16S. Ese trabajo mostró una separación entre las tribus Rhodniini y Triatomini por varios clados predadores. Se sugiere a la subfamilia Reduviinae como grupo hermano de Triatomini y las subfamilias Salyavatinae y Harpactorinae como grupos hermanos de Rhodniini.

Subsecuentemente Weirauch (2008) en un amplio estudio cladístico basado en 162 caracteres morfológicos que contó con un total de 75 especies de varias subfamilias de Reduviidae y algunos taxones de los Triatominae aportan argumentos a favor de la hipótesis de monofilia.

Weirauch & Munro (2009) presentaron un análisis cladístico de Reduviidae que incluyó 94 taxones (89 de Reduviidae y 5 grupos externos), basado en los datos moleculares de un marcador mitocondrial (16S) y tres marcadores nucleares (18S, 28SD2, 28SD3- 5). Este estudio ofreció argumentos a favor de la hipótesis que expone que el hábito hematófago evolucionó una sola vez dentro de Triatominae.

Por su parte, Patterson & Gaunt (2010) también dieron apoyo a la hipótesis de monofilia. A través del análisis del marcador nuclear (28SD2) y los marcadores mitocondriales (*citocromo oxidasa 1 y 1-3'*, *citocromo oxidasa 2 y citocromo b*). Su trabajo incluyó en los análisis de la subfamilia, por primera vez, un representante de la tribu Bolboderini (*Microtriatoma trinidadensis*).

Más recientemente, Hwang & Weirauch (2012) a través de la reconstrucción de la filogenia de los Reduviidae con 5 marcadores moleculares y 178 taxones que representaron 18 de 25 subfamilias de los Reduviidae, no lograron recuperar la monofilia de la subfamilia, pero tampoco encontraron soporte para la hipótesis de polifilia. Por el contrario, sus resultados muestran que Triatominae es parafilético respecto a los Reduviinae del género *Opisthacidius* con alto soporte (99.62%) o que es parte de una politomía que también incluye a *Opisthacidius*. Esto último, mantiene una ambigüedad sobre la transición del estilo de vida predador al hematófago, que muestra dos escenarios con similares probabilidades: 1) el cambio a hematófago pudo haber ocurrido una vez en la base del clado Triatominae + *Opisthacidius* con una reversión al comportamiento generalista en *Opisthacidius* o 2) Triatomini y Rhodniini + Cavernicolini pudieron haber adquirido la hematófagia independientemente. Los autores llaman la atención sobre la idea de que datos adicionales son requeridos para probar las relaciones entre los clados implicados y que la discrepancia de sus resultados con estudios anteriores es explicada por el hecho de incluir en el estudio un número mayor de taxones y el carácter del muestreo de los mismos. Es pertinente mencionar aquí que previos autores como Hypsa et al. (2002), Schaefer (2003) y Patterson & Gaunt (2010) habrían asomado la posibilidad de que el origen de esta subfamilia podría incluir la hipótesis de parafilia.

Para concluir esta sección, es importante resaltar que el tema del origen de los Triatominae tiene un interés más que académico, en el caso que los triatominos tengan más de un ancestro y por tanto sean filogenéticamente distantes, hace improbable generalizar lo que se conoce de un grupo al otro. En consecuencia este hecho podría traer dificultades para el diseño y la aplicación de las estrategias de control (Schaefer 2003).

4. ¿Cuándo surgieron los Triatominae, son antiguos o recientes?

Vinculados a las hipótesis sobre el origen de cualquier taxón, subyacen varios interrogantes, el más común cuestiona sobre el período en que surgió un determinado grupo y los eventos geológicos o biogeográficos a los cuales estaría relacionado. Está por demás mencionar que los interesados en el estudio de los Triatominae no han sido ajenos a estas indagaciones.

La primera hipótesis sobre la escala de tiempo en la cual podría haber surgido los Triatominae fue propuesta por Gaunt & Miles (2002) con la aplicación de la técnica de reloj molecular. Estos autores predicen el origen de los Triatominae entre 99,8 y 93,5 millones de años (m.a), dato coincidente con la formación del continente suramericano durante el rompimiento de Gondwana (> 95 m.a). Ese estudio también hace hincapié en la correspondencia de los mega fósiles de palmas que datan de 83,3-71,3 m.a, abriendo la posibilidad de la existencia de co-evolución entre las palmas y el género *Rhodnius* o la divergencia entre Rhodniini y Triatomini, resultado de la adaptación de un género a un hábitat específico.

Posteriormente, Patterson & Gaunt (2010) hacen un análisis más completo para obtener una escala de tiempo entre los reduvidos predadores y los Triatominae, a través de la técnica de reloj molecular, con la diferencia de que fueron incluidos cinco marcadores diferentes y un número mayor de taxones de tres de las cinco tribus reconocidas de los Triatominae. Los resultados mostraron una alta coincidencia entre los cinco loci utilizados. El tiempo de divergencia entre Reduviinae (*Zelus* spp. y *Opisthacidius* spp.) y Triatominae se calculó entre 110-107 m.a. Estos dos taxones predadores están restringidos al continente suramericano y por lo tanto, la evolución habría ocurrido antes de la ruptura de Gondwana; mientras la evolución de los Triatominae se calcula haya ocurrido en el origen de Suramérica (95 m.a).

Otra hipótesis que usa el marcador 18S propone que la evolución ocurrió más tarde de lo que predicen los relojes moleculares de Gaunt & Miles (2002) y Patterson & Gaunt (2010), y ubica el origen de los Reduviinae en el origen de Suramérica y el de los Triatomini y los Rhodniini entre 48.9-64.4 m.a, es decir, cuando empezó el evento de separación de Suramérica de la Antártida y Australia en el período terciario (Bargues et al. 2000).

Una tercera hipótesis propone que los Triatominae son aún más recientes y que evolucionaron en el Oligoceno (27-32 m.a), es decir, cuando Suramérica se encontraba aislada de la Antártida y de las

migraciones hacia Norte América. Por lo tanto, los eventos a gran escala que estarían relacionados serían un período bien documentado de radiaciones de los mamíferos neotropicales y de las aves, y un período de alta diversificación de ecotopos (Hwang & Weirauch 2012). Según los autores, esta última hipótesis tiene una ventaja metodológica sobre las demás debido a que el análisis incluyó un reloj molecular relajado y no uno fijo, lo cual se traduce en un significativo progreso de las estimaciones, porque no asume una tasa constante de variación.

Los Triatominae son insectos hematófagos que viven en asociación con sus hospedadores silvestres en hábitats como palmas, nidos de aves, madrigueras de roedores, cuevas etc. Las especies domiciliadas colonizan las viviendas y las peridomiciliarias habitan en construcciones artificiales hechas para el abrigo de animales domésticos como gallinas, cerdos, ganado ovino o bovino (Lent & Wygodzinsky 1979). Este comportamiento es un claro reflejo de la baja selectividad que presentan los triatominos por un determinado hospedador. Aunque algunas excepciones ocurren como es el caso de *Psammolestes*, género que agrupa a especies asociadas a aves de la familia Furnariidae, de *T. delpontei* que está asociado con Psitácidos del género *Monacha*, de *T. rubrofasciata* que se alimenta preferentemente en roedores y de *Cavernicola pilosa* asociada casi exclusivamente a quirópteros (Lent & Wygodzinsky 1979, Soares et al. 2001, Noireau et al. 2005).

El eclecticismo de los triatominos en relación con el hospedador difiere drásticamente con la selectividad que exhiben otros grupos de insectos hematófagos, como el caso de Phthiraptera -piojos- con una edad calculada entre los 115-130 m.a o “chinchas de cama” (Cimex, Cimicidae) de aproximadamente 100 m.a. La probable mayor edad de estos últimos sugiere una estrecha co-evolución entre el hospedador y el parásito. Al respecto, Hwang & Weirauch (2012) discuten que al lado de los factores ecológicos que puedan incidir en la especificidad por el hospedador, la relativa juventud de los Triatominae (27-35 m.a) podría ayudar a explicar este menor grado de selectividad.

La información que provee el registro fósil sobre las subfamilias de Reduviidae y que se considera confiable, proviene del Eoceno y Mioceno, lo cual proporciona pocas luces sobre el período de mayor diversificación de los linajes en este grupo (Hwang & Weirauch 2012). Respecto a la edad del registro fósil de Triatominae, específicamente *Triatoma dominicana* se calcula entre 20-15 o 40-35 m.a (Poinar 2005).

5. Hospedadores invertebrados de los Triatominae

Algunos trabajos refieren la presencia de comportamientos alimentarios alternativos en los Triatominae. Se describe el canibalismo, la cleptohematofagia (hurto de sangre) y la hemolinfagia en especies de los géneros *Rhodnius* y *Triatoma* en condiciones naturales y experimentales (Brumpt 1914, Phillips 1960, Miles 1981, Piñero et al. 1988, Lorosa et al. 2000, Noireau & Dujardin, 2010). Más recientemente, Garrouste (2009) observó la hemolinfagia en circunstancias naturales en el género *Panstrongylus* (Figura 3).

Piñero et al. (1998) a partir de experimentos con *R. prolixus* sugieren que estos comportamientos facultativos podrían ser interpretados como estrategias alternativas de alimentación, que en condiciones naturales permiten a los triatominos substituir una fuente alimentaria, para poder sobrevivir sin ejercer estrictamente la hematofagia o disminuir la exposición a predadores.

Garrouste (2009) menciona que la práctica de la hemolinfagia por parte de los Triatominae en condiciones naturales aporta fuentes tróficas suplementarias, aumentando la plasticidad ecológica y confiriéndoles mayor capacidad para colonizar diversos ambientes. En general, se supone que estos hábitos alternativos de alimentación en Triatominae son derivados del linaje predador de Reduviidae (Noireau et al. 2005).

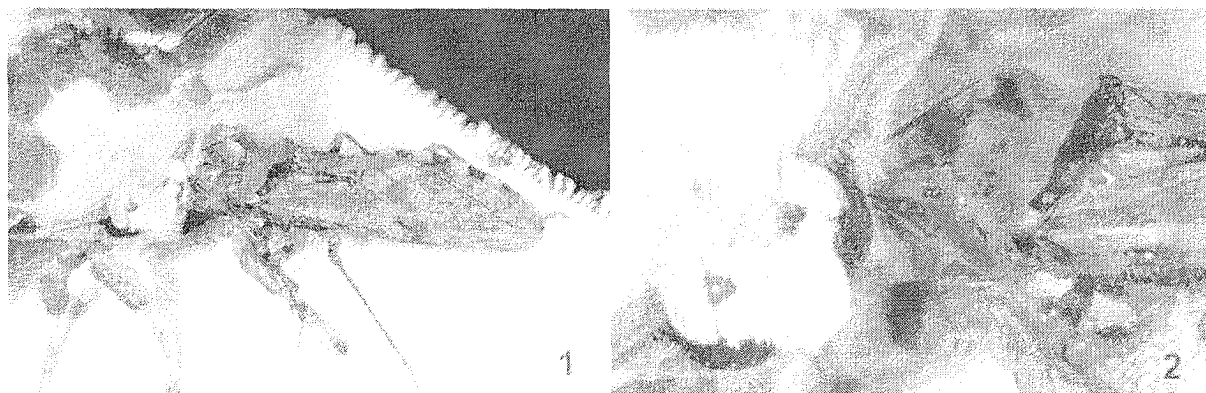


Figura 3. *Panstrongylus geniculatus* alimentándose por hemolinfagia en un Lepidoptera Saturniidae *Eacles* sp. Fuente: Garrouste 2009.

6. Biología y Taxonomía del género *Belminus* (Reduviidae: Triatominae)

El género *Belminus*, pertenece a la subfamilia Triatominae, tribu Bolboderini que alberga pequeños triatomíneos de menos de doce milímetros de longitud, con genas grandes alargadas y proyectadas más allá del ápice del clípeo e integumento del cuerpo fuertemente rugoso y granuloso (Lent & Wygodzinsky 1979). Las principales características diagnósticas que definen al género son: escutelo con dos procesos laterales obtusos en la base, primer y segundo segmentos del rostro sub-equivalentes en longitud y los segmentos dorsales del conexivo con un pliegue submarginal longitudinal (Lent 1943, Lent & Wygodzinsky 1979).

Según Lent (1943), el género *Belminus* fue descrito en el año 1859 por Stål basado en una sola especie procedente de Colombia y publicada bajo el nombre de *Belminus rugulosus*. Ese mismo autor hizo una enmienda en 1868 con respecto a los ocelos de los cuales verificó su presencia. Posteriormente en 1873, Walker describió bajo el nombre de *Conorhinus diminutus* un pequeño espécimen proveniente de Venezuela, al cual Neiva (1913) examinó e identificó como *Belminus rugulosus*; en ese mismo trabajo, Neiva señaló que Distant había creado en 1902, el género *Marlianus*, que no era más que *Belminus rugulosus* (Lent 1943). Sin embargo, Neiva (1913) apoyado en que Stål había establecido el género en la ausencia de ocelos, lo cual no era cierto, lo consideró idéntico a *Triatoma*, sin tener en cuenta otros caracteres importantes que mostraban distintos a estos dos géneros (Lent 1943). Pinto (1931) reconoció a *Belminus* como un género bien fundamentado. Finalmente, Lent (1943) concluyó que *Belminus* Stål 1859, era un género válido cuya especie tipo es *Belminus rugulosus*, que *Triatoma rugulosa* Stål 1859, *Marlianus diminutus* Distant 1902, *Conorhinus rugulosus* y *Conorhinus diminutus* Walker, 1973 son sinonimias de *Belminus rugulosus*.

Herrer, Lent & Wygodzinsky (1954) describen dos especies más para el género, *Belminus peruvianus* y *Belminus costaricensis*. Los primeros especímenes de *B. peruvianus* fueron capturados dentro de viviendas en el Valle de Marañón, Perú, y los de *B. costaricensis* capturados en Costa Rica sobre un perezoso (*Bradypus*) y en nidos de Isoptera e Himenoptera, hallazgo que los autores consideraron accidental. Lent & Wygodzinsky (1979) describen a *Belminus herreri* de especímenes colectados en Panamá, encontrados en la corteza de un árbol de *Anacardium* sp. en un bosque húmedo tropical. En Venezuela, Osuna & Ayala (1993) colectan en el parque Nacional Henry Pittier, en Aragua un espécimen con el corium amarillo, que describen bajo el nombre de *Belminus pittieri*. Lent, Jurberg & Carcavallo (1995) describen a *Belminus laportei* de material colectado procedente de Pará y asociado a

reptiles del género *Techadactylus* (Gekkonidae) de la región amazónica brasilera, que en una primera oportunidad fueron identificados como *Belminus herreri*.

En Colombia algunos especímenes procedentes del municipio de San Gil, departamento Santander, son descritos como *Belminus corredori* por Galvão & Angulo (2006). En el municipio de Toledo, Norte de Santander, Colombia, se detecta la presencia de especímenes pertenecientes al género *Belminus* en domicilios que Sandoval, Pabón, Jurberg & Galvão (2007) describen como *Belminus ferroae*.

En consonancia con lo anterior, en el territorio venezolano se encuentran registradas dos especies del género: *B. rugulosus* y *B. pittieri* (Martínez & Carcavallo 1976, Osuna & Ayala 1993), y en el colombiano cuatro especies, *B. rugulosus*, *B. herreri*, *B. corredori* y *B. ferroae* (Sandoval et al. 2007). De esta manera el género actualmente alberga ocho especies distribuidas desde México hasta el norte de Brasil (Figura 4 y 5).

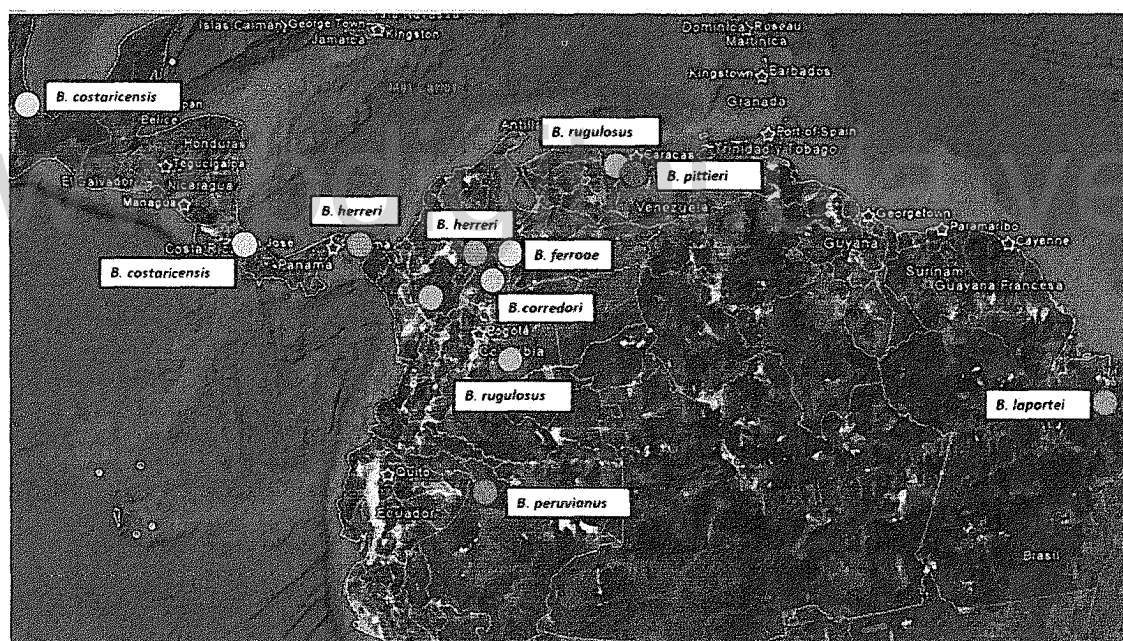
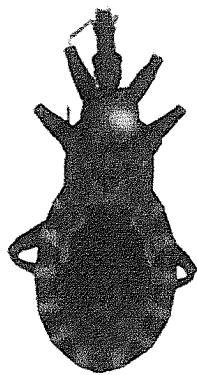
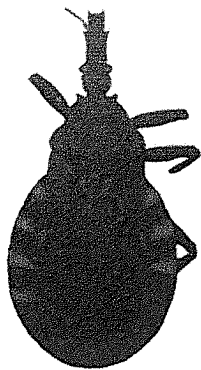


Figura 4. Mapa de la distribución geográfica del género *Belminus* (Hemiptera: Triatominae). Fuentes: Lent & Wygodzinsky (1979), Osuna & Ayala (1993), Moreno et al. (1995), Lent et al. (1995), Sandoval et al. (2004), Sandoval et al. (2010).



B. rugulosus, Stal 1859



B. peruvianus
Herrer, Lent & Wygodzinsky, 1954



B. costaricensis
Herrer, Lent & Wygodzinsky, 1954



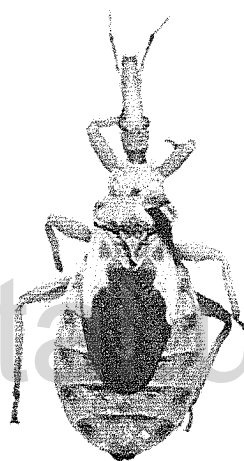
B. herreni Lent & Wygodzinsky, 1979



B. pittieri Osuna & Ayala, 1993



B. loportei Lent, Jurberg
& Carcavallo, 1995



B. corredori Galvao & Angulo, 2006



B. ferroe Sandoval, Pabón, Jurberg
& Galvao, 2007

Figura 5. Fotografías de las ocho especies que conforman el género *Belminus* (Hemiptera: Triatominae). Fuente: Sandoval et al. (2007).

6.1 Comportamiento alimentario en el género *Belminus*

El trabajo de Herrer et al. (1954) es el primer documento que narra algunos aspectos de la biología de una de las especies del género, *Belminus peruvianus* y que señala, además de los vertebrados, a los artrópodos como hospedadores de estos insectos. De los comportamientos alimentarios observados por estos autores, en este grupo, se describe la hematofagia, el canibalismo y la hemolinfagia sobre otros Triatominae.

Durante el proceso de colonización de *B. herreri* en el laboratorio procedente de hábitats peridomésticos de Colombia, Sandoval et al. (2000) refieren la dificultad para alimentar a estos insectos con hospedadores vertebrados, tales como roedor, ave y humano. A partir de estos hechos y basados en las observaciones realizadas por Herrer et al. (1954), una pequeña colonia fue mantenida a expensas de *Rhodnius prolixus* recién ingurgitados con sangre de gallina y de esta manera se presumió que el comportamiento involucrado podría ser la cleptohematofagia.

En material colectado directamente de algunas viviendas ubicadas en el departamento del Cesar en Colombia y perteneciente a la especie *B. herreri*, los resultados del análisis de la ingesta sanguínea fueron negativos, a pesar que fue probado un panel de antisueros de nueve diferentes fuentes de vertebrados (ave, felino, canino, caprino, equino, roedor, reptil, humano y marsupial). Sin embargo, el 96% de los contenidos intestinales de estos insectos reaccionaron al antisuero de la cucaracha *Periplaneta americana* (Blattodea: Blattidae), uno de los artrópodos más abundantes dentro de las viviendas (Sandoval et al. 2004).

Nuevamente, de material procedente de Colombia, capturado en ambientes domésticos en el departamento de Norte de Santander y perteneciente a la especie *B. ferroae*, se detecta en el 89,6% de los contenidos intestinales ingesta de hemolinfa, a través del antisuero de *P. americana*. Aunque simultáneamente se detectó la hematofagia sobre roedor y humano en un 7% (Sandoval et al. 2010). De esta manera, las informaciones sobre el comportamiento alimentario disponible para las especies de *Belminus*, sugieren que su espectro de hospedadores incluye principalmente artrópodos y ocasionalmente mamíferos, aves y réptiles. En la Figura 6, se muestra un registro de los diferentes comportamientos observados en condiciones de laboratorio, en algunas especies del género *Belminus*.

CANIBALISMO**CLEPTOHEMATOFAGIA Y/
O HEMOLINFAGIA****HEMATOFAGIA****HEMOLINFAGIA**

Figura 6. Registro fotográfico de los comportamientos alimentarios de *Belminus* spp. bajo condiciones de laboratorio. Canibalismo en *B. ferroae*, hemolinfagia de *B. herreri* en cucarachas, cleptohematofagia o hemolinfagia de *B. ferroae* sobre *R. prolixus*, hematofagia de *B. herreri* sobre reptil y de *B. ferroae* sobre roedor.

7. Justificación y planteamiento del problema

En la literatura ha sido recurrente el señalamiento de que los triatominos no son estrictamente hematófagos, esta afirmación se basa en las reiteradas observaciones de canibalismo, cleptohematofagia y hemolinfagia en diversas especies de la subfamilia Triatominae, en condiciones naturales y experimentales (Brumpt 1914, Ryckman 1951, Phillips 1960, Miles 1981, Piñero et al. 1988, Lorosa et al. 2000, Garrouste 2009, Noireau & Dujardin 2010).

Sin embargo, no ha habido hasta el momento, un estudio que aborde ese fenómeno mediante protocolos repetibles, y que permita traspasar de las observaciones meramente anecdóticas a un análisis más riguroso desde el punto de vista del método científico.

Dado que el comportamiento hematofágico es un carácter que define a la subfamilia Triatominae, la información sobre el carácter de estricto o facultativo, y accidental o natural de la hemolinfagia o la cleptohematofagia, contribuiría a esclarecer el estatus taxonómico de esta subfamilia. En este sentido, en el presente trabajo se estudia la viabilidad del ciclo de vida de una especie del género *Belminus*, por su comportamiento predador de cucarachas (Sandoval et al. 2004, 2010), mediante el análisis de los parámetros reproductivos y demográficos, bajo los siguientes interrogantes: ¿Puede una especie del género *Belminus* mantener un ciclo de vida viable al alimentarse exclusivamente sobre un hospedador artrópodo, y presentar un mayor desempeño reproductivo y demográfico con relación a un hospedador vertebrado?

Ahora bien, si el ciclo de vida con presas artrópodas es viable en condiciones de laboratorio, ¿es posible trazar esta viabilidad en condiciones naturales (domicilios) a través de un análisis morfológico que demuestre la presencia de un fenotipo asociado al hospedador artrópodo, e identificar por esta vía el principal hospedador de *B. ferroae* dentro de los domicilios?

Por otra parte, una de las hipótesis propuestas por Schofield & Galvão (2009) y Bargues et al. (2010), para explicar la observación según la cual especies del género *Belminus* se alimentan principalmente de cucarachas y en ocasiones de vertebrados (Sandoval et al 2010), es la que dicho comportamiento sea una adaptación temprana de este grupo a la hematofagia, lo cual implicaría que la aparición del comportamiento hematofágico sería recurrente y por tanto la subfamilia sería polifilética, al estar definida por un rasgo que comparten diferentes líneas evolutivas con distintos ancestros recientes. Sin embargo, si se considera que actualmente no hay consenso sobre el origen de la subfamilia y que hasta el momento no se ha incluido ningún representante del género en cuestión en las reconstrucciones

filogenéticas publicadas, es preciso poner a prueba esta hipótesis. Esto debido a que podrían entrar en el escenario otras hipótesis con similar probabilidad. Por ejemplo, el comportamiento predador de los *Belminus*, podría también ser interpretado como un vestigio del proceso evolutivo que dio origen a la subfamilia y estar frente a un grupo basal de Triatominae, es decir, muy cercano al ancestro. La otra hipótesis alternativa es que ellos no sean un grupo basal de Triatominae y su comportamiento probablemente derive de la plasticidad ancestral conservada por las especies de esta subfamilia con relación al hospedador (vertebrado/artrópodo). Bajo este razonamiento cabe preguntarse, ¿Es cierto que estamos frente a un grupo con especies en un estado temprano de adaptación a la hematofagia? o ¿el género *Belminus* es un taxón válido de los Triatominae, a pesar que algunos de sus miembros no exhiban una hematofagia estricta? Estos últimos interrogantes se abordarán a través de la inclusión de secuencias de tres especies de *Belminus* en las reconstrucciones filogenéticas de la subfamilia con dos marcadores moleculares.

A su vez esta incertidumbre taxonómica justificó la necesidad de revisar otros caracteres morfológicos distintos a los usualmente utilizados para identificar y caracterizar a miembros de la subfamilia Triatominae. En ese sentido, el presente trabajo incluyó un estudio del fenotipo antenal y la morfología del huevo en tres especies del género *Belminus*, con el objetivo de ampliar el análisis morfológico y con base en la información disponible en la literatura discutir el relacionamiento a nivel de género y tribu. Adicionalmente, se evaluó la designación específica de estos tres taxones a través del fenotipo antenal, el patrón exocorial del opérculo del huevo y el análisis de las secuencias de citocromo b, al considerar el recientemente cuestionamiento del estatus taxonómico levantado para las especies del género *Belminus* por Schofield & Galvão (2009).

Para dar respuesta a cada uno de los interrogantes anteriormente planteados, el presente trabajo se organizó en seis capítulos, el capítulo I que es introductorio, los capítulos II y III se correspondieron con los primeros interrogantes y se basaron en estudios que involucraron exclusivamente a la especie *B. ferroae*, debido a que fue la primera especie con la cual establecimos una colonia, y con relativa facilidad era posible acceder a material colectado en campo y además, se contaba con previas informaciones en condiciones de campo (domicilios). Los capítulos IV y V incluyeron en el análisis a tres especies del género *Belminus* como son: *B. corredori*, *B. ferroae* y *B. herreri*. Por último, se

analizaron los hallazgos en conjunto y se discutieron las implicaciones del estudio en el conocimiento de la ecología y la sistemática de los vectores de la enfermedad de Chagas. El trabajo se estructuró de la siguiente manera:

Capítulo I. Introducción y justificación

Capítulo II. Estudio de los aspectos demográficos y reproductivos de *B. ferroae* con tres hospedadores (cucaracha, roedor y un Triatominae, *R. prolixus*) bajo condiciones de laboratorio.

Capítulo III. Análisis de la plasticidad fenotípica de *B. ferroae* alimentado con dos potenciales hospedadores: cucaracha (*Blaberus*) y roedor (*Mus musculus*).

Capítulo IV. Ampliación del análisis morfológico en *B. corredori*, *B. ferroae* y *B. herreri* y evaluación de su estatus taxonómico

Capítulo V. ¿Son los *Belminus* un taxón válido de los Triatominae? Una aproximación a través de la reconstrucción filogenética de la subfamilia con dos marcadores moleculares (28SD2 y citocromo b).

Capítulo VI. Discusión general

8. Referencias

1. Ayala JM 2009. Una nueva especie de *Panstrongylus* Berg de Venezuela (Hemiptera: Reduviidae, Triatominae). *Entomotropica* 24: 105-109.
2. Barges MD, Marcilla A, Ramsey J, Dujardin JP, Schofield CJ, Mas-Coma S 2000. Nuclear rDNA-based molecular clock of the evolution of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vectors of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 567-573.
3. Barges MD, Schofield CJ, Dujardin JP 2010. Classification and phylogeny of the Triatominae. In Telleira J, Tibayrenc M. American Trypanosomiasis Chagas disease. One hundred years of research.
4. Brumpt E 1914. Importance du cannibalisme et de la coprophagie chez les Réduvidés hématophages (*Rhodnius*, *Triatoma*) pour la conservation des Trypanosomes pathogènes en dehors de l'hôte vertébré. *Bull Soc Pathol Exot* 7: 702-705.
5. Catalá S 1997. Antennal sensilia of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) a comparative study of five genera. *Int J Insect Morphol & Embryol* 26: 67-13.

6. Dick CW, Esbérard CE, Graciolli G, Bergallo HG, Gettinger D 2009. Assessing host specificity of obligate ectoparasites in the absence of dispersal barriers. *Parasitol Res* 105:1345-1349.
7. Distant W 1902. Rhynchotal notes: XIV. Heteroptera: Families Hydrometridae, Henicocephalidae, and Reduviidae (part). *Ann Mag Nat Hist*, 7(57): 173-194.
8. Forero D 2008. The systematics of the Hemiptera *Rev Colomb Entomol* 34:1-21.
9. Galvão C 2003. A sistemática dos triatomíneos. (Hemiptera: Reduviidae) de De Geer ao DNA. *Entomol Vect* 10: 511-530.
10. Garrouste R 2009. La première observation in natura de l'entomophagie de *Panstrongylus geniculatus* (Latreille 1811) hématophage vecteur de la maladie de Chagas (Hemiptera: Reduviidae). *Ann Soc Entomol Fr* 45: 302-304.
11. Gaunt M & Miles M 2002. An Insect Molecular Clock Dates the Origin of the Insects and Accords with Palaeontological and Biogeographic Landmarks. *Mol Biol Evol* 19:748-761.
12. Gonçalves TC, Teves-Neces SC, Santos-Mallet J.R, Carbajal de La Fuente AL, Lospes CM 2013. *Triatoma jatai* sp. nov. in the state of Tocantins, Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108(4): 429-437.
13. Gorla DE, Dujardin JP, Schofield CJ 1997. Biosystematics of Old World Triatominae. *Acta Trop* 63:127-140.
14. Grimaldi D, Engels MS 2005. Evolution of the Insects, 1era ed., Cambridge University Press, Hong kong, 755 pp.
15. Herrer A, Lent H, Wygodzinsky P 1954. Contribución al conocimiento del género *Belminus* Stal, 1859 (Triatominae, Reduviidae, Hemiptera). *An Inst Med Reg Univ Tucumán* 4: 85-106.
16. Hwang WS, Weirauch C 2012. Evolutionary History of Assassin Bugs (Insecta: Hemiptera: Reduviidae): Insights from Divergence Dating and Ancestral State Reconstruction. *PLoS ONE* 7(9): e45523. doi:10.1371/journal.pone.0045523 Epub 2012 Sep 28.
17. Hypsa V, Tietz DF, Zrzavy J, Rego ROM, 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.
18. Jurberg J, Rocha DS, Galvão C 2009. *Rhodnius zeledoni* sp. nov. afim de *Rhodnius paraensis* Sherlock, Guitton & Miles, 1977 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Biota Neotrop* 9: 123-128.

19. Lehane MJ 2005. The Biology of Blood-Sucking in Insects, 2nd ed., Cambridge University Press, Cambridge, 320 pp.
20. Lent H 1943. Novo transmissor da doença de Chagas na cidade do Rio de Janeiro, D.F. Estudo dos generos *Belminus* Stal, 1859, *Bolboderia* Valdes, 1910 e descrição de *Parabelminus carioca* n.g., n. sp (Hemiptera, Triatomidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 38: 498-515.
21. Lent H, Jurberg J, Carcavallo RU 1995. *Belminus laportei* sp.n da Região Amazônica (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 90: 33-39
22. Lent H, Wygodzinsky P 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. *Bull Am Mus Nat Hist* 163: 123-520.
23. Lorosa ES, Jurberg J, Souza AL, Vinhaes MC, Nunes IM 2000. Hemolinfa de Dictyoptera na manutenção do ciclo biológico silvestre de *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) e *Triatoma circummaculata* (Stal, 1859) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Entomol Vect* 7: 287-296.
24. Lukashevich ED, Mostovs.ki MB 2003. Hematophagous Insects in the Fossil Record. *Paleontological J* 37: 153-161.
25. Lyman DE, Monteiro FA, Escalante AA, Cordon-Rosales C, Wesson DM, Dujardin, JP Beard C (1999). Mitochondrial DNA sequence variation among triatomine vectors of Chagas disease. *Am J Trop Med Hyg* 60: 377-386.
26. Marcilla A, Barges MD, Ramsey J, Magallon-Gastelum E, Salazar-Schettino PM, Abad-Franch F, Dujardin JP, Schofield CJ, Mas-Coma S 2001. The ITS-2 of the nuclear rDNA as a molecular marker for populations, species and phylogenetic relationships in Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vectors of Chagas disease. *Mol Phylogenet Evol* 18: 136-142.
27. Martinez A, Carcavallo RU 1976. El alotipo macho de *Belminus rugulosus* Stal 1859 (Hemiptera: Reduviidae). *Bol Malariol Salud Ambient* 16: 241-243.
28. Miles MA, de Souza AA, Póvoa M 1981. Chagas' disease in the Amazon basin III. Ecotopes of ten triatomine bug species (Hemiptera: Reduviidae) from the vicinity of Belém, Pará State, Brazil. *J Med Entomol* 18: 266-278.
29. Moncayo A, Silveira AC 2010. Current Trends and Future Prospects for Control of Chagas Diseases. En Telleria J, Tibayrenc M, American Tripanosomiasis Chagas Disease. One Hundred Years of Research. En Elsevier, London, p 848.

30. Moreno, J 1995. Recientes estudios epidemiológicos de tripanosomiasis Americana en diferentes áreas de Colombia. *Biomédica* 11: 43-44.
31. Neiva A 1913. Notas hemipterologicas I. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 5: 74-77
32. Noireau F, Carbajal-de-la-Fuente AL, Lopes CM, Diotaiuti L 2005. Some considerations about the ecology of Triatominae. *An Acad Bras Cienc* 77: 431-436.
33. Noireau F, Diosque P, Jansen AM 2009. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. *Vet Res* 40: 1-26.
34. Noireau F, Dujardin JP 2010. Biology of Triatominae. En Telleria J, Tibayrenc M, American Tripanosomiasis Chagas Disease. One Hundred Years of Research. En Elsevier, London, p 848.
35. Osuna E, Ayala JM 1993. *Belminus pittieri* Nueva especie de Bolboderini (Triatominae: Reduviidae: Heteroptera) *Bol Entomol Venez* 8: 147-150.
36. Patterson & Gaunt (2010) Patterson JS, Gaunt MW 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.
37. Paula AS, Diotaiuti L, Schofield CJ 2005. Testing the sister-group relationship of the Rhodniini and Triatomini (Insecta: Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mol Phylogenet Evol* 35: 712–718.
38. Phillips NR 1960. Experimental studies on the quantitative transmission of *Trypanosoma cruzi*: aspects of the rearing, maintenance and testing of vector material, and of the origin and course of infection in the vector. *Ann Trop Med Parasitol* 54: 397-414.
39. Pinto C 1931. Valor do rostro e antenas na caracterização dos gêneros do Triatomídeos Hemiptera : Reduviídeoidea. *Bol Biol* 19: 45-136.
40. Piñero DF, Carcavallo RU, Fernandez E 1988. Canibalismo y transmisión directa de *Trypanosoma cruzi* entre ninfas de *Rhodnius prolixus*. *Chagas* 5: 18-22.
41. Poinar GO 2005. *Triatoma dominicana* sp. n. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), and *Trypanosoma antiquus* sp. n. (Stereocoraria: Trypanosomatidae), the first fossil evidence of a Triatomine-Trypanosomatid Vector Association. *Vector Borne Zoonotic Dis* 5: 72-81.
42. Reinhardt K, Siva-Jothy MT 2007. Biology of the Bed Bugs (Cimicidae). *Annu Rev Entomol* 52: 351-374.

43. Ribeiro JM, Schneider M, Isaias T, Jurberg J, Galvão C, Guimarães JA 1998. Role of salivary antihemostatic components in blood feeding by triatomine bugs (Heteroptera). *J Med Entomol* 35: 599-610.
44. Rosa JA, Solano RC, Gardim S, Pinto MR, Mendoça VG, Ferreira Filho JC, Carvalho EO, Camargo LM, 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* 3472: 62-76.
45. Ryckman RE 1951. Recent observations of cannibalism in *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae). *J Parasitol* 37:433-434.
46. Sandoval CM, Duarte R, Gutiérrez R, Rocha Dda S, Angulo VM, Esteban L, Reyes M, Jurberg J, Galvão C 2004. Feeding sources and natural infection of *Belminus herreri* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) from dwellings in Cesar, Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 137-140.
47. Sandoval CM, Joya MI, Gutierrez R, Angulo VM 2000. Cleptohaematophagy of the Triatomine bug *Belminus herreri*. *Med Vet Entomol* 14: 100-101.
48. Sandoval CM, Ortiz N, Jaimes D, Lorosa E, Galvão C, Rodriguez O, Scorza JV, Gutiérrez R 2010. Feeding behaviour of *Belminus ferroae* (Hemiptera: Reduviidae), a predaceous Triatominae colonizing rural houses in Norte de Santander, Colombia. *Med Vet Entomol* 24: 124-131.
49. Sandoval CM, Pabón E, Jurberg J, Galvão C 2007. *Belminus ferroae* n. sp. from the Colombian north-east, with a key to the species of the genus (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Zootaxa* 1443: 55-64.
50. Schaefer CW 2003. Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): systematic questions and some others. *Neotrop Entomol* 32: 1-10.
51. Schaefer CW 2005. Why are the subfamily relationships of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) Important? *Entomol Vect* 12: 19-35.
52. Schofield CJ 1988. The biosystematics of Triatominae. In MW Service, Biosystematics of Haematophagous Insects, Clarendon Press, Oxford, p. 284-312.
53. Schofield CJ, Galvão C 2009. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Trop* 110: 88-100.

54. Soares RP, Barbosa SE, Borges EC, Melo Júnior TA, Romanha AJ, Dujardin JP, Schofield CJ, Diotaiuti L 2001. Genetic studies of *Psammolestes tertius* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) using male genital morphology, morphometry, isoenzymes, and random amplified polymorphic DNA. *Biochem Genet* 39: 1-13.
55. Stal C 1859. Monographie der Gattung Conorhinus und Verwandten. *Berliner Entomologische Zeitschrift* 3: 99-117.
56. Usinger R 1944. The Triatominae of North and Central America and the West Indies and their public health significance. *Public health tech monogr US* 288: 1-81.
57. Waage JK 1979. The evolution of insect/invertebrate associations. *Biol J Linnean Soc* 12:187-224.
58. Walker F. 1873. Catalogue of the specimens of Hemiptera Heteroptera in the collection of the British Museum. Trustees of British Museum, London, 220 pp.
59. Weirauch C 2008. Cladistic analysis of Reduviidae (Heteroptera: Cimicomorpha) based on morphological characters. *Syst Entomol* 33: 229-274.
60. 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.
61. Weirauch C, Schuh R 2011. Systematics and Evolution of Heteroptera: 25 Years of Progress. *Annu Rev Entomol* 56: 487-510.
62. World Health Organization 2010. First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. WHO/HTM/NTD/2010.1.

Capítulo II. Estudio de los aspectos demográficos y reproductivos en la especie *B. ferroae* con tres hospedadores (cucaracha, roedor y un Triatominae, *R. prolixus*), bajo condiciones de laboratorio.

1. Introducción

Desde la década de los setenta se iniciaron los primeros estudios demográficos en la subfamilia Triatominae, pero a pesar de los esfuerzos, aún son pocas las especies que han sido analizadas bajo este enfoque. Medone et al. (2012) a partir de una compilación de 500 trabajos publicados por diversos autores, únicamente lograron seleccionar información completa de la mortalidad y la fecundidad en 27 especies de triatominos, que permitiera extraer o calcular los parámetros básicos de las historias de vida para un estudio comparativo sobre la senectud en la subfamilia.

En los triatominos, la mayoría de los estudios demográficos han tenido como propósito general conocer la dinámica poblacional en algunas especies de importancia epidemiológica, a fin de brindar apoyo en la selección de las medidas adecuadas de control químico o biológico, al establecer el valor reproductivo de los diferentes estadios en el ciclo de vida. Así mismo, evaluar la capacidad de domiciliación en relación con el hospedador a través de las tasas intrínseca de incremento natural (r_0) y la instantánea de nacimientos (b); igualmente, evaluar el impacto de factores como la temperatura, la densidad, la disponibilidad de alimento en las tasas de crecimiento poblacional y la capacidad de respuesta de una población ante cualquier perturbación que afecte los parámetros de supervivencia y fecundidad (Rabinovich 1972, Rodríguez & Rabinovich 1980, Ghilini 1983, Feliciangeli & Rabinovich 1985, Cabello et al. 1987, Oscherov et al. 1996, Cabello & Galindez 1998, Oscherov et al. 2005, Rabinovich & Nieves 2011).

Si bien el género *Belminus* fue descrito desde 1859, en la literatura científica no existen estudios acerca de las estadísticas vitales y los parámetros demográficos para alguna especie de este grupo. Un trabajo previo realizado por Sandoval et al. (2000), provee algunas estimaciones para los tiempos de desarrollo y la mortalidad de los huevos y las ninfas de la especie *B. herreri*, pero no aporta datos sobre algún parámetro demográfico. Esta carencia de información demográfica y en general de la biología de estas especies, puede ser atribuida a los esporádicos eventos de captura, así como también al bajo número de

especímenes colectados en el campo y a la dificultad para mantener las colonias de laboratorio con hospedadores vertebrados (Herrer et al. 1954, Schofield & Galvão 2009). Algunas observaciones preliminares indicaron la posibilidad de colonizar la especie *B. peruvianus*, al utilizar como hospedadores ninfas de otros Triatominae (Herrer et al. 1954). Aunque *R. prolixus* no se considera un hospedador natural de las especies de *Belminus*, el uso de este triatomo como fuente de alimento permitió mantener colonias de *B. herreri*, pero con un número muy bajo de especímenes (Sandoval et al. 2000). Un análisis de los contenidos intestinales de insectos domiciliados, pertenecientes a la especie *B. ferroae* indicó que la sangre de roedores y humanos, y la hemolinfa de algunos artrópodos, podrían ser las fuentes naturales de alimentación para esta especie, y sugirió a las cucarachas como los principales hospedadores (Sandoval et al. 2010). El estudio de éste comportamiento peculiar puede aportar nuevas informaciones sobre la ecología evolutiva de los Triatominae.

El análisis de la historia de vida de *B. ferroae* en condiciones de laboratorio bajo dos regímenes de alimentación predación y hematofagia, tiene dos propósitos, el primero definir si el ciclo de vida de este triatomo puede ser desarrollado exclusivamente a expensas de hemolinfa, y por lo tanto, demostrar la existencia en la subfamilia de un Triatominae sin un comportamiento hematófago estricto. El segundo, establecer la importancia de estos dos hospedadores (cucaracha y roedor) en los parámetros demográficos de *B. ferroae*, información que ayudará a precisar la importancia ecológica y adaptativa de los hospedadores invertebrados o vertebrados en el ciclo de vida de esta especie.

2. Consideraciones generales del análisis de las tablas de vida

El conocimiento de la biología y el potencial de crecimiento de una población de insectos son fundamentales en el estudio de la capacidad reproductiva de una especie (Rabinovich 1978). La confección y el análisis de las tablas de vida, permite estimar algunos estadísticos poblacionales que pueden ser muy útiles al momento de caracterizar las poblaciones a efectos de comparar su desempeño reproductivo en relación a algún factor biótico o abiótico (Carey 1993, Campuzano-Martinez et al. 2010), y es fundamental a la hora de intentar conocer la capacidad innata de una especie a multiplicarse sobre un determinado hospedador (Vasicek et al. 2003, La Rossa et al. 2005, Iranipour et al. 2010).

De manera resumida, una tabla de vida es un registro pormenorizado de las muertes y los nacimientos, que permite calcular la probabilidad de sobrevivir, además de otros estadísticos vitales y reproductivos en las diferentes categorías de edad, tamaño o estadio en una especie (Carey 2001).

A través del seguimiento de cohortes¹ en ambientes experimentales, el registro de estos dos eventos permite describir y analizar la dinámica de una población. En este tipo de estudios con poblaciones cerradas, se asumen, solo dos causas para el cambio numérico (los nacimientos y las muertes). Aunque en poblaciones naturales otros factores adicionales como la inmigración y la emigración deberían ser considerados (Carey 1993).

Las tablas de vida utilizadas en este estudio se basan en el modelo de población estable formulado por Lotka (1907), en el cual se establece que casi cualquier población que esté sujeta por un prologado período de tiempo a tasas constantes de mortalidad y fertilidad converge a una distribución estable de edades o de estadios, independientemente de la distribución inicial (Carey 2001). Este modelo es ampliamente usado en el contexto de *fitness* poblacional, ya que al aplicar tasas vitales constantes, el crecimiento poblacional no es denso dependiente y no es afectado por variaciones ambientales, entonces la población podría aumentar de tamaño si la tasa finita de crecimiento es positiva o decrecer si es negativa (Carey 2003, Dewi & Chesson 2004). Por eso una tabla de vida puede ser considerada como un modelo teórico de la supervivencia de una cohorte (Burch 2003).

En las tablas de vida el registro de la mortalidad se usa para calcular la sobrevivencia en función de la edad ($l(x)$), la cual acoplada a la fecundidad ($m(x)$), permite estimar los siguientes parámetros poblacionales:

La distribución estable de edades o estadios (DEE): es la estructura estable por edad o estadios que se supone alcanza una población cuando sus tasas vitales de nacimientos y muertes se mantienen constantes.

La tasa intrínseca de incremento natural (r_0): Este parámetro estima el crecimiento exponencial constante que puede lograr una población hipotética que se supone ha alcanzado una distribución

¹ Cohorte: Es un grupo de individuos que experimenta el mismo evento significativo en un período de tiempo particular (Carey 1993).

estable de edades, y que ha convergido a esta tasa por el efecto de un esquema fijo de las tasas vitales de nacimiento y de mortalidad edad específico (Caswell 2010). Según Rabinovich (1978), la tasa intrínseca de incremento natural es un parámetro genéticamente determinado, que refleja una capacidad potencial de multiplicación poblacional. En el caso que las condiciones ambientales o de la propia población no permitan un crecimiento poblacional de acuerdo con su tasa máxima, ésta crecerá con una tasa real menor que la tasa potencial. El parámetro (r_0) es un marco de referencia del crecimiento de la población que frecuentemente se utiliza como una medida del *fitness* (Birch 1948, Charlesworth 1980, Carey 1993), y su cálculo es uno de los logros más importantes de la demografía formal (Caswell 2010).

La tasa finita de incremento poblacional (λ): se interpreta como el número de veces que la población se multiplica por sí misma por unidad de tiempo.

La tasa neta reproductiva (R_0): es el número promedio de individuos que reemplazará a un individuo por tiempo generacional.

El tiempo generacional (T_g): aquella edad a la cual, si todo el esfuerzo reproductor estuviera concentrado en ella, la tasa de reemplazo sería la misma que con el esfuerzo reproductor repartido en diferentes edades (Rabinovich 1978).

Las tasas intrínseca de nacimientos (b) y de muertes (d): la primera se refiere a la tasa per cápita de nacimientos de una población cerrada, que ha sido sujeta a un esquema fijo de nacimientos y muertes, y que se supone ha alcanzado una distribución estable por edad o estadios. Su contraparte es la tasa intrínseca de muerte (d) sujeta a las mismas condiciones que (b) (Carey 1993).

El valor reproductivo estadio - específico (V_x): es el número relativo de prole que se espera produzca cada uno de los individuos en la edad x . Es la contribución a futuro de un individuo en la edad x a la siguiente generación.

3. Objetivo general

Analizar la influencia del hospedador en los aspectos reproductivos y demográficos de la especie *B. ferroae*.

4. Objetivos específicos

- 4.1 Determinar y comparar los parámetros vitales de *B. ferroae* alimentada con tres hospedadores: roedor (*Mus musculus*), cucaracha (*Blaberus*) y el triatomino (*R. prolixus*).
- 4.2 Estimar los parámetros reproductivos de *B. ferroae* alimentada con roedor (*Mus musculus*), cucaracha (*Blaberus*) y el triatomino (*R. prolixus*), a través del análisis de las tablas de vida.
- 4.3 Estimar a través del análisis de las tablas de vida los parámetros demográficos en *B. ferroae*, alimentado con roedor (*Mus musculus*), cucaracha (*Blaberus*) y el triatomino (*R. prolixus*), y comparar el *fitness* poblacional de cada cohorte a fin de conocer el valor adaptativo de los hospedadores bajo estudio.

5. Materiales y métodos

5.1 Origen de las cohortes

La muestra de la población de *B. ferroae* usada en este estudio fue capturada en Santa Catalina, Toledo, Norte de Santander, Colombia (07° 07' N, 72° 24' W).

5.2 Procedimientos experimentales

Los experimentos fueron realizados en una cabina climatizada Marca (New Millenium, Lesco HR-300), bajo condiciones constantes de temperatura (25 ± 2 °C) y humedad ($70 \pm 10\%$ HR). Fotoperiodo de 12/12 horas luz/oscuridad.

Las hembras de *B. ferroae* capturadas en campo, fueron divididas en tres grupos diferentes con cantidad equivalente de insectos ($n = 10$) a cada grupo le fue ofrecido un hospedador diferente: ratones albinos de la especie *Mus musculus* (Rodentia: Muridae), procedentes del bioterio de la Universidad de Pamplona. Ninfas del triatomino *R. prolixus* y estadios ninfales de cucarachas (Blattodea) pertenecientes al género *Blaberus* sp.

Los huevos de estas hembras se colectaron diariamente, y las ninfas I emergidas se expusieron a su respectivo hospedador de acuerdo al grupo de origen. En el grupo alimentado con el vertebrado, las ninfas fueron expuestas a un roedor (*Mus musculus*) sedado (Ketalar® 75 mg/Kg) una vez por semana. En el grupo alimentado con el triatmino, las ninfas de I y II estadio de *B. ferroae* les fue ofrecido de manera individualizada dos ninfas de *R. prolixus* de quinto estadio que fueron previamente alimentadas con gallina, mientras que las ninfas de *B. ferroae* de III, IV y V estadio fueron alimentadas individualmente con siete ninfas de quinto estadio de *R. prolixus*. En este último caso, los especímenes de *R. prolixus* fueron reemplazados semanalmente. En el grupo alimentado con cucaracha, todas las ninfas de cualquier estadio de *B. ferroae* fueron expuestas individualmente a una ninfa de IV o V estadio de *Blaberus* sp. Las cucarachas fueron reemplazadas mensualmente y mantenidas con alimento concentrado para conejos, maíz y agua que fue ofrecida en un algodón. Las ninfas alimentadas con roedor y *Rhodnius* se mantuvieron individualmente en vasos desechables de plástico de 4 x 3 cm, provistos de papel cartulina en su interior, cubiertos con tela tul y sellados con una banda elástica. Las ninfas alimentadas con cucaracha se mantuvieron en envases de plástico de 10 x 7 cm con papel cartulina en su interior y selladas con su respectiva tapa expresamente perforada para evitar la condensación y el desarrollo de hongos.

Las tres cohortes de *Belminus*, mantenidas cucaracha, roedor y *R. prolixus* se siguieron simultáneamente desde la eclosión de los huevos por un periodo de tres meses y se iniciaron con 86, 88 y 90 ninfas I, respectivamente. El envase donde reposaba cada espécimen fue codificado y de esta manera se logró el seguimiento individual. Las tres cohortes se revisaron diariamente para registrar la mortalidad y los eventos de muda durante el estadio ninfal. Para cada cohorte, tan pronto los adultos emergieron, veinticinco parejas fueron formadas, cada una en un recipiente y bajo las mismas condiciones utilizadas en la cría de las ninfas de los estadios avanzados.

Los eventos de mortalidad y ovipostura fueron registrados semanalmente hasta la muerte del último adulto. Un total de 600 huevos de estas parejas (200 por grupo) se revisaron diariamente para obtener el tiempo de desarrollo embrionario de cada cohorte por separado. Como las cohortes fueron iniciadas con ninfas de primer estadio, la fertilidad (la tasa de eclosión) de todos los huevos puestos por el total de las hembras de cada cohorte se usaron para proyectar el número inicial de huevos para el análisis de las tablas de vida.

Los procedimientos utilizados en el manejo de animales se establecieron en conformidad con la ley colombiana (Estatuto Nacional de protección animal ley 84 1989 y la resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud).

5.3 *Análisis estadísticos*

Los datos diarios de mortalidad fueron usados para calcular la supervivencia como función de la edad (l_x), y el número de huevos colectados semanalmente fue usado para calcular la edad específica de la fecundidad m_x , (también llamada esquema de la maternidad). Adicionalmente, se estimó la intermitencia de la ovipostura. La cual fue calculada para cada hembra, como el tiempo promedio entre dos oviposturas sucesivas. La estimación de las curvas de supervivencia l_x y de maternidad m_x permitieron el cálculo de otros parámetros demográficos como la tasa intrínseca de incremento natural r_0 (usando la ecuación de Euler - Lotka), la tasa neta reproductiva R_0 , la tasa finita de incremento poblacional λ , el tiempo promedio generacional T_g , el valor reproductivo edad-específico V_x y la distribución estable de estadios (DEE). Para cada parámetro demográfico, se estimó el intervalo de confianza con un nivel del 95% basado en 1000 *bootstrap*. Todos los cálculos fueron ejecutados en el programa **TriTV** previamente evaluado en triatomíneos por Medone et al. (2012). Las fórmulas de los parámetros poblacionales utilizados en este estudio se muestran en la tabla 2.

Debido a la irregularidad del esquema de maternidad (m_x), se ajustaron los datos a un Modelo Aditivo Generalizado MAG para obtener un patrón de la distribución del esfuerzo reproductivo con la edad. El MAG fue ejecutado en el software R (R Development Core Team 2007).

Se usó la prueba de Mann Whitney en un nivel de confianza del 95% para analizar las diferencias entre los tiempos de desarrollo de todos los estadios de las cohortes evaluadas. Mientras que para las diferencias en la razón sexual y la mortalidad por estadio entre cohortes se analizó usando una prueba de comparación de proporciones basada en el test de Ji-cuadrado para dos muestras independientes. Los dos últimos métodos fueron ejecutados con el software MedCalc 2012. Se estimó la tasa instantánea de nacimientos y muertes (b y d , respectivamente). Se calculó la probabilidad de éxito en la colonización, como la razón entre la tasa intrínseca de incremento natural (r_0) y la tasa instantánea de nacimiento (b) según Rabinovich (1974).

Tabla 2. Nombre, definición, símbolos y fórmulas de los parámetros poblaciones utilizados en este estudio. Tomado de Nieves & Rabinovich (2011), con algunas modificaciones.

Símbolo	Nombre y/o definición	Cálculo
b	Tasa instantánea de nacimientos	$(r_0 \beta) / (e^{-r_0} - 1)$
d	Tasa instantánea de muerte	$b - r_0$
T_x	Número de semanas que aún quedan por vivir a los adultos de la edad x	$\sum_x L_x$
e	Expectativa de vida o tiempo promedio de vida.	T_x / l_x
L_x	El número de semanas vivido por la cohorte entre las edades x y $x+l$	$(l_x + l_{x+l}) / 2$
l_x	La probabilidad de un individuo de seguir vivo al final de la edad x	N_x / N_0
m_x	Fecundidad edad - específica (huevos/♀/semana)	Valor observado
m'_x	edad específica de la fecundidad (♀huevos/♀/semana)	$m_x p$
N_x	Individuos vivos al final de la edad x	Valor observado
p	Razón sexual	$\frac{\text{♀}}{\text{♀} + \text{♂}}$
r_0	Tasa intrínseca de incremento natural	$\sum_x l_x m'_x e^{-r_0 x} - 1$
R_0	Tasa neta reproductiva	$\sum_x l_x m'_x$
Tg	Tiempo generacional	$\log_e(R_0)/r_0$
v_x	Valor reproductivo edad - específico	$\frac{e^{r_0 x}}{l_x} \sum_{x=\alpha}^{\infty} e^{-r_0 x} l_x m_x$
x	Edad en semanas	Valor observado
α	Edad de la primera reproducción	Valor observado
β	Tasa finita de nacimientos	$1 / \sum_x l_x e^{r_0 x+1}$
λ	Tasa finita de incremento poblacional	e^{r_0}
ω	Edad de la última reproducción	Valor observado

6. Resultados

6.1 Estadísticos vitales y reproductivos

En la tabla 3 se muestra un resumen de las estadísticas del ciclo de vida de *B. ferroae* con cada uno de los hospedadores.

Las diferencias en los tiempos de desarrollo embrionario entre todas las cohortes fueron estadísticamente significativas. La mayoría de los tiempos de desarrollo entre las ninfas de un mismo estadio entre las diferentes cohortes fueron estadísticamente significativos. Excepto entre los tiempos estimados para las ninfas II de las cohortes alimentadas con cucaracha y *R. prolixus*.

El tiempo total de desarrollo de huevo a adulto fue similar para las cohortes alimentadas con roedor y *R. prolixus*, y significativamente mayor respecto a la cohorte alimentada con cucaracha. La longevidad máxima de los adultos se presentó en la cohorte alimentada con cucaracha, siendo la longevidad de los machos significativamente mayor que en las hembras ($p < 0.0001$). Sin embargo, ninguna diferencia estadísticamente significativa se encontró entre las hembras y los machos de cada cohorte alimentadas con roedor o *R. prolixus* ($p > 0.7000$). El máximo tiempo de vida se observó en un macho alimentado con cucarachas, el cual alcanzó una edad de 1155 días (aproximadamente 3,2 años). No se observaron diferencias significativas en la razón sexual ($\text{♀} / (\text{♂} + \text{♀})$) entre las cohortes evaluadas con cada hospedador.

Las tasas de eclosión fueron similares para las cohortes alimentadas con cucaracha (69,4%) y con *R. prolixus* (63.8%), pero más altas que la tasa de eclosión presentada por la cohorte alimentada con roedor (16%). La mortalidad ninfal mostró el clásico patrón piramidal reportado en los Triatominae Medone et al. (2012) con una mayor mortalidad en los estadios juveniles (Tabla 3). La mortalidad ninfal total, desde el primer instar hasta la emergencia del adulto, tuvo valores más aproximados entre las cohortes alimentadas con roedor y *R. prolixus* ($\approx 40\%$) cuando son comparadas con la alimentada con cucaracha (30%).

La Tabla 4 provee el resumen estadístico de los caracteres reproductivos para *B. ferroae* alimentada con cada tipo hospedador. La tasa de fecundidad se estimó como el número promedio de huevos puestos por hembra por periodo reproductivo semanal (huevos/ ♀ /periodo reproductivo semanal), ésta fue estadísticamente significativa entre las cohortes alimentadas con cucaracha (3,2) y roedor (3,6) ($p =$

0,0056), y ambas fueron significativamente más altas que la presentada por la cohorte alimentada con *R. prolixus* (0,8) ($p < 0,0001$). El tiempo promedio en semanas desde huevo a la primera reproducción de la cohorte (α) fue 28,8 37,9 y 53,9 para las cohortes alimentadas con cucaracha, roedor y *R. prolixus*, respectivamente. El periodo reproductivo de cada cohorte estimado a partir de la edad donde ocurrió la primera reproducción a la edad de la última reproducción, fue de 109 semanas para la cohorte alimentada con cucarachas, 95 semanas para la cohorte alimentada con roedor y 87 semanas para la cohorte alimentada con *R. prolixus* (resultados no mostrados en la tabla 3). Cuando se compara el promedio del periodo reproductivo de las hembras (PR, definido como la diferencia promedio entre la última y la primera edad reproductiva de cada hembra), las diferencias entre las cohortes son mayores: la cohorte alimentada con cucarachas presentó un PR de 77,8 semanas (el cual fue 1,8 a 1,9 veces más largo que los PRs de las cohortes alimentadas con roedor y *R. prolixus*, respectivamente) (Tabla 4).

La edad específica de la fecundidad de *B. ferroae* mostró un patrón extremadamente irregular asociado con las tres fuentes de alimentación. El esfuerzo reproductivo promedio de las hembras en relación con la edad se muestra en la Figura 7, después de ajustar los datos a un modelo aditivo generalizado con el objetivo de suavizar los datos y capturar las principales tendencias. Los resultados del análisis de la continuidad en la fecundidad se muestran en la Figura 8. El histograma de las intermitencias entre sucesivas oviposturas se muestran en la Figura 8a; el promedio de intermitencia fue de 1,7 1,4 y 4,6 semanas para las cohortes alimentadas sobre cucaracha, roedor y *R. prolixus*, respectivamente. La Figura 8b muestra la interacción de la intermitencia entre oviposturas (en semanas), el esfuerzo reproductivo total (huevos / ♀ / vida) y la longitud del periodo (en semanas). El contorno de las líneas y las áreas muestran que las posturas comienzan a hacerse más dispersas en el tiempo (mayor intermitencia) conforme decrece el esfuerzo reproductivo y la longitud del periodo reproductivo se incrementa. Esta relación mostró una tendencia dominante, esto es que para un dado esfuerzo reproductivo en términos de fecundidad, una extensión del periodo reproductivo está relacionado con un incremento en las intermitencias de las posturas. Para mostrar esta relación con las diferentes fuentes de alimentación usadas en este estudio, se incorporaron los datos (puntos con diferentes colores) que representan la estrategia de cada una de las 25 hembras de cada cohorte alimentada con un determinado hospedador (Figura 8b).

Tabla 3. Estadísticos vitales de *B. ferroae* alimentado con tres diferentes hospedadores

Estadio	HOSPEDADORES											
	CUCARACHA				ROEDOR				<i>R. prolixus</i>			
	<i>(Blaberus sp. hemolinfa)</i>				<i>(Mus musculus, sangre)</i>				<i>(Hemolinfa o sangre)</i>			
	N	TD	IC 95%	M	N	TD	IC 95%	M	N	TD	Lower-Upper 95% CI	M
Huevo	86	24,3 ^a	23,9 - 24,6	30,6 ^f	88	25,7 ^b	25,4 - 25,9	83,9 ^g	90	24,9 ^c	24,4 - 25,2	36,2 ^f
Ninfa I	67	22,6 ^a	21,4 - 23,7	22,1 ^f	64	38,1 ^b	35,5 - 40,6	27,3 ^f	84	25,3 ^c	24,4 - 26,2	6,7 ^g
Ninfa II	62	22,2 ^a	20,9 - 23,6	7,5 ^f	56	35,9 ^b	33,0 - 38,9	12,5 ^f	71	23,5 ^a	22,5 - 24,6	15,5 ^f
Ninfa III	58	25,9 ^a	24,2 - 27,6	6,4 ^f	54	36,6 ^b	32,9 - 40,2	3,6 ^f	65	27,9 ^c	26,6 - 29,3	8,4 ^f
Ninfa IV	52	30,2 ^a	27,8 - 32,5	10,3 ^f	53	39,7 ^b	36,1 - 43,3	1,8 ^f	64	47,2 ^c	43,7 - 50,6	1,5 ^f
Ninfa V	50	39,0 ^a	36,9 - 41,1	3,8 ^f	51	44,2 ^b	42,3 - 46,2	3,8 ^f	63	75,9 ^c	71,7 - 80,1	1,6 ^f
Ninfa I a V	50	139,7 ^a	135,2 - 144,2	41,9 ^f	51	195,3 ^b	187,0 - 203,5	42,0 ^f	63	199,4 ^c	193,5 - 205,2	30,0 ^f
Macho	25	789,0 ^{a,d}	746,7 - 831,3	-	25	378,8 ^{b,d}	312,5 - 445,1	-	31	399,0 ^{b,d}	317,1 - 480,9	-
Hembra	25	616,7 ^{a,e}	566,4 - 667,1	-	26	371,1 ^{b,d}	303,3 - 438,9	-	32	412,1 ^{b,d}	324,7 - 499,6	-
Adultos	50	702,9 ^a	661,3 - 744,4	-	51	374,9 ^b	326,8 - 423,0	-	63	405,7 ^b	345,0 - 466,4	-
Razón sexual	0,49 ^h				0,59 ^h				0,51 ^h			

N = número de individuos que completaron cada estado. TD = Tiempo promedio de desarrollo y longevidad (días). IC 95% = Intervalo de confianza del 95%, M = porcentaje de mortalidad estado-específica. Razón sexual = ♀/(♂+♀). Valores del tiempo de desarrollo y de la longevidad seguidos por diferentes letras (a, b, c) fueron estadísticamente significativos entre cohortes. Los valores longevidad seguidos por diferente letra (d, e) fueron estadísticamente significativos entre sexos. El número inicial de huevos para el análisis de las tablas de vida fue estimado (ver Materiales y Métodos) como 124, 547, 141 para cucaracha, roedor y *R. prolixus* respectivamente.

Tabla 4. Parámetros reproductivos de *B. ferroae* alimentado con tres diferentes hospedadores.

Aspectos reproductivos	Cucaracha			Roedor			<i>R. prolixus</i>		
	N	m	IC 95%	N	m	IC 95%	N	m	IC 95%
# Huevos/ hembra/ semana. Durante el periodo reproductivo.	1944 [†]	3,2 ^a	3,1 – 3,4	1118 [†]	3,6 ^b	3,4 – 3,7	763 [†]	0,8 ^c	0,7 – 0,9
# huevos/ hembra/por vida	25 [*]	252,8 ^a	222,5 – 283,2	26 [*]	86,5 ^b	55,3 – 117,8	32 [*]	18,7 ^c	10,2 – 27,2
# Promedio de semanas entre la emergencia de la hembra y la primera ovipositura.	25 [*]	6,1 ^a	5,1 – 8,2	25 [*]	6,0 ^a	5,1 – 8,2	19 [*]	19,5 ^b	15,7 – 27,0
# Promedio de semanas desde la emergencia de la hembra hasta la última ovipositura.	25 [*]	83,8 ^a	76,4 – 91,3	25 [*]	50,7 ^b	40,3 – 61,2	19 [*]	59,6 ^c	46,1 – 73,2
# de semanas promedio desde el estadio de huevo a la primera ovipositura.	25 [*]	28,8 ^a	27,4 – 30,1	25 [*]	37,9 ^b	35,6 – 40,2	19 [*]	53,9 ^c	50,4 – 57,3
# de semanas promedio desde el estadio de huevo a la última ovipositura.	25 [*]	105,6 ^a	98,6 – 112,5	25 [*]	81,6 ^b	71,4 – 91,9	19 [*]	93,7 ^a	81,4 – 105,9
Promedio del periodo reproductivo (PR) (semanas)	25 [*]	77,8 ^a	70,1 – 85,1	25 [*]	44,7 ^b	34,3 – 55,2	19 [*]	40,2 ^b	28,5 – 51,8
Intermitencia promedio de las oviposuras (semanas)	25 [#]	1,7 ^a	1,5 – 1,8	23 [#]	1,4 ^a	1,2 – 1,6	15 [#]	4,7 ^b	2,8 – 6,4
Periodo promedio post-reproductivo (semanas)	25 [*]	5,4 ^a	3,9 – 6,8	25 [*]	3,8 ^a	2,3 – 5,4	19 [*]	21,1 ^b	8,9 – 33,3

N = número de observaciones basadas en los siguientes códigos: † = Número total de semanas reproductivas, ♦ = # total de hembras, * = # total de hembras reproductivas, # = # total de hembras con intermitencia reproductiva; m = media. IC = Intervalo de confianza del 95%. Los valores seguidos por diferentes letras (a, b, c) fueron estadísticamente significativos entre cohortes.

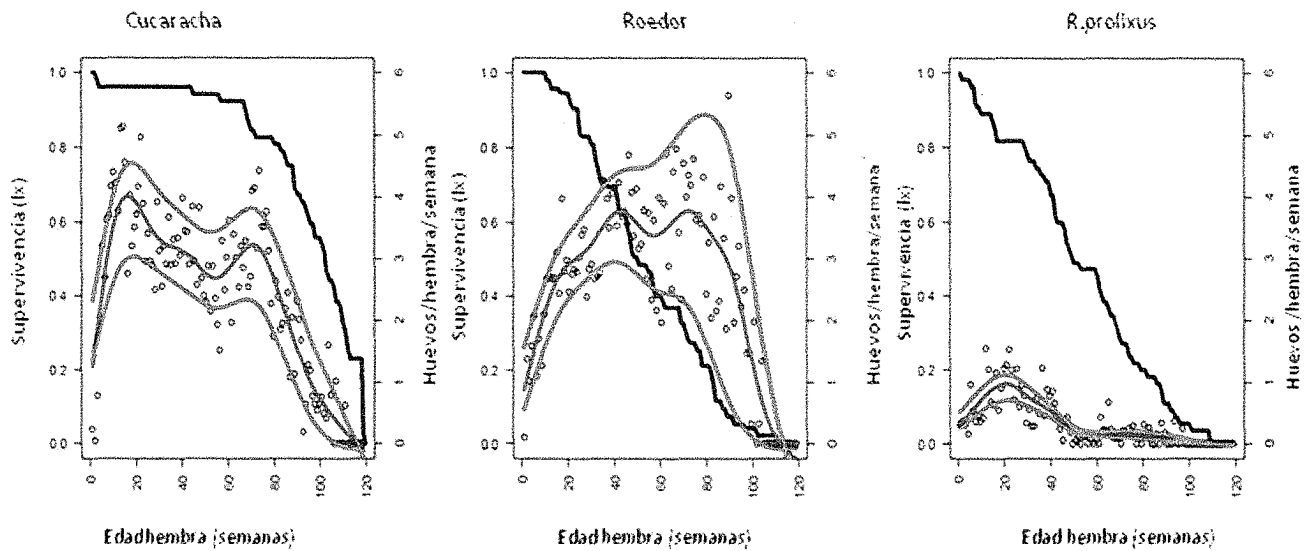


Figura 7. Supervivencia de la hembra edad - específica (l_x , línea negra) y fecundidad edad - específica de la hembra (m_x , puntos) para *B. ferroae* alimentada con cucaracha, roedor y *R. prolixus*. El bootstrap ($N = 1000$), valores m_x (m_x , línea azul) y los correspondientes intervalos de confianza del 95% (líneas en color rojo) fueron ajustadas con un modelo aditivo generalizado (MAG). El eje (semanas) representa la edad del adulto-hembra, los valores l_x representan la supervivencia edad-específica del adulto hembra (inicia con $l_0 = 1$).

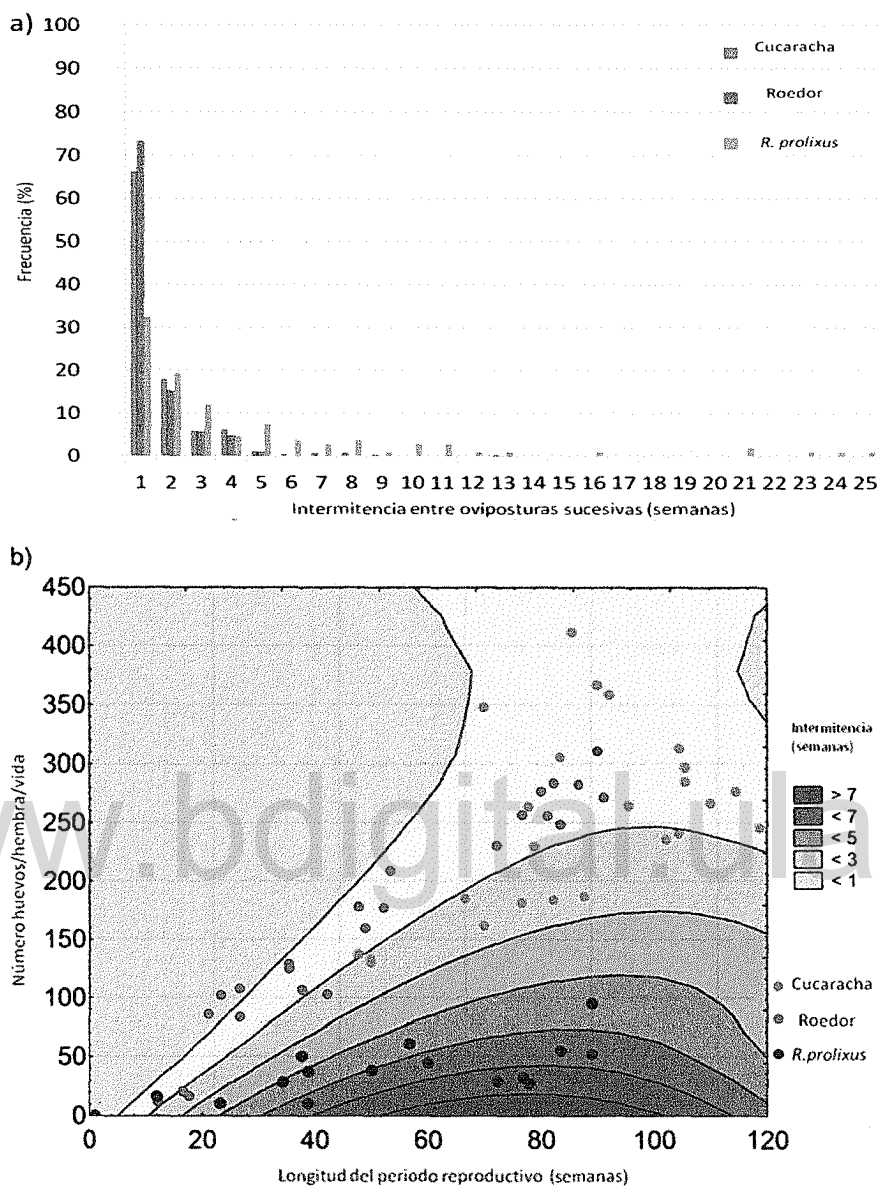


Figura 1. Intermitencia entre posturas (semanas) para la cohorte alimentada con cucaracha, roedor y *R. prolixus*. (a) Distribución de frecuencias de la intermitencia.; (b) Valores de intermitencia dados como áreas coloreadas y sus respectivos contornos delimitados por líneas (las unidades en semanas) asociadas con el esfuerzo reproductivo (huevos/ ♀/por vida) y la longitud del periodo reproductivo. Los puntos representan el valor de cada hembra individual perteneciente a una determinada cohorte e identificada según el color.

6.2 Parámetros de crecimiento poblacional

Los parámetros demográficos obtenidos en *B. ferroae* con cada uno de los hospedadores se muestran en la Tabla 5. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las cohortes alimentadas con los tres hospedadores para los siguientes parámetros de crecimiento poblacional: la tasa intrínseca de incremento natural (r_0), tasa finita de incremento poblacional (λ), y la tasa neta reproductiva (R_0). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las cohortes en términos del tiempo generacional (T_g).

Entre las tres cohortes de *B. ferroae* los adultos mostraron los mayores valores reproductivos (V_x), seguidos por las ninfas de quinto estadio. (Figura 9a). La cohorte alimentada con roedor presentó el máximo valor para ese parámetro y los insectos alimentados con *R. prolixus* el mínimo V_x . Sin embargo, la situación cambió cuando el valor reproductivo se expresó como valores relativos (normalizado al 100%) (Figura 9b). Lo cual indicó que la cohorte alimentada con *R. prolixus* presenta los valores reproductivos más elevados, mientras que las cohortes alimentadas con cucaracha y roedor presentan valores similares.

En la distribución estable por estadio (DEE) los huevos fueron el estadio dominante en las cohortes alimentadas con cucaracha y roedor (en la clásica forma piramidal), mientras en la cohorte alimentada con *R. prolixus*, los adultos representaron el estadio dominante (Figura 10).

Tabla 5. Parámetros de crecimiento poblacional estimados en *B. ferroae* alimentada con tres diferentes hospedadores.

Parámetros Demográficos	Cucarachas			Roedores			<i>R. prolixus</i>		
	N	m	IC 95%	N	m	IC 95%	N	m	IC 95%
Tiempo generacional (T_g)	50	66,6 ^a	63,7 - 69,0	51	65,9 ^a	61,2 - 69,9	63	68,7 ^a	65,7 - 72,8
Tasa Neta Reproductiva (R_0)	50	107,5 ^a	82,4 - 132,5	51	14,9 ^b	10,6 - 20,1	63	10,3 ^b	6,5 - 15,1
Tasa intrínseca de incremento natural (r_0)	50	0,1015 ^a	0,0927 - 0,184	51	0,0476 ^b	0,0404 - 0,054	63	0,0361 ^c	0,028 - 0,0423
Tasa finita de incremento poblacional (λ)	50	1,107 ^a	1,097 - 1,115	51	1,049 ^b	1,041 - 1,055	63	1,028 ^c	1,028 - 1,043
Tasa instantánea de nacimiento (b)	50	0,1608	-	51	0,1863	-	63	0,0712	-
Tasa instantánea de muerte (d)	50	-0,0593	-	51	-0,1388	-	63	-0,0351	-
Índice de Éxito de Colonización	50	0,6312	-	51	0,2550	-	63	0,5067	-
Tasa de mortalidad ($1/e_0$)	50	0,0027	-	51	0,0116	-	63	0,0031	-

N = número de adultos en la cohorte, m = media, IC = Intervalo de confianza del 95%, e_0 = expectativa de vida al nacer (en semanas). Los valores seguidos por diferentes letras (a, b, c) fueron estadísticamente significativas entre cohortes.

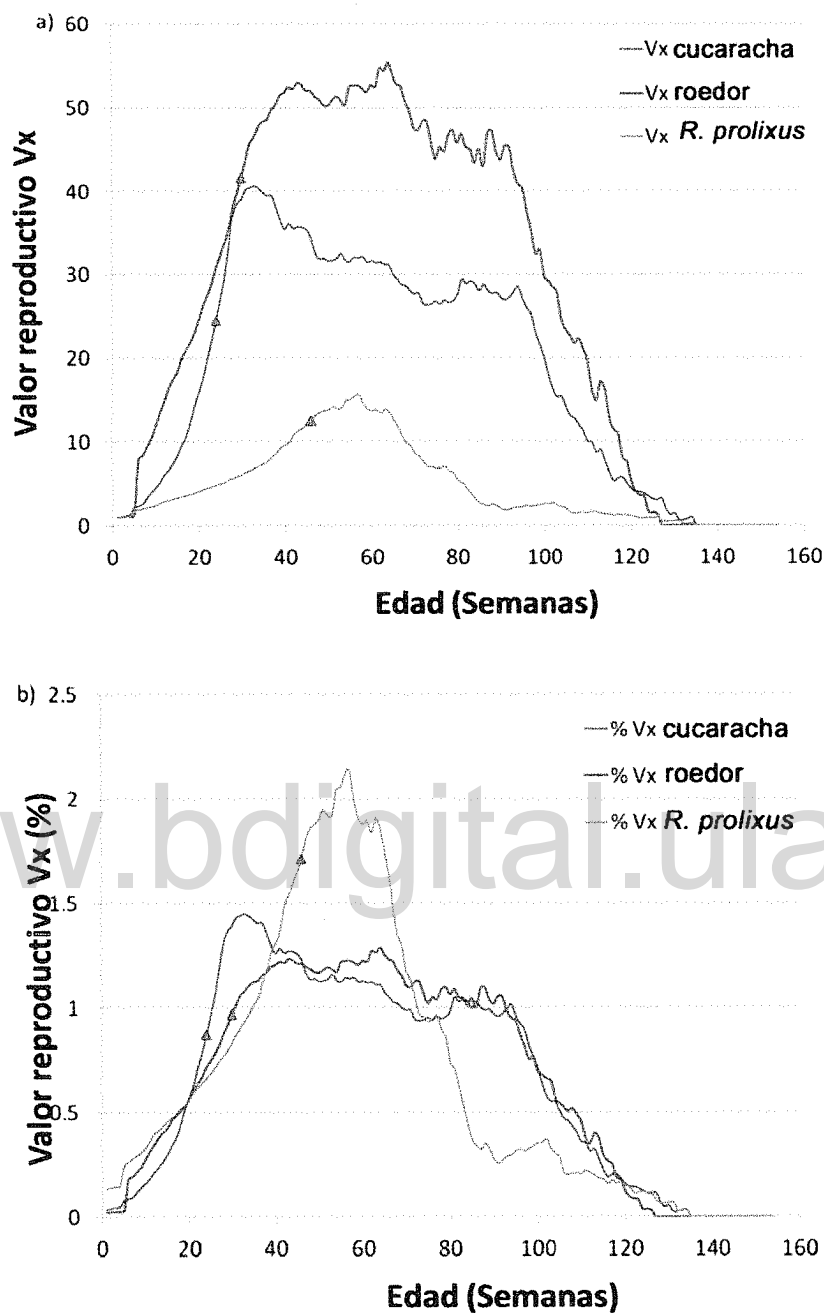


Figura 9. Valores reproductivos edad - específicos para *B. ferroae* alimentada con cucaracha, roedor y *R. prolixus*. (a) en unidades aritméticas; (b) cada cohorte escalada a su valor relativo (en %) respecto a su propio máximo. El inicio del V_x (triángulo rojo) fue alcanzado en 24, 30 y 46 semanas en la cohorte alimentada con cucaracha, roedor y *R. prolixus* respectivamente.

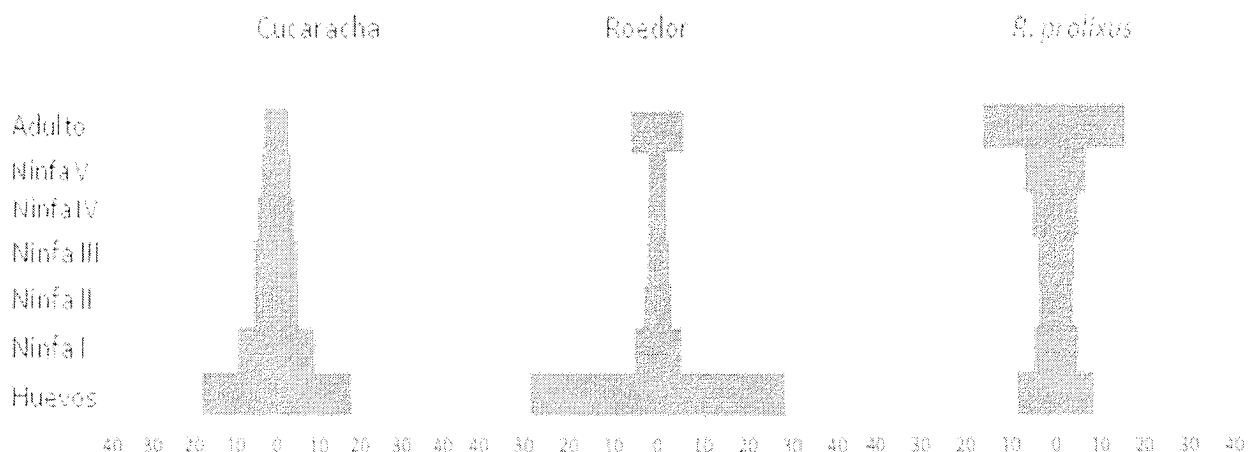


Figura 10. Distribución estable de las edades para las diferentes cohortes de *B. ferroae* alimentadas con cucaracha, roedor y *R. prolixus*. El eje x representa la proporción de cada estado como porcentaje.

7. Discusión

Los resultados de esta investigación en *B. ferroae* se corresponden con el bajo desempeño reportado para las colonias de laboratorio de *B. herreri* alimentadas con *R. prolixus* (Sandoval et al. 2000). Mientras los estadios ninfales (I, II and III) de *B. ferroae* se desarrollan sin mayores dificultades cuando se alimentan con *R. prolixus*, esto mismo no sucede con las ninfas de IV y V estadio, las cuales presentaron los mayores tiempos de desarrollo de las tres cohortes (Tabla 3). Es probable que la ninfa de quinto estadio de *R. prolixus* represente una presa pequeña para los estadios avanzados de *B. ferroae*, y quizá sea difícil para ninfas de este tamaño extraer una ingesta completa. Adicionalmente, no podemos excluir la posibilidad de que ninfas de quinto estadio de *R. prolixus* pudiesen exhibir comportamientos defensivos debido a que su supervivencia podría estar seriamente comprometida.

Los adultos de *B. ferroae* probablemente se enfrentaron a similares dificultades cuando se alimentaron con *R. prolixus*, lo cual pudo causar la demora en la edad de la primera reproducción de las hembras y el declive de los demás caracteres reproductivos, como la tasa neta reproductiva (R_0), la tasa intrínseca de incremento natural (r_0) y la tasa finita de incremento poblacional (λ) en comparación con los otros dos hospedadores (Tabla 4).

La edad promedio de la primera reproducción (α) es un parámetro particularmente importante en la dinámica poblacional, porque tiene una fuerte influencia sobre las tasas de crecimiento demográfico (a menor valor de α , mayor tasa de crecimiento). Las cohortes alimentadas con roedor y *R. prolixus* mostraron similares y mayores valores de α que la cohorte alimentada con cucaracha. Esto implica un mayor *fitness* y sugiere una mayor adaptación de *B. ferroae* a las cucarachas como fuente de alimento.

La similaridad en la razón sexual entre las diferentes cohortes sugiere que las hembras y los machos presentan el mismo riesgo relativo de mortalidad durante el desarrollo cuando alimentado con cualquiera de los hospedadores bajo estudio.

La significativa demora en los tiempos de desarrollo de ninfas jóvenes (I, II y III) cuando se alimentaron sobre roedores (Tabla 3), refleja una mayor dificultad para ejercer la hematofagia. Las ninfas de primer estadio mostraron un mayor número de ingestas sanguíneas cuando comparados con otros estadios (datos no mostrados), lo cual es inusual en Triatominae (Emmanuelle-Machado et al. 2002, Martínez-Ibarra et al. 2003, Rocha et al. 2004, Arévalo et al. 2007, Martínez-Ibarra et al. 2007). En la especie *T. circummaculata*, la cual fue encontrada en asociación con cucarachas de los géneros *Hiereoblatta* y *Blaptica*, se observó una alta mortalidad de ninfas de primer estadio al alimentarlas con hospedadores vertebrados (ave y reptil) (Ruas-Neto et al. 2001). En *T. rubrovaria*, el desarrollo del ciclo desde huevo a adulto se ve seriamente comprometido cuando alimentado exclusivamente con hospedadores invertebrados (cucarachas), resultando en una mortalidad cercana al 90% (Lorosa et al. 2000). Este nivel de mortalidad fue similar al obtenido en *B. ferroae* con el hospedador vertebrado (91%). En contraste, las dos cohortes de *B. ferroae* alimentadas con artrópodos desarrollaron el ciclo de huevo a adulto, con mortalidades entre 56% y 60%. Lo cual fue similar, o menor que las tasas de mortalidad reportadas para otras especies de Triatominae, alimentadas con hospedadores vertebrados (Bar et al. 2003, Martínez-Ibarra et al. 2003, Martínez-Ibarra et al. 2007, Villacís et al. 2008).

El desempeño reproductivo de las hembras, esto es el número total de huevos puestos por hembra y la duración del periodo reproductivo, podría ser afectado y variar con la fuente de alimento (Guarneri et al. 2000, Nattero et al. 2011). De hecho, se observó un efecto en la intermitencia entre las posturas: *B. ferroae* alimentado con roedor no mostró diferencias significativas en la intermitencia entre dos sucesivos periodos reproductivos al compararlos con los insectos alimentados con cucaracha (Tabla 4),

y la curva de maternidad fue similar a la reportada para otras especies de Triatominae criadas en condiciones de laboratorio (Rabinovich 1972, Feliciangeli & Rabinovich 1985, Rabinovich & Nieves 2011). A pesar de las diferencias nutricionales entre los dos hospedadores (cucaracha y roedor), el ritmo de oviposición fue similar en *B. ferroae*. Sin embargo, en la cohorte alimentada con roedor el periodo reproductivo y la tasa de eclosión de los huevos fueron significativamente más reducidos al compararlos con la cohorte alimentada con cucaracha. Este hallazgo parece reflejar un mayor costo reproductivo en *B. ferroae* cuando se alimenta con sangre. La relación entre la longitud del periodo reproductivo, el número de huevos puestos por hembra en su vida y el lapso de las intermitencias entre las posturas en los insectos alimentados con *R. prolixus* fue muy diferente al presentado por *B. ferroae* con los otros dos hospedadores. Las hembras alimentadas con *R. prolixus* realizaron sus posturas de una manera altamente intermitente (ver valores promedio en la Tabla 4, Figura 8b), y la regresión lineal entre el esfuerzo reproductivo y el periodo reproductivo presentó una pendiente más pequeña. Estos resultados junto a un mayor intervalo entre dos sucesivos periodos reproductivos (aproximadamente 4,5 semanas), los prolongados tiempos pre y post reproductivos y la menor tasa de fecundidad, parecen reforzar la hipótesis que individuos de *B. ferroae* alimentados con *R. prolixus* no pueden acceder a una ingesta completa, que les permita responder de la misma manera que los individuos alimentados con cucaracha y roedor. Aunque estas dos últimas cohortes exhiben similares valores de intermitencia, las hembras de *B. ferroae* alimentadas con cucaracha parecen exhibir una relación más variable entre el esfuerzo reproductivo y el periodo reproductivo. También muestran una mayor variabilidad entre sus valores de intermitencia que cuando se alimentan con roedor, lo cual parece sugerir la existencia de una mayor plasticidad dependiendo del hospedador. Determinar si éste tipo de *trade-off* es una ventaja evolutiva podría requerir futuros experimentos basados posiblemente en un análisis energético.

Las diferencias significativas en fertilidad (tasas de eclosión), el desarrollo embrionario, los tiempos de desarrollo ninfal y la longevidad (Tabla 3), y el periodo reproductivo promedio de las hembras (Tabla 4) entre las cohortes sugieren una clara desventaja demográfica cuando se alimenta con roedor al compararlo con el hospedador invertebrado (cucaracha). Estas diferencias sugieren un limitado desempeño de *B. ferroae* asociado con el vertebrado, al menos en términos de un bajo *fitness* poblacional. Estos resultados indican que la sangre, a pesar de su alto contenido proteico, no parece ser la fuente de alimentación más adecuada para esta especie.

Estudios previos han mostrado que la sangre representa una dieta deficiente en factores esenciales como la vitamina B (Lehane 2005). Para sobrepasar este problema, los insectos hematófagos evolucionaron al reclutar simbioses que les aportasen esa vitamina (Schaub & Eichler 1998). En Triatominae la aposimbiosis induce efectos deletéreos, entre los cuales se incluye retardo en el desarrollo ninfal, incremento en la tasa de mortalidad, problemas en la digestión sanguínea y en la excreción, además reducción del sistema traqueal (Eichler & Schaub 2002).

En los insectos adultos, la aposimbiosis normalmente no afecta su estado general de salud, pero sí el desempeño reproductivo. En las hembras de la mosca tsetse se ha demostrado esterilidad por aposimbiosis (Lehane 2005).

Otros factores asociados a la dieta sanguínea están relacionados con la digestión de la hemoglobina, la cual genera grandes cantidades de moléculas del grupo hemo, que pueden ejercer daño biológico por su potencial citotóxico (Maya-Monteiro et al. 2004, Graça-Souza et al. 2006, Donohue et al. 2009). La liberación masiva de moléculas de hemo representa una presión selectiva que deberá ser contrarrestada por la generación de una serie de protecciones o mecanismos de defensa de tipo adaptativo. Mecanismos de defensa contra hemo libre, altamente tóxico, han sido identificados en *R. prolixus* (Graça-Souza et al. 2006) y en los huevos de la garrapata del ganado *Boophilus microplus* (Logullo et al. 2002). En este artrópodo, el mayor componente proteico del huevo, la vitelina, además de suplir como fuente de aminoácidos para el desarrollo del embrión, tiene un papel importante en el almacenamiento seguro del grupo hemo, que impide la peroxidación lipídica y protege al embrión del daño oxidativo.

Por lo tanto, la esterilidad, debida a un desbalance en la dieta y/o por estrés oxidativo podría estar implicada en la baja fertilidad de los huevos de *B. ferroae* en la cohorte alimentada con roedor. Una tasa de eclosión (fertilidad) tan baja como la observada en *B. ferroae* alimentado con roedor (16%), no había sido reportada antes en especies de Triatominae alimentadas con hospedadores vertebrados (55-100%) (Felicangeli & Rabinovich 1985, Cabello & Galíndez 1998, Guarneri et al. 2000, Martínez-Ibarra et al. 2003, Aldana et al. 2004, Arévalo et al. 2007, Martínez-Ibarra et al. 2007).

Respecto al valor reproductivo edad - específico, este involucra entre sus componentes reproducción, y supervivencia edad específicas, y es difícil poder establecer cuáles de estos caracteres de la historia de

vida, proveen una contribución dominante para el V_x . Las estimaciones más altas para el V_x se observaron en la cohorte alimentada con roedor y podrían atribuirse a la baja probabilidad de supervivencia que presentan estos insectos, lo cual incrementa la importancia del valor reproductivo en esta cohorte.

El éxito de la colonización estimado como r_0/b , se incrementa no únicamente cuando r_0 es mayor, si no también cuando la tasa de mortalidad (d) disminuye (MacArthur & Wilson 1967). Aunque la cohorte alimentada con *R. prolixus* mostró una tasa r_0 significativamente baja con relación a los valores de las cohortes alimentadas con cucaracha y roedor. En el éxito de colonización no se observaron diferencias significativas con respecto a las otras dos cohortes, lo cual se explica por la baja tasa de mortalidad presentada ($d = 0.0351$) en relación con la cohorte alimentada con cucaracha ($d = 0.0593$). La mayor probabilidad de éxito en la colonización de nuevos ambientes, observada en las cohortes que tienen como fuente de alimento la hemolinfa, provee un indicio adicional, en el sentido que los artrópodos quizás sean los hospedadores naturales de *B. ferroae*.

El análisis de la historia de vida de la especie *B. ferroae* con diversos hospedadores como (cucaracha, roedor y el triatmino *R. prolixus*) reveló un mayor *fitness* (medido como r_0) cuando se alimentó con cucarachas. Estos resultados son consistentes con el hecho que el 96% de los contenidos intestinales de *B. herreri* capturado dentro de los domicilios, reaccionaron al antisero de *P. americana* (Sandoval et al. 2004). Adicionalmente, en un estudio realizado en Norte de Santander, Colombia, el 89,6% de los contenidos intestinales de una muestra de *B. ferroae*, mostró reacción positiva contra el antisero de *P. americana*, mientras una pequeña proporción reaccionó a antiseros de vertebrados (Sandoval et al. 2010). Para concluir, el éxito de colonización, relacionado con un *fitness* más alto (mayor r_0) fue exhibido por la cohorte alimentada con cucarachas, lo cual refuerza la hipótesis que estos artrópodos podrían ser los hospedadores naturales de *B. ferroae* y se demuestra por primera vez, de manera experimental, la existencia de un Triatominae sin un hábito hematofágico obligado.

8. Referencias

1. Aldana E, Lizano E 2004. Defecation index and reproductive success of *Triatoma maculata* (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions. *Rev Biol Trop* 52: 927-930.

2. Arévalo A, Carranza JC, Guhl F, Clavijo JA, Vallejo GA 2007. Comparación del ciclo de vida de *Rhodnius colombiensis* Moreno, Jurberg & Galvão, 1999 y *Rhodnius prolixus* Stal, 1872 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) en condiciones de laboratorio. *Biomédica* 27: 119-129.
3. Bar ME, Oscherov EB, Milano AMF, Damborsky M 2003. Ciclo de vida de *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Heteroptera: Reduviidae) bajo condiciones de laboratorio. *Facena* 19:87-95.
4. Birch L C 1948. The Intrinsic Rate of Natural Increase of an Insect Population. *J Anim Ecol* 17:15-26.
5. Burch TK 2003. Demography in a new key: A theory of population theory. *Demogr Res* 9: 263-284.
6. Cabello DR, Galíndez I 1998. Vital statistics of *Panstrongylus geniculatus* (Latreille 1811) (Hemiptera: Reduviidae) under experimental conditions. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93:257-262.
7. Cabello DR, Lizano E, Valderrama A 1987. Vital statistics of *Rhodnius neivai* Lent, 1953 (Hemiptera: Reduviidae) under experimental conditions. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 82:511-24.
8. Campuzano-Martínez A, Rodríguez-Maciel J, Lagunes-Tejeda A, Llanderal-Cázares C, Terán-Vargas A, Vera-Graziano J, Vaquera-Huerta H, Silva-Aguayo G 2010. Aptitud biológica de poblaciones de *Bemisia tabaci* (Gennadius) Biotipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) con diferente susceptibilidad al insecticida Thiametoxam. *Neotropical Entomol* 39: 430-435.
9. Carey J 2001. Insect biodemography. *Annu Rev Entomol* 46: 79-110
10. Carey JR 1993. Applied Demography for Biologists with Special Emphasis on Insects. 1st ed., Oxford University Press, New York, 206 pp.
11. Caswell H 2010. Reproductive value, the stable stage distribution, and the sensitivity of the population growth rate to changes in vital rates. *Demogr Res* 23: 531-548.
12. Charlesworth B 1980. Evolution in Age-structured Populations. Cambridge University Press, Cambridge, 300 pp.
13. Dewil S, Chesson P 2004. Age-structured population growth rates in constant and variable environments: a near equilibrium approach. *Theor Popul Biol* 65: 75-88.
14. Donohue KV, Khalil SM, Sonenshine DE, Roe RM 2009. Heme-binding storage proteins in the Chelicerata. *J Insect Physiol* 55: 287-296.

15. Eichler S, Schaub GA 2002. Development of symbionts in triatomine bugs and the effects of infections with trypanosomatids. *Exp Parasitol* 100: 17-27.
16. Emmanuelle-Machado P, Koerich LB, Joukoski Dde B, Carvalho-Pinto CJ, Grisard EC, Steindel M 2002. Biology of *Triatoma klugi* Carcavallo, Jurberg, Lent & Galvão 2001 (Heteroptera: Reduviidae) under laboratory conditions: effects of distinct blood sources and susceptibility to *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 583-587.
17. Feliciangeli MD, Rabinovich JE 1985. Vital Statistics of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) under Laboratory Conditions. II. *Triatoma maculata*. *J Med Entomol* 22: 43-48.
18. Ghilini JM 1983. Estadísticas vitales de *Triatoma breyeri* Del Ponte 1929 (Hemiptera-Reduviidae) bajo condiciones de laboratorio. *Rev Soc Entomol Argent* 42: 101-111.
19. Graça-Souza AV, Maya-Monteiro C, Paiva-Silva GO, Braz GR, Paes MC, Sorgine MH, Oliveira MF, Oliveira PL 2006. Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. *Insect Biochem Mol Biol* 36: 322-335.
20. Guarneri AA, Pereira MH, Diotaiuti L 2000. Influence of the blood meal source on the development of *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma sordida*, and *Triatoma pseudomaculata* (Heteroptera, Reduviidae). *J Med Entomol* 37: 373-379.
21. Herrer A, Lent H, Wygodzinsky P 1954. Contribución al conocimiento del género *Belminus* Stal, 1859 (Triatominae, Reduviidae, Hemiptera). *An Inst Med Reg Univ Tucumán* 4: 85-106.
22. Iranipour S, Farazmand A, Saber M, JafarlooM, Mashhadi M 2009. Demography and life history of the egg parasitoid, *Trichogramma brassicae*, on two moths *Anagasta kuehniella* and *Plodia interpunctella* in the laboratory. *J Insect Sci* 9:1-8. doi: 10.1673/031.009.51019:51.
23. La Rossa F, Vasicek A, López M, Mendy M, Paglioni A 2005. Biología y demografía de *Brevicoryne brassicae* (L) (Hemiptera. Aphididae) sobre cuatro variedades de *Brassica oleracea* en condiciones de laboratorio. *RIA* 34: 105-114.
24. Lehane MJ 2005. The Biology of Blood-Sucking in Insects, 2nd ed., Cambridge University Press, Cambridge, 320 pp.
25. Lent H, Wygodzinsky P 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. *Bull Am Mus Nat Hist* 163: 123-520.

26. Logullo C, Moraes J, Dansa-Petretski M, Vaz IS, Masuda A, Sorgine MH, Braz GR, Masuda H, Oliveira PL 2002. Binding and storage of heme by vitellin from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect Biochem Mol Biol* 32: 1805-1811.
27. Lorosa ES, Jurberg J, Souza AL, Vinhaes MC, Nunes IM 2000. Hemolinfa de Dictyoptera na manutenção do ciclo biológico silvestre de *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) e *Triatoma circummaculata* (Stal, 1859) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Entomol Vect* 7: 287-296.
28. Lotka A J 1907. Relation between birth rates and death rates. *Science* 26: 2 1-22.
29. MacArthur RH, Wilson EO 1967. The Theory of Island Biogeography, 1st ed., Princeton University Press, New Jersey, 203 pp.
30. Martínez-Ibarra JA, Alexandre-Aguilar R, Paredes-González E, Martínez-Silva MA, Solorio-Cibrián M, Noguera-Torres B, Trujillo-Contreras F, Novelo-López M 2007. Biology of three species of North American Triatominae (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) fed on rabbits. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 925-930.
31. Martínez-Ibarra JA, Novelo López M, Hernández Robles M del R, Grant Guillén Y 2003. Influence of the blood meal source on the biology of *Meccus picturatus* Usinger 1939 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) under laboratory conditions. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 227-232.
32. Maya-Monteiro CM, Alves LR, Pinhal N, Abdalla DS, Oliveira PL 2004. HeLp, a heme-transporting lipoprotein with an antioxidant role. *Insect Biochem Mol Biol* 34: 81-88.
33. MedCalc 2012. MedCalc Software bvba, Broekstraat 52, 9030 Mariakerke, Belgium (Version 12.3.0.0).
34. Medone P, Rabinovich J, Nieves E, Ceccarelli S, Canale D, Stariolo RL, Menu F 2012. The Quest for Immortality in Triatomines: A Meta-Analysis of the Senescence Process in Hemimetabolous Hematophagous Insects. In T Nagata, Senescence, InTech, Croatia, p. 225-250.
35. Nattero J, Leonhard G, Rodríguez CS, Crocco L 2011. Influence of the quality and quantity of blood ingested on reproductive parameters and life-span in *Triatoma infestans* (Klug). *Acta Trop* 119: 183-187.
36. Oscherov EB, Bar ME, Damborsky MP, Milano AM 2005. Population statistics of *Triatoma rubrovaria* in laboratory. *Arq Fac Hig Saude Publica Univ Sao Paulo* 39: 211-216.

37. Oscherov EB, Damborsky MP, Bar ME, Porcel E 1996. Population statistics of *Triatoma sordida* Stål 1859 (Hemiptera:Reduviidae) in experimental conditions. *Arq Fac Hig Saude Publica Univ Sao Paulo* 30: 438-443.
38. R Development Core Team 2007. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available from <<http://www.R-project.org>>
39. Rabinovich 1978. Ecología de Poblaciones Animales. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico, Secretaría general de la Organización de Estados Americanos. Monografía 1, Washington D. C., 114 pp.
40. Rabinovich J 1974. Demographic Strategies in Animal Populations: A Regression Analysis. In Golley FB, Medina E, Tropical Ecological Systems. Springer-Verlag, New York, p.19-40.
41. Rabinovich JE 1972. Vital statistics of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions. I. *Triatoma infestans* Klug. *J Med Entomol* 9: 351-370.
42. Rabinovich JE, Dan Kitron U, Obed Y, Yoshioka M, Gottdenker N, Chaves LF 2011. Ecological Patterns of Blood-Feeding by Kissing-Bugs (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106: 479-494.
43. Rabinovich JE, Nieves EL 2011. Vital statistics of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions: III. *Rhodnius neglectus*. *J Med Entomol* 48: 775-787.
44. Rocha Dda S, dos Santos CM, Cunha V, Jurberg J, Galvão C 2004. Ciclo biológico em laboratório de *Rhodnius brethesi* Matta, 1919 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), potencial vetor silvestre da doença de Chagas na Amazônia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 591-595.
45. Rodriguez D, Rabinovich J 1980. The effect of the density on some population parameters of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions. *J Med Entomol* 17: 165-171.
46. Ruas-Neto AL, Corseuil E, Cavalleri A 2001. Development of rupestrian triatomines (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) following haemolymphagy on blaberids (Blattodea: Blaberidae) in Rio Grande do Sul State, Brazil. *Entomol Vect* 8: 205-216.
47. Sandoval CM, Duarte R, Gutiérrez R, Rocha Dda S, Angulo VM, Esteban L, Reyes M, Jurberg J, Galvão C 2004. Feeding sources and natural infection of *Belminus herreri* (Hemiptera,

- Reduviidae, Triatominae) from dwellings in Cesar, Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 137-140.
48. Sandoval CM, Joya MI, Gutierrez R, Angulo VM 2000. Cleptohaematophagy of the Triatomine bug *Belminus herreri*. *Med Vet Entomol* 14: 100-101.
49. Sandoval CM, Ortiz N, Jaimes D, Lorosa E, Galvão C, Rodriguez O, Scorza JV, Gutiérrez R 2010. Feeding behaviour of *Belminus ferroae* (Hemiptera: Reduviidae), a predaceous Triatominae colonizing rural houses in Norte de Santander, Colombia. *Med Vet Entomol* 24: 124-131.
50. Sandoval CM, Pabón E, Jurberg J, Galvão C 2007. *Belminus ferroae* n. sp. from the Colombian north-east, with a key to the species of the genus (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Zootaxa* 1443: 55-64.
51. Schaub GA, Eichler S 1998. The effects of aposymbiosis and of an infection with *Blastocrithidia triatomae* (Trypanosomatidae) on the tracheal system of the reduviid bugs *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans*. *J Insect Physiol* 44: 131-140.
52. Schofield CJ, Galvão C 2009. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Trop* 110: 88-100.
53. Vasicek A, La Rossa F, Paglioni A, Mendy P 2003. Biological and populational functionality of *Aulacorthum solani* (Kaltenbach) (Homoptera: Aphididae) on vegetables hosts under laboratory conditions. *Bol San Veg Plagas* 29: 359-365.
54. Villacís AG, Arcos-Terán L, Grijalva MJ 2008. Life cycle, feeding and defecation patterns of *Rhodnius ecuadoriensis* (Lent & León 1958) (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) under laboratory conditions. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 690-695.

Capítulo III. Análisis de la plasticidad fenotípica alar en *B. ferroae* alimentada con dos potenciales hospedadores: un artrópodo (*Blaberus* sp.) y un vertebrado (*Mus musculus*).

1. Plasticidad fenotípica

La plasticidad fenotípica es definida como la habilidad de un organismo para expresar diferentes fenotipos en respuesta a distintos factores bióticos o abióticos (Andersson et al. 2006). Otros autores la definen como la capacidad de un genotipo para exhibir un rango de fenotipos en respuesta a la variación ambiental (Fordyce 2006). El concepto de plasticidad fenotípica fue aplicado primero a caracteres de tipo morfológico (Schlichting & Pigliucci 1998) y algunos autores aún lo relacionan exclusivamente con la morfología (Whitman & Agrawal 2009). Sin embargo, la plasticidad también es fisiológica, pues siempre tiene que ver con una fisiología alterada, e incluso puede manifestarse a través de cambios bioquímicos, moleculares, morfológicos, de comportamiento o de historia de vida en respuesta al ambiente (Agrawal 2001, Whitman & Agrawal 2009).

Su estudio, puede incluir desde diseños con algunas formas de estructura genética (clones, isofamilias, etc) y tratamientos experimentales que son extremadamente poderosos. Sin embargo, no es indispensable conocer la estructura genética para estudiar la plasticidad. Un simple diseño donde algunos individuos de una especie son asignados al azar a diferentes ambientes, puede producir un buen estimado de la plasticidad (Whitman & Agrawal 2009).

Según Agrawal (2001), la plasticidad fenotípica puede ser un eje de predicción que permite dar explicaciones a la variación fenotípica en los diversos escenarios ecológicos. Es un fenómeno biológico que a través de su expresión permite monitorear los patrones existentes en las especies o poblaciones y asociarlos con el origen geográfico (Jirakanjanakit & Dujardin 2005, Sadeghi et al. 2009, Cassel-Lundhagen et al. 2009), el hábitat (Debat et al. 2008) y las cadenas tróficas (Langerhans & Dewitt 2002, Khiaban et al. 2010, Mozaffarian et al. 2007, Soto et al. 2007, Andersson et al. 2006, Figueirido et al. 2008, Muschick et al. 2011).

En Triatominae se reconoce, desde hace algunas décadas, la existencia de plasticidad fenotípica en las poblaciones de este grupo de insectos (Dujardin et al. 1999a). Esto significa que su morfo-fisiología puede ser modulada por diversos factores ecológicos y generalmente se correlaciona bien con la eco-geografía, el hábitat y las preferencias por el hospedador (Dujardin et al. 2008).

1.2 Estudio de la plasticidad fenotípica en Triatominae en diversos contextos ecológicos

En situaciones naturales diversas variables pueden interactuar para constituir patrones de plasticidad (Andersson et al. 2006). En Triatominae se conoce que cada hábitat colonizado por estos insectos, puede diferir en el número y el tipo de hospedadores, en la estructura física (materiales y dimensiones) y en los parámetros climáticos (Hernández et al. 2013). El análisis de la expresión de la plasticidad morfológica en estos vectores, ha sido una estrategia útil en la identificación de las potenciales fuentes de reinfestación de los domicilios y/o peridomicilios, previa implementación de los programas de control vectorial, en zonas endémicas para *T. infestans* en Argentina (Dujardin et al. 1997, Schachter-Broide et al. 2004, Hernández et al. 2013) y en regiones infestadas por *R. prolixus* en Venezuela (Feliciangeli et al. 2007).

Igualmente, este tipo de análisis ha adquirido importancia en el estudio de la estructuración fenotípica de las poblaciones entre los hábitats domésticos y peridomésticos (Abraham et al. 2008, Torres et al. 2010, Batista et al. 2012) y en el estudio de su dinámica, al permitir interpretar la movilidad de las poblaciones entre los hábitats y evaluar el potencial de dispersión entre las áreas endémicas (Hernández et al. 2011).

Otros aportes del estudio de la plasticidad fenotípica en este grupo, han sido en el análisis de la divergencia geográfica (Bustamante et al. 2004), la puesta a prueba de hipótesis de divergencia taxonómica en especies de Triatominae (Villegas et al. 2002, Gumiel et al. 2003) y la asociación de los patrones de heterogeneidad morfológica en *T. infestans* con las variaciones estacionales (Schachter-Broide et al. 2009).

1.3 Estudio de la plasticidad fenotípica de los Triatominae en condiciones de laboratorio

En el proceso de transición de las poblaciones de triatomíneos silvestres al ambiente doméstico, es más frecuente observar cambios de tipo morfológico que genético (Caro-Riaño et al. 2009). Entre los cambios morfológicos más importantes se destaca la reducción en el tamaño de los insectos y la pérdida de dimorfismo sexual (Zeledón 1981, Dujardin et al. 1999b, Torres et al. 2010). El análisis de la plasticidad fenotípica bajo condiciones simuladas ha permitido poner a prueba las hipótesis que explican los cambios generados en el crecimiento durante la transición entre los ambientes (Catalá et al. 2004, Caro-Riaño et al. 2009).

1.4 Uso potencial del análisis de la plasticidad fenotípica en *B. ferroae* para predecir el principal hospedador en los domicilios

En las áreas endémicas para la enfermedad de Chagas es importante que el sistema de la vigilancia entomológica, además de tener la capacidad de detectar las infestaciones por triatomíneos, también permita predecir el origen de las mismas. Algunos estudios muestran avances interesantes en este aspecto, mediante la caracterización morfológica de las poblaciones pre y post intervención (Schachter-Broide et al. 2004, Feliciangeli et al. 2007, Hernández et al. 2013). Estos análisis generalmente se plantean sobre la hipótesis, que descendientes de una población residual deberían ser más similares a la población pre-intervenida que a cualquier otra; en caso de comprobarse lo contrario, otras poblaciones vecinas estarían implicadas en la colonización de los ecotopos intervenidos y se descartarían posibles fallas, relacionadas con la aplicación de las herramientas de control (Hernández et al. 2013). Dujardin et al. (2006) a través de un análisis morfométrico del ala, en la especie *Triatoma protracta*, demostraron que la atribución correcta de un individuo a su línea paterna fue cuatro veces mayor de lo esperado al azar; con estos resultados se dio respaldo a la hipótesis de similaridad entre los parentales y sus descendientes, además se logró demostrar el desempeño de la técnica. Schachter-Broide et al. (2004) señalan una alta confiabilidad en el uso de la morfometría geométrica, particularmente cuando los insectos comparados provienen de generaciones contemporáneas.

Si consideramos la importancia ecológica que puede tener el hospedador en los insectos, al influir tanto en la morfología, como en el desarrollo y la aptitud biológica o *fitness* de una especie (Mackay et al.

2004, Soto et al. 2007, Dorchin et al. 2009), es viable intentar identificar, a través de este enfoque metodológico y de la expresión del fenómeno de la plasticidad fenotípica en los triatominos (Dujardin et al. 1999a), el hospedador de *B. ferroae* en los domicilios, lo cual se corresponderá con la viabilidad del ciclo de vida de la especie con ese hospedador. Esta posibilidad además se sustenta en el desempeño que tiene la morfometría geométrica como herramienta para predecir el origen de un individuo o una población. Esto puede ser posible al comparar el fenotipo de laboratorio con el fenotipo capturado en el ambiente domiciliar. Bajo la hipótesis de que los descendientes de laboratorio tendrían un fenotipo más cercano al de sus parentales capturados dentro del domicilio si son alimentados sobre un hospedador similar. Los dos hospedadores (roedor y cucaracha) incluidos en el estudio, se seleccionaron a partir de informaciones previas que los señalaban como las potenciales fuentes de alimentación dentro de las viviendas colonizadas por *B. ferroae* (Sandoval et al. 2010).

2. Importancia de la morfometría geométrica en el análisis de la variación morfológica

La morfometría geométrica es una herramienta diseñada para el estudio de la variación fenotípica en diversos contextos biológicos. Esta técnica permite cuantificar el tamaño y la conformación de casi cualquier estructura biológica (Dujardin 2008). En Triatominae la morfometría geométrica ha demostrado ser una herramienta versátil, pues se puede aplicar en múltiples escenarios y con diversos propósitos. Por ejemplo, se puede aplicar al análisis del origen de poblaciones reinfestantes (Dujardin et al. 1997, Feliciangeli et al. 2007, Gurgel-Goncalves et al. 2008, Hernández et al. 2013) y en la descripción de los cambios morfológicos durante la transición de las poblaciones de hábitats naturales a artificiales (Rodríguez et al. 2007). Otros usos son la evaluación del estatus taxonómico de algunas especies (Villegas et al. 2002, Gumiel et al. 2003, Santos et al. 2007, Márquez et al. 2011); el análisis de la variación morfológica a través de las regiones biogeográficas (Bustamante et al. 2004); la descripción de los patrones de crecimiento bajo condiciones simuladas (Caro-Riaño et al. 2009) y el análisis de la variabilidad fenotípica y la estructura poblacional en zonas endémicas, así como la influencia espacial de micro y macroambientes en los Triatominae (Schachter-Broide et al. 2009, Hernández et al. 2011).

2.1 Consideraciones generales de la morfometría geométrica

La morfometría es frecuentemente presentada como morfometría tradicional, o bien como morfometría geométrica o moderna. La primera se basa en la medición de distancias lineales entre puntos anatómicos, sin tomar en cuenta la relación con la forma biológica. La segunda también se basa en la medición de distancias, pero del conjunto de coordenadas o Puntos Anatómicos de Referencia (PAR), que describen una configuración, en este último caso, se preserva la información geométrica de la estructura, lo cual reduce los efectos del crecimiento, que por cierto generalmente son debidos a causas ambientales (Dujardin 2008, Schachter-Broide et al. 2009).

2.1.1 El Tamaño

En morfometría geométrica (MG) para calcular el tamaño de cada configuración, se utiliza el estimador conocido como tamaño centroide, el cual se calcula como la raíz cuadrada de la suma de las distancias elevadas al cuadrado entre el centro de gravedad de cada configuración (centroide) y los PAR que la definen. De esta manera se pueden detectar cambios en cualquier dirección y es una estimación global del tamaño de la estructura anatómica bajo estudio (Klingenberg 2002, Villegas et al. 2002), que se puede extrapolar al tamaño general del cuerpo del insecto (Dujardin 2008).

2.1.2 La Conformación

La conformación en MG es definida como toda aquella información geométrica que permanece una vez son filtrados de un objeto o de una configuración, los efectos de localización, escala y rotación (Zelditch et al. 2004). Estos factores son removidos por el Análisis Generalizado de Procrustes (AGP), el cual escala todas las configuraciones a una unidad (dividiendo cada configuración entre su tamaño centroide) y posteriormente las superpone por sus centroides (centros de gravedad) y las rota en una orientación óptima a una configuración consenso, de modo que se alcance la suma mínima de las distancias al cuadrado entre cada PAR de un individuo y la configuración consenso (Klingenberg et al. 2002). La configuración consenso resulta de promediar los PAR de las primeras configuraciones superpuestas, luego se va actualizando, por el ajuste del tamaño, la traslación y la rotación iterativa de cada una de las estructuras, hasta alcanzar la superposición óptima (Jaramillo & Dujardin 2002).

Este proceso se da en un espacio multidimensional curvo llamado espacio de Kendall. La métrica de este espacio no permite usar las variables de conformación para hacer los análisis estadísticos

multivariados, para ello es necesario proyectar la información del espacio de Kendall a un espacio tangente (Jaramillo & Dujardin 2002, Zelditch et al. 2004).

Hay diversos métodos para realizar este procedimiento, por eso podremos encontrar diferentes descriptores de la conformación, entre los más comunes tenemos las deformaciones parciales junto con los componentes uniformes y las coordenadas de Procrustes (Toro et al. 2010). Con cualquiera de estos descriptores, los resultados finales deben ser iguales si se utiliza el AGP como método de superposición y se ajustan correctamente los grados de libertad (Zelditch et al. 2004). Ambos descriptores refieren la misma variación y uno puede ser transformado hacia el otro por una rotación en el sistema de coordenadas (Klingenberg & Monteiro 2005).

Una vez se generan los descriptores de la variación de la conformación para cada uno de los individuos, es necesario ejecutar un análisis de componentes principales previo a cualquier otro análisis, debido a que las variables obtenidas mediante las técnicas de la morfometría geométrica están altamente correlacionadas (Baltanás & Danielopol 2011). El cálculo de los componentes principales permite obtener un nuevo conjunto de variables, no correlacionadas, que son la combinación lineal de las variables originales. Estas nuevas variables podrán ser analizadas con métodos estadísticos multivariados, que permitirán verificar las hipótesis estadísticas, en relación con las diferencias de conformación entre los grupos (Klingenberg 2002).

En el software Morphoj, utilizado en este estudio, los descriptores de la conformación son las *Coordenadas de Procrustes* que se obtienen cuando las coordenadas del espacio de Kendall, se proyectan ortogonalmente al espacio tangencial euclidiano de la configuración consenso (Klingenberg 2011).

La descripción gráfica de la variación de la conformación se basa en el concepto de D'Arcy Thompson, en la cual una configuración geométrica, generalmente la consenso u otra que se mantiene fija, se deforma a lo largo de una rejilla, al hacer coincidir cada uno de sus puntos anatómicos con los de la configuración blanco (Bookstein 1991, Jaramillo & Dujardin 2002). La deformación ocurrirá en mayor medida si las formas comparadas son muy distintas (Toro et al. 2010). Actualmente, se pueden utilizar múltiples tipos de gráficos para visualizar la variación en la conformación, entre los cuales se destaca la transformación de rejillas, los desplazamientos de los vectores (en inglés *lollipop*) y los gráficos que

utilizan filamentos que conectan los *PAR* (*warped outline* o *wireframe*) (Zelditch et al. 2004, Toro et al. 2010, Klingenberg 2011).

2.1.3 La Alometría

Las técnicas morfométricas miden el tamaño y la forma, de manera tal que la relación entre estas dos variables se conoce como alometría (Dujardin 2008). En los análisis morfométricos, la alometría informa sobre los cambios de conformación que derivan del cambio del tamaño; entonces, en algunos casos la conformación puede ser dependiente del tamaño (Jaramillo & Dujardin 2002).

El análisis generalizado de Procrustes (AGP) remueve el efecto de la variación de tamaño, al dividir las coordenadas originales por el tamaño centroide, pero no remueve ninguna variación de la conformación que pueda estar relacionada al tamaño. El tamaño centroide es entonces una variable isométrica. Si en la muestra hay alometría esta no es removida por el AGP (Klingenberg et al. 2002, Jaramillo & Dujardin 2002).

www.bdigital.ula.ve

3. Objetivo general

Analizar la variación morfológica alar (tamaño y conformación) en la especie *B. ferroae* y su posible relación con el hospedador a través de la técnica de morfometría geométrica.

4. Objetivos específicos

- 4.1 Analizar el tamaño alar en la especie *B. ferroae* entre los insectos parentales y su progenie criada con dos hospedadores (cucaracha y roedor).
- 4.2 Analizar el tamaño alar entre generaciones contemporáneas de la especie *B. ferroae*, criadas en laboratorio con dos hospedadores (cucaracha y roedor).
- 4.3 Analizar el tamaño alar entre generaciones sucesivas de la especie *B. ferroae* criadas con dos hospedadores (cucaracha y roedor).

4.4 Analizar el dimorfismo sexual en *B. ferroae* entre los insectos parentales y su progenie criada con dos hospedadores (cucaracha y roedor).

4.5 Comparar la conformación alar de los parentales y las generaciones de laboratorio criadas con dos hospedadores (cucaracha y roedor).

5. Materiales y Métodos

5.1 Origen de la población

La muestra de *B. ferroae* usada en este estudio se capturó dentro de tres viviendas de dos localidades contiguas, Santa Catalina (N 07124, E 07219) y San Alberto (N 07201, E 07232), ubicadas en el municipio de Toledo en el departamento de Norte de Santander, Colombia. Es una región caracterizada como un bosque húmedo premontano, con un rango altitudinal entre los 1190 - 1400 m.s.n.m y un promedio anual de temperatura de 25°C y humedad relativa 85% (Sandoval et al. 2010).

5.2 Procedimientos experimentales

5.2.1 Mantenimiento de los parentales

Un total de 35 individuos capturados en campo lograron llegar vivos al laboratorio (14 machos y 21 hembras) procedentes de las tres viviendas. Estos insectos se organizaron por vivienda, manteniendo entre dos y tres hembras y dos machos en un recipiente para la cría. En total se siguieron ocho subgrupos, cuatro pertenecían al grupo alimentado por hematofagia (roedor) y cuatro al grupo alimentado por hemolinfagia (*Blaberus*). Al grupo alimentado por hematofagia se le ofreció semanalmente un roedor (*Mus musculus*), previamente anestesiado por vía intraperitoneal con Ketalar® (75mg/kg). El grupo alimentado por hemolinfagia se mantuvo de manera constante con un espécimen adulto de *Blaberus* sp. Las cucarachas se reemplazaron mensualmente y se mantuvieron con alimento concentrado para conejo, maíz y agua suministrada a través de un algodón humedecido.

Los recipientes para la cría de los insectos consistieron en envases de plástico de 10 x 7 cm con papel absorbente en su interior y sellados con su respectiva tapa previamente perforada para evitar la condensación y el desarrollo de hongos.

Las condiciones experimentales de cría se desarrollaron en una cabina climatizada con temperatura de 25 ± 2 °C y la humedad relativa de $70 \pm 10\%$ HR. El fotoperíodo establecido fue de 12/12 horas luz/oscuridad (Figura 11).

5.2.2 Mantenimiento de los grupos experimentales

A partir de las posturas obtenidas de los parentales procedentes de campo, se iban conformando nuevos recipientes de cría que contenían la F: 1 de cada uno de los grupos (hematofagia y hemolinfagia) con una densidad de diez individuos por recipiente. Todos los insectos fueron criados hasta que mudaron a su estado adulto. A partir de las F: 1 se conformaron parejas al azar cada una en un recipiente, quince parejas se alimentaron con roedor y las otras quince con cucaracha, sus posturas dieron origen a la F: 2. De igual manera se conformaron los grupos de la F: 3 con las posturas de las parejas de la F2.

Conforme avanzaba el ritmo de las posturas de cada pareja, se iban formando nuevos recipientes de cría que conservaban su pertenencia al grupo de hospedador y una densidad de 10 individuos durante todo el experimento.

El esquema de alimentación usado para las tres generaciones de laboratorio alimentadas con roedor fue el mismo que se utilizó para los insectos parentales. Para las tres generaciones de laboratorio alimentadas por hemolinfagia (cucaracha), una ninfa de *Blaberus* sp. entre IV y V estadio se mantuvo con las ninfas menores de *B. ferroae* (I, II y III), y para las ninfas mayores (IV y V) una cucaracha adulta. Todas las generaciones de laboratorio se desarrollaron bajo las mismas condiciones ambientales en las cuales permanecieron los insectos parentales. Los procedimientos para el manejo de animales se ejecutaron en conformidad con la ley colombiana (Estatuto Nacional de protección animal ley 84 1989 y la resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud).

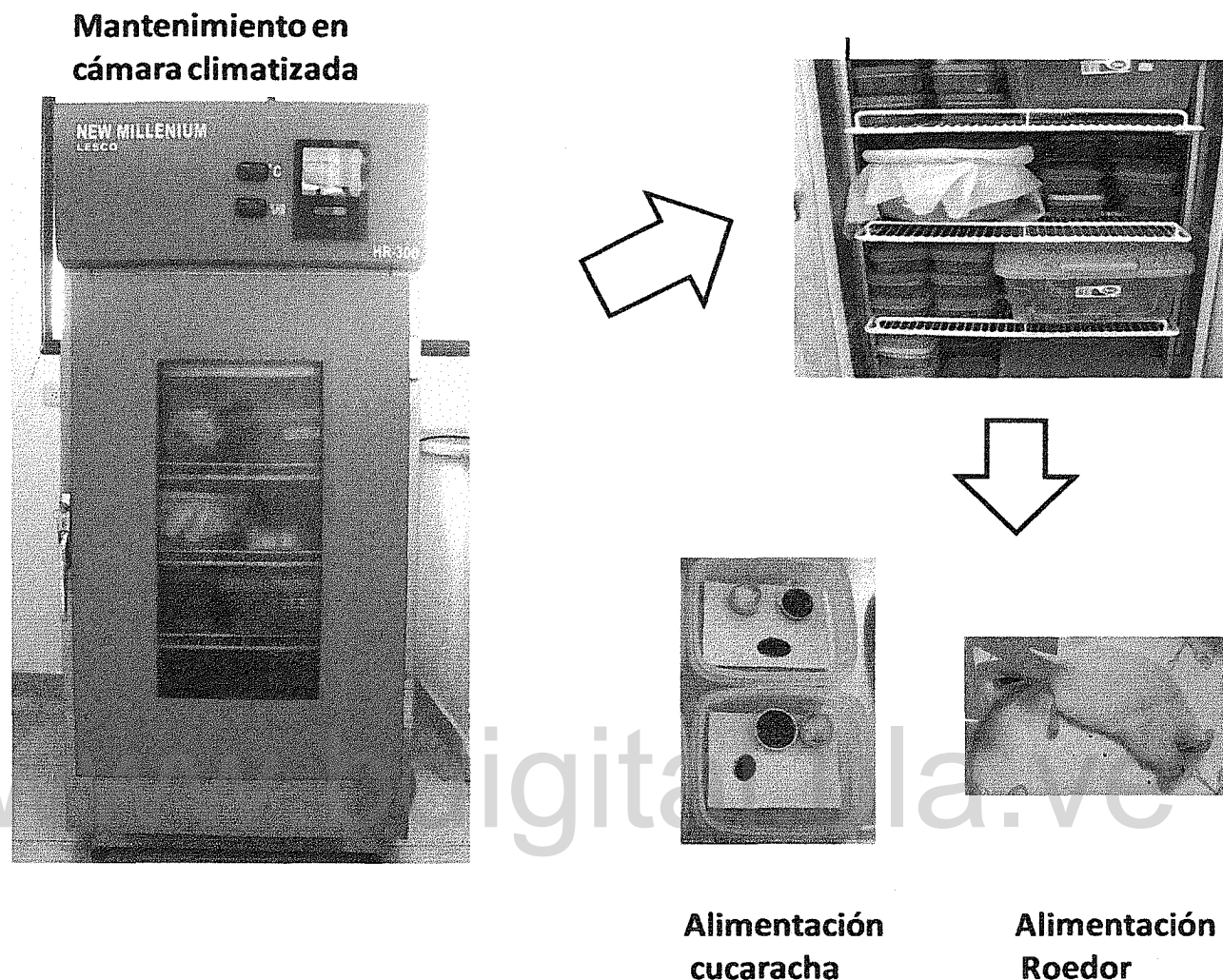


Figura 11. Condiciones de cría de *B. ferroae* en laboratorio.

5.2.3 Montaje de alas para el análisis de la variación fenotípica alar

Ambas alas anteriores de cada individuo adulto se removieron y se montaron en un portaobjeto en posición dorsal bajo un microscopio-estereoscópico marca LEICA. Las alas se fijaron con agua (10 μ l) y una vez secas, se colocó una pequeña laminilla adherida con silicona líquida. Cada individuo se codificó y se registró en la lámina. Otros datos adicionales se almacenaron en una hoja de cálculo (fecha de montaje, número de alas, sexo y código del recipiente de cría) (Figura12).



Figura 12. Montaje en lámina de las alas de *B. ferroae*

5.2.4 Captura y digitalización de imágenes

Para la toma de las fotografías y la detección de los posibles efectos de distorsión óptica se siguió la metodología propuesta por Caro-Riaño et al. (2009). En el laboratorio de Ecología Sensorial de Insectos del IVIC, en Mérida, Venezuela. Se fotografiaron 590 alas izquierdas, tres veces, en diferentes días. Para esto, se utilizó una cámara marca Leica EC3 adaptada a un microscopio-estereoscópico, de la misma marca modelo M205. Se seleccionaron seis *puntos anatómicos de referencia* (PAR) para el análisis de la estructura y todos correspondieron al tipo 1² (Figura 13). Las imágenes se exportaron al programa tpsDig versión 2.0 para obtener las coordenadas que permitieron reproducir el contorno de la estructura. También se utilizó el programa tpsUtil versión 1.47 para la organización de los archivos de las coordenadas y la conversión de los formatos.

² Es un punto matemático para el cual hay evidencias muy fuertes que tiene homología de caso a caso; tal como un patrón local de yuxtaposición de tipos diferentes de tejidos o un pequeño parche de alguna histología inusual.

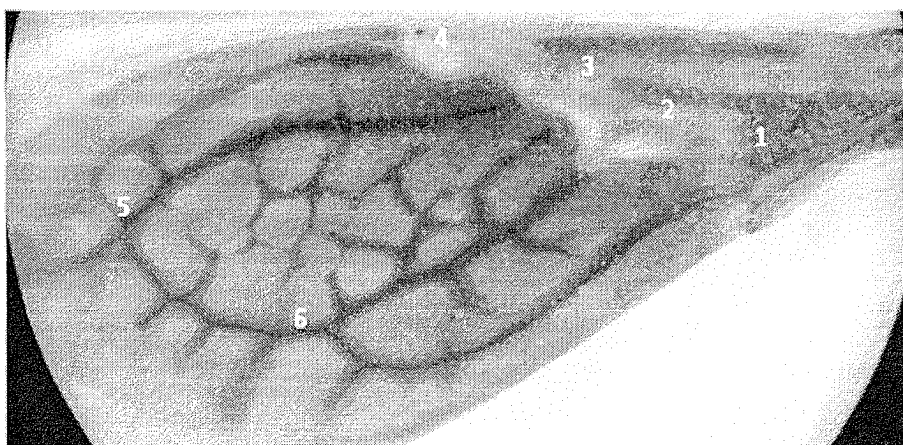


Figura 13. Puntos anatómicos de referencia (PAR) tipo 1, digitalizados en el ala izquierda para el análisis de tamaño y conformación en *B. ferroae*.

5.2.5 Análisis estadístico

5.2.5.1 Estimación del error

Con el objetivo de reducir el error en la digitalización de los PAR, este trabajo se realizó por una misma persona (Caro-Riaño et al. 2009). También se calculó un estimado del error, para la variable, tamaño centroide. Para esto, se realizó un análisis de regresión entre los tamaños centroides de las tres sesiones fotográficas realizadas en días diferentes. Este análisis incluyó a los especímenes de campo y de la primera generación de laboratorio criada con ambos hospedadores (roedor y cucaracha). El análisis se hizo por separado para hembras y machos en cada una de las sesiones con el software Statistica versión 8.5.

5.2.5.2 Análisis del tamaño

Para comparar el tamaño del ala entre los grupos se usó el estimador isométrico, denominado tamaño centroide y derivado de los datos de las coordenadas. El software Morphoj generó los datos de tamaño centroide para cada una de las configuraciones. Se exploró la existencia de dimorfismo sexual en cuanto al tamaño del ala dentro de cada grupo con la prueba estadística U de Mann-Whitney. También se exploraron los cambios métricos en tamaño para cada sexo por separado a través de la prueba no

paramétrica de Kruskal-Wallis. Ambas pruebas se ejecutaron con el software Statistica 8.0 y se efectuó la corrección de Bonferroni.

5.2.5.3 *Análisis de la conformación*

Se utilizó el software Morphoj 1,05e para obtener los descriptores de conformación a través de algoritmo de superposición conocido como el Análisis Generalizado de Procrustes (AGP) y para el análisis estadístico. La conformación se analizó entre los parentales procedentes de campo y las tres generaciones de laboratorio criadas con los dos hospedadores (cucarachas o roedor), a través de un análisis canónico de la varianza (ACV). Se calcularon las distancias de Mahalanobis y se ejecutaron 10.000 permutaciones en cada análisis para probar la hipótesis nula de que las distancias entre los grupos eran producto del azar. Para la significancia estadística se tuvo en cuenta la corrección de Bonferroni.

Adicionalmente, se ejecutó un análisis discriminante (por pares de grupos) para obtener los porcentajes asignación correcta de los especímenes a su grupo. Las pruebas de reclasificación y verificación cruzada se ejecutaron con 10.000 permutaciones.

5.2.5.4 *Análisis de la Alometría*

Para el análisis del efecto alométrico en las configuraciones bajo estudio, se realizó una regresión entre los descriptores de la conformación como variables dependientes (coordenadas de Procrustes) y la variable independiente (el tamaño centroide). Para esto, se utilizó el software Morphoj y se ejecutaron 10.000 permutaciones para calcular la significancia estadística. También se ejecutó un MANCOVA, con el objetivo de probar si los grupos tenían un eje alométrico común y así ejecutar un análisis libre de alometría. En este análisis se analizaron las coordenadas de Procrustes, pero las generaciones ingresaron como grupos y el tamaño centroide como un covariado. Una vez se prueba la homogeneidad de las pendientes se puede corregir el efecto del tamaño sobre la conformación (Visconsi & Cardini 2011). Un MANCOVA paramétrico fue ejecutado en el software Statistica y uno no paramétrico con el software COV que utiliza como descriptores de conformación las deformaciones parciales y los componentes uniformes, este último se ejecutó con 2.000 permutaciones.

5.2.5.5 Visualización de los cambios en la conformación alar

Se utilizaron los gráficos conocidos como filamentos blandos en inglés *soft wireframe*, que describen un conjunto de líneas o filamentos que conectan los PAR de una configuración promedio. La estructura en filamentos dibuja la forma de la muestra que es la referencia (consenso) u otro tipo. Un segundo filamento es dibujado y es el resultado de la deformación que produce la configuración blanco. Los cambios uniformes corresponderán a una línea recta que conecta los PAR, y los no uniformes a segmentos curvos que reflejan la deformación del espacio entre PAR (Zelditch et al. 2012). Este tipo de gráfico facilita la interpretación de los cambios en conformación, y se explica de manera similar a los gráficos generados por la técnica de deformación de placas delgadas (Zelditch et al. 2012). Para una mejor visualización de los cambios de conformación se aumentó el factor de escala en cinco veces, tal como es sugerido por Visconsi & Cardini (2011).

Los programas tpsdig2, tpsutil, se encuentran disponibles en <http://life.bio.sunysb.edu/morph/soft-dataacq.html>. El software Morphoj en http://www.flywings.org.uk/morphoj_page.html, el programa PAST en www.nhm.uio.no/norlex/past/download.html y COV en <http://www.mpl.ird.fr/morphometrics>.

6. Resultados

6.1 Estimación del error para la variable tamaño centroide entre diferentes sesiones fotográficas

El error promedio estimado entre las tres sesiones fotográficas para el tamaño centroide en los machos fue de 8% ($n = 94$ especímenes). Entre la sesión 1 y 2 $R = 0,992$, $R^2 = 0,985$ $F = 1,97$ $p < 0,00001$, $ES = 7,95\%$. Entre la 1 y 3, $R = 0,982$, $R^2 = 0,9787$ $F = 1,97$ $p < 0,00001$, $ES = 9,47\%$, y entre la 2 y la 3 $R = 0,9924$, $R^2 = 0,9851$ $F = 1,97$ $p < 0,00001$ $ES = 7,67\%$.

En las hembras, el error promedio estimado también fue de 8% ($n = 99$ especímenes). Entre las sesión 1 y 2, $R = 0,9928$, $R^2 = 0,9857$ $F = 1,92$ $p < 0,00001$ $ES = 8,52\%$. Entre la 1 y 3, $R = 0,9936$, $R^2 = 0,9873$ $F = 1,92$, $p < 0,00001$, y entre la 2 y la 3, $R = 0,9940$, $R^2 = 0,9881$ $F = 1,92$, $p < 0,00001$ $ES = 7,72\%$. En general, los resultados de los análisis morfométricos realizados en las tres sesiones fotográficas se correspondieron bien. Para efectos prácticos, se muestran los resultados de la segunda sesión fotográfica.

6.2 *Análisis del tamaño centroide*

Un total de 590 insectos adultos fueron incluidos en el estudio. El número de muestras (n) promedios y desviaciones estándar del tamaño centroide para cada uno de los grupos en estudio y discriminados por sexo se detallan en la Tabla 6.

En general, los individuos parentales (hembras y machos) exhibieron en promedio alas de mayor tamaño cuando se compara con su progenie (Tabla 6). Sin embargo, al analizar el tamaño centroide en las hembras se observaron diferencias estadísticamente significativas, entre las alas de las parentales y sus respectivas generaciones alimentadas por hemolinfagia (Tabla 7, Figura 14). Las hembras alimentadas por hemolinfagia siempre exhibieron los tamaños más pequeños (Tabla 7). En los machos la tendencia en los cambios métricos fue similar, los insectos alimentados por hemolinfagia en laboratorio presentaron los tamaños más pequeños con diferencias estadísticamente significativas respecto a los parentales (Tabla 7, Figura 15). En contraste, los machos y las hembras alimentados por hematofagia, no presentaron diferencias significativas en relación con el tamaño de los parentales (Tabla 7).

Al comparar el tamaño entre generaciones contemporáneas criadas en laboratorio y alimentadas con los dos hospedadores (cucarachas vs. roedor), en las hembras se observaron diferencias estadísticamente significativas en todas las generaciones y en los machos, estas diferencias se observaron a partir de la segunda generación (Tabla 8). Los insectos alimentados por hemolinfagia siempre fueron más pequeños.

Al analizar el tamaño del ala entre las generaciones de laboratorio no contemporáneas y alimentadas sobre un mismo hospedador, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las hembras y tampoco en los machos (Tabla 9).

No se observó dimorfismo sexual en cuanto al tamaño del ala en los insectos parentales ($p = 0,63$) ni en la primera generación alimentada por hemolinfagia ($p = 0,75$). El dimorfismo sexual fue evidente en las demás generaciones obtenidas en laboratorio (Figura 16).

Tabla 6. Tamaño de muestra (n), media (x) y desviación estándar (DE) del tamaño centroeide en cada grupo de estudio y discriminado por sexo.

Grupo	Origen	Sexo	Alimentación	Hospedador	Generación	n	Tamaño Centroeide			
							Media	Minimo	Maximo	Desviación Estándar
HP	Campo	hembra			P	18	1455,84	1361,90	1607,30	57,04
HF1HL	Laboratorio	hembra	Hemolinfagia	Cucaracha	F1	45	1341,65	1219,31	1461,48	56,20
HF2HL	Laboratorio	hembra	Hemolinfagia	Cucaracha	F2	67	1356,23	1132,53	1481,38	62,30
HF3HL	Laboratorio	hembra	Hemolinfagia	Cucaracha	F3	69	1330,59	1230,69	1474,11	45,43
HF1HM	Laboratorio	hembra	Hematofagia	Roedor	F1	29	1394,37	1297,15	1496,69	52,31
HF2HM	Laboratorio	hembra	Hematofagia	Roedor	F2	57	1417,21	1228,20	1510,00	57,24
HF3HM	Laboratorio	hembra	Hematofagia	Roedor	F3	20	1404,68	1238,31	1493,80	58,00
MP	Campo	macho			P	14	1439,57	1360,48	1512,14	42,59
MF1HL	Laboratorio	macho	Hemolinfagia	Cucaracha	F1	38	1337,52	1154,50	1467,12	62,59
MF2HL	Laboratorio	macho	Hemolinfagia	Cucaracha	F2	71	1314,32	1191,50	1433,39	53,94
MF3HL	Laboratorio	macho	Hemolinfagia	Cucaracha	F3	65	1299,48	1119,23	1403,64	55,65
MF1HM	Laboratorio	macho	Hematofagia	Roedor	F1	44	1361,18	1223,34	1476,33	49,83
MF2HM	Laboratorio	macho	Hematofagia	Roedor	F2	36	1378,53	1250,72	1461,85	46,44
MF3HM	Laboratorio	macho	Hematofagia	Roedor	F3	17	1367,64	1249,47	1469,83	60,27

P (parental), H (Hembra) M (Macho), F1 (Primera generación), F2 (Segunda generación), F3 (Tercera generación), HL Hemolinfagia), HM (Hematofagia).

Tabla 7. Comparación del tamaño centroide entre los parentales y la progenie de *B. ferroae* alimentada por hemolinfagia (cucaracha) y hematofagia (roedor) en laboratorio. Usando la prueba de Kruskal-Wallis con corrección de Bonferroni ($p=0,008$)

Comparación	Hembras	Machos
P - HLF1	7,5E-07*	1,81E-04*
P - HLF2	1,30E-05*	8,17E-09*
P - HLF3	3,40E-10*	9,7E-11*
P - HMF1	0,3149	0,0201
P - HMF2	1,0000	0,3868
P - HMF3	1,0000	0,1153

P (parentales), HLF1 (F1, Hemolinfagia), HMF1 (F1, Hematofagia), HLF2 (F2, Hemolinfagia), HMF2 (♀F2, Hematofagia), HLF3 (F3, Hemolinfagia), HMF3 (F3Hematofagia) (*) Indica diferencias estadísticamente significativas después de la corrección de Bonferroni.

Tabla 8. Comparación del tamaño centroide entre generaciones contemporáneas de *B. ferroae* criada en laboratorio y alimentada por hemolinfagia (cucaracha) o hematofagia (roedor). Usando la prueba de Kruskal-Wallis con corrección de Bonferroni ($p = 0,0166$).

Comparación	Hembras	Machos
HLF1-HMF1	0,01481*	1,000000
HLF2- HMF2	4,7E-06*	2,22E-06*
HLF3-HMF3	0,00002*	0,00301*

HLF1 (F1, Hemolinfagia), HMF1 (F1, Hematofagia), HLF2 (F2, Hemolinfagia), HMF (♀F2, Hematofagia), HLF3 (F3, Hemolinfagia), HMF3 (F3Hematofagia) (*) Indica diferencias estadísticamente significativas después de la corrección de Bonferroni.

www.bdigital.ula.ve

Tabla 9. Comparación del tamaño centroide entre las generaciones contemporáneas alimentadas exclusivamente con un hospedador en laboratorio cucaracha o hematofagia. Usando la prueba de Kruskal-Wallis con corrección de Bonferroni ($p = 0,008$).

Comparación	Hembras	Machos
HLF1-HLF2	1,000000	0,607057
HLF1 -HLF3	1,000000	0,032183
HLF2-HLF3	0,154945	1,000000
HMF1-HMF2	1,000000	0,000435
HMF1-HMF3	1,000000	1,000000
HMF2-HMF3	1,000000	1,000000

HLF1 (F1, Hemolinfagia), HMF1 (F1, Hematofagia), HLF2 (F2, Hemolinfagia), HMF2 (♀F2, Hematofagia), HLF3 (F3, Hemolinfagia), HMF3 (F3Hematofagia) (*) Indica diferencias estadísticamente significativas después de la corrección de Bonferroni.

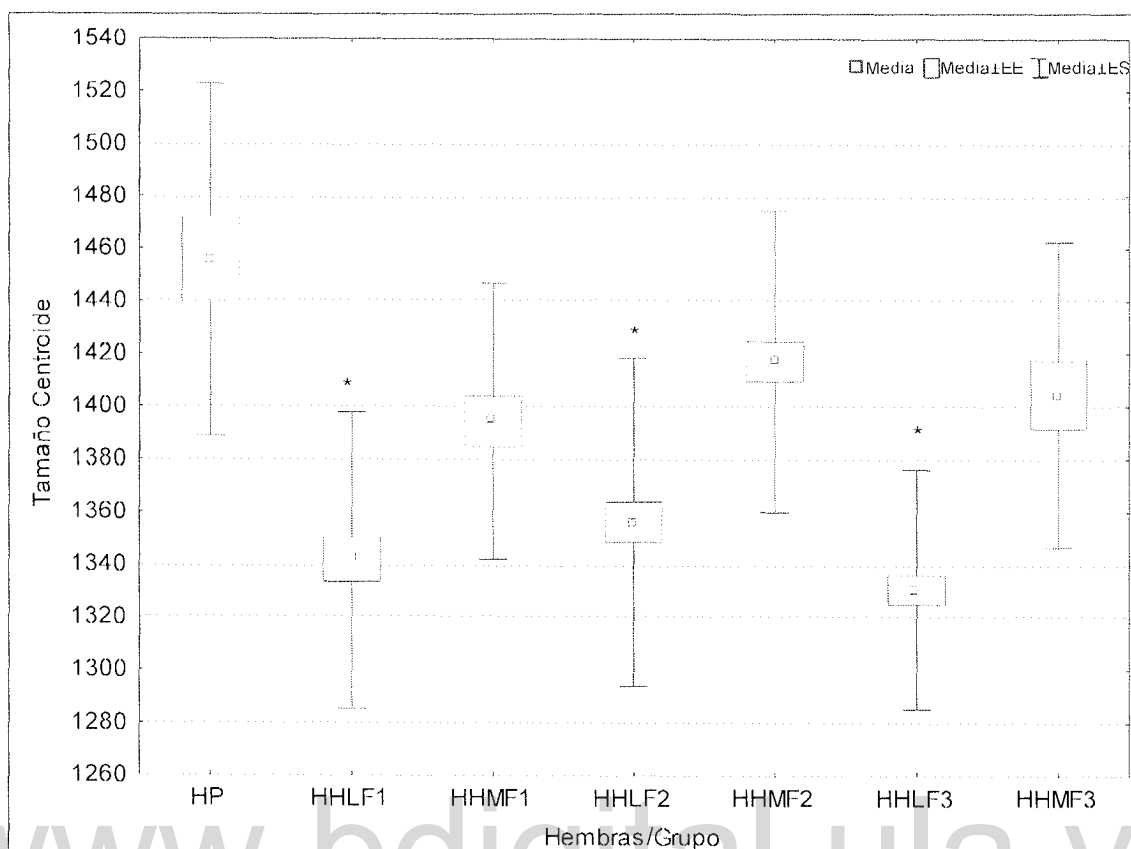


Figura 14. Media, error estándar y desviación estándar del tamaño centroide en las hembras. HP (♀parentales), HHLF1 (♀F1, Hemolinfagia), HHMF1 (♀F1, Hematofagia), HHLF2 (♀F2, Hemolinfagia), HHMF2 (♀F2, Hematofagia), HHLF3 (♀F3, Hemolinfagia), HHMF3 (♀F3, Hematofagia) (*) Indica diferencias estadísticamente significativas en tamaño respecto a las hembras parentales si $p < 0,008$.

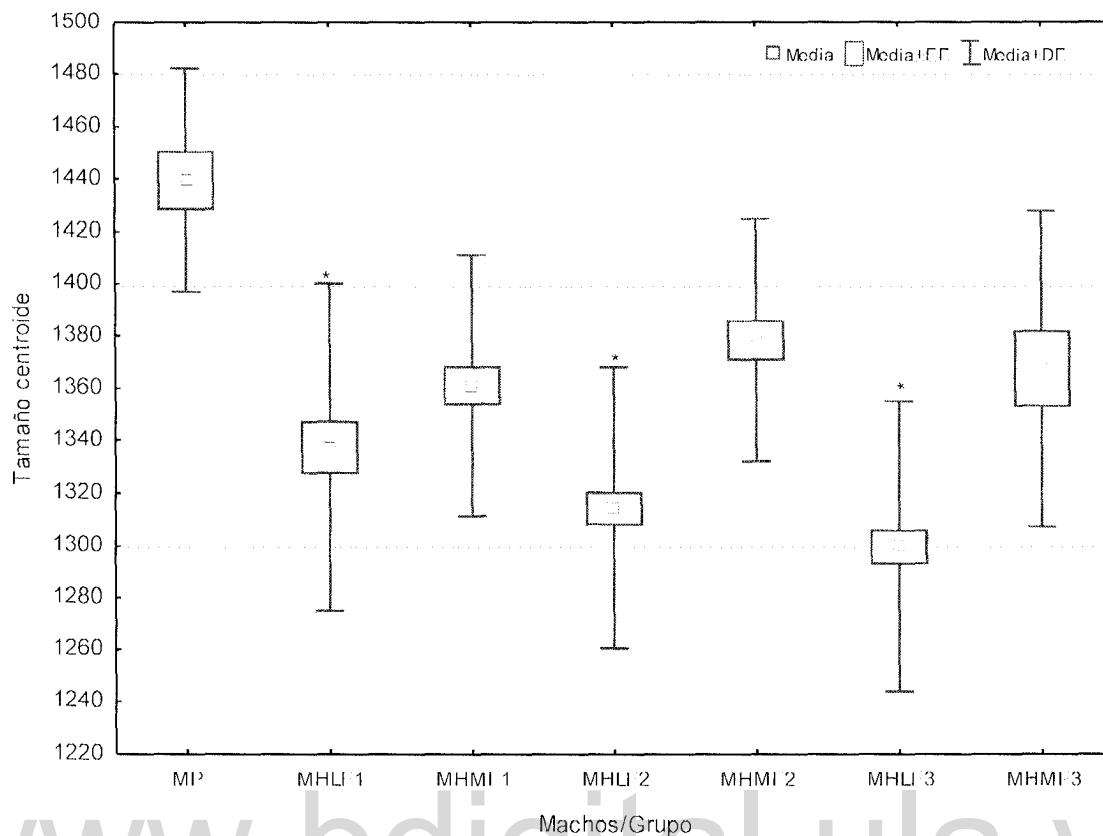


Figura 15. Media, error estándar y desviación estándar del tamaño centroide en los machos. MP (♂parentales), MF1HL (♂F1, Hemolinfagia), MHMF1 (♂F1, Hematofagia), MHLF2 (♂F2, Hemolinfagia), MHMF2 (♂F2, Hematofagia), MHLF3 (♂ F3, Hematofagia), MHMF3 (♂F3, Hematofagia). (*) Indica diferencias estadísticamente significativas en tamaño respecto a los machos parentales si $p < 0,008$.

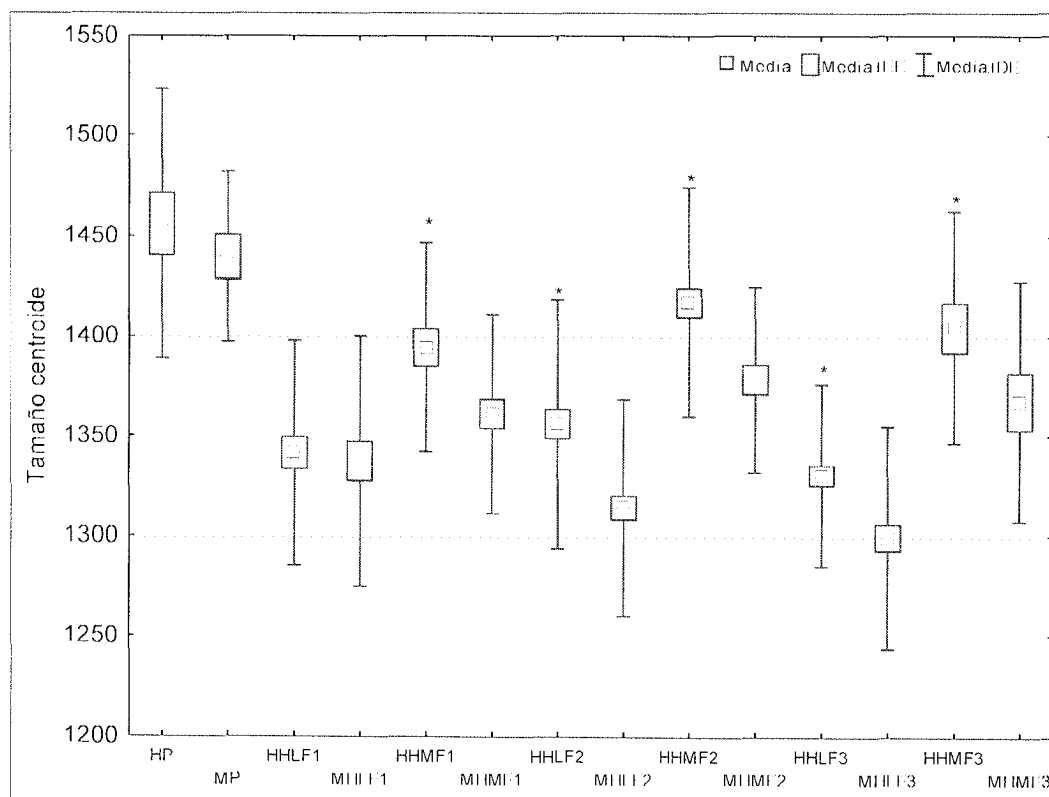


Figura 16. Dimorfismo sexual. Media, error estándar y desviación estándar del tamaño centroide en hembras y machos. HP (♀parental), MP (♂parental), HHLF1 (♀F1, Hemolinfagia), MHLF1 (♂F1, Hemolinfagia), HHMF1 (♀F1, Hematofagia), MHMF1 (♂F1, Hematofagia), HHLF2 (♀F2, Hemolinfagia), MHLF2 (♂F2, Hemolinfagia), HHMF2 (♀F2, Hematofagia), MHMF2 (♂F2, Hematofagia), HHLF3 (♀F3, Hemolinfagia), HHMF3 (♀, Hematofagia) MHLF3 (♂ F3, Hematofagia), MHMF3 (♂F3, Hematofagia). (*) indica diferencias estadísticamente significativas entre hembras y machos de una misma generación. (HP-MP $p = 0,63$), (HHLF1-MHMF1 $p = 0,75$), (HHMF1-MHMF1 $p = 0,007P$), (HHLF2-MHMF2 $p = 0,00002$), (HHMF2-MHMF2 $p = 0,0003$), (HHLF3-MHMF3 $p = 0,000828$), (HHMF3-MHMF3 $p = 0,035$).

6.3 *Análisis de la Conformación alar*

El análisis canónico de la conformación del ala, entre los grupos parentales y las generaciones alimentadas por hemolinfagia y hematofagia, se realizó por sexos separados, teniendo en cuenta la existencia de dimorfismo sexual en el tamaño del ala.

6.3.1 *Análisis de la conformación alar en las hembras de *B. ferroae**

En las hembras, la primera función canónica explicó el 88 % de la variación total y la segunda función el 8% (Figura 17). En la tabla 10 se puede observar que las distancias de Mahalanobis, siempre fueron menores entre las hembras parentales y las tres generaciones de laboratorio alimentadas por hemolinfagia. Por el contrario, estas distancias fueron mayores entre las hembras parentales y las generaciones criadas por hematofagia.

Las distancias de Mahalanobis entre la primera generación de hembras criadas por hemolinfagia y las hembras parentales no mostraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al fenotipo de conformación alar. Sin embargo, diferencias significativas se detectaron entre el grupo parental y la segunda y tercera generación de hemolinfagia (Tabla 10).

Las hembras de las tres generaciones de hemolinfagia (F1, F2 y F3) se clasificaron correctamente en 66, 81 y 80% respectivamente, cuando comparadas con las hembras parentales. La verificación cruzada mostró que 60, 76 y 78 % de las hembras se clasificaron correctamente a su grupo (Tabla 10).

Todas las distancias entre las generaciones de hembras de laboratorio alimentadas por hematofagia y las hembras parentales fueron estadísticamente significativas (Tabla 10). En las pruebas de reclasificación, las tres generaciones de hembras alimentadas por hematofagia (F1, F2 y F3) se clasificaron correctamente en 96, 91 y 95% respectivamente cuando comparadas con las hembras parentales. La verificación cruzada mostró que 86, 82 y 70 % de las hembras se clasificaron correctamente a su grupo (Tabla 10).

Respecto a las distancias de Mahalanobis de las hembras de laboratorio criadas con los dos hospedadores se observaron diferencias estadísticamente significativas, en la conformación del ala entre las tres generaciones contemporáneas o no, alimentadas por hemolinfagia y las tres generaciones de hematofagia (Tabla 11).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre generaciones de hembras alimentadas exclusivamente por hemolinfagia o hematofagia (Tabla 7).

www.bdigital.ula.ve

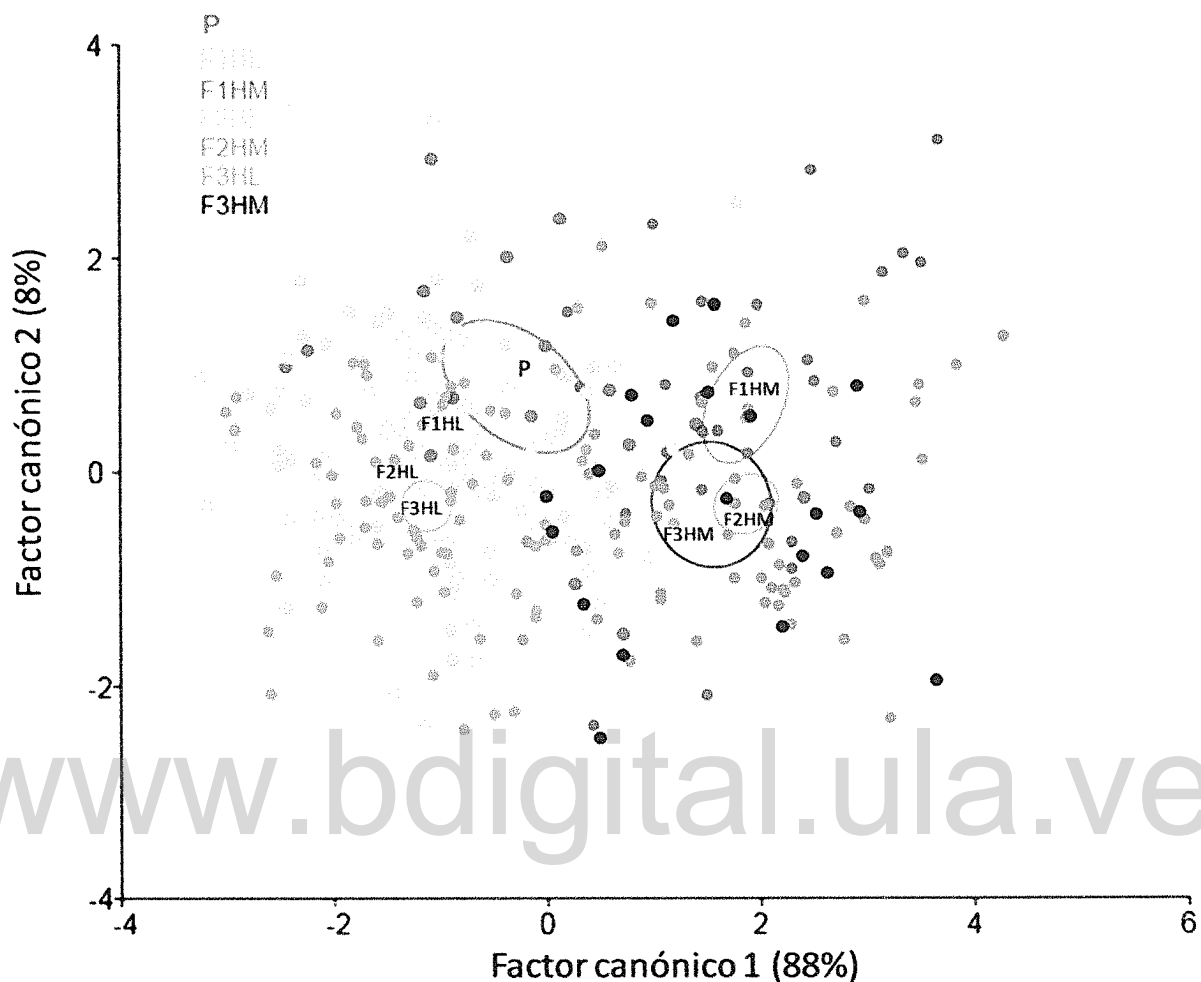


Figura 17. Espacio de la función canónica mostrando la distribución de los fenotipos de conformación alar de las hembras en las tres generaciones de laboratorio y los parentales. Las elipses representan el intervalo de confianza del promedio de la conformación de cada grupo con una probabilidad del 95%. P (parentales), F1HL (F1, Hemolinfagia), HMF1 (F1, Hematofagia), HLF2 (F2, Hemolinfagia), HMF2 (F2, Hematofagia), HLF3 (F3, Hematofagia), HMF3 (F3, Hematofagia).

Tabla 10. Distancias de Mahalanobis entre los fenotipos de conformación alar de las hembras criadas en laboratorio (hemolinfagia o hematofagia) y las hembras parentales obtenidas mediante ACV. Las distancias son significativas si $P < 0,0083$ después de la corrección de Bonferroni. Parentales (P), Hemolinfagia (HL) y Hematofagia (HM), F1 (primera generación), F2 (Segunda generación) F3 (Tercera generación), (*) Indica distancias estadísticamente significativas.

Grupos	Distancias de Mahalanobis	Valor <i>p</i>	% Reclasificación	% Verificación cruzada
P - HLF1	1,0127	0,175	77-66	50-60
P - HLF2	1,3408	0,003*	72-81	55-76
P - HLF3	1,5354	<0001*	72-80	66-78
P - HMF1	2,338	<0001*	89-96	78-86
P - HMF2	2,4613	<0001*	78-91	72-82
P - HMF3	2,2396	<0001*	83-95	66-70

Tabla 11. Distancias de Mahalanobis entre los fenotipos de conformación alar de hembras criadas en laboratorio (hemolinfagia vs. hematofagia). Las distancias son significativas si $P < 0,0083$ después de la corrección de Bonferroni. Hemolinfagia (HL) y Hematofagia (HM), F1 (primera generación), F2 (Segunda generación) F3 (Tercera generación), (*) Indica distancias estadísticamente significativas.

Grupos	Distancias de Mahalanobis	Valor <i>p</i>	% Reclasificación	% Verificación cruzada
HLF1-HMF1	2,8991	<0001*	93-100	82-97
HLF1-HMF2	2,9373	<0001*	91-91	87-89
HLF1-HMF3	2,662	<0001*	89-95	84-90
HLF2-HMF1	2,9739	<0001*	96-89	91-86
HLF2-HMF2	2,8772	<0001*	90-88	89-86
HLF2-HMF3	2,5492	<0001*	89-90	85-80
HLF3-HMF1	3,1613	<0001*	94-97	92-86
HLF3-HMF2	3,0115	<0001*	94-93	94-84
HLF3-HMF3	2,7788	<0001*	97-100	96-90

Tabla 12. Distancias de Mahalanobis entre los fenotipos de conformación alar de las hembras criadas en laboratorio con un mismo hospedador. Las distancias son significativas si $P < 0,008$ después de la corrección de Bonferroni. Hemolinfagia (HL) y Hematofagia (HM), F1 (primera generación), F2 (Segunda generación) F3 (Tercera generación), (*) Indica distancias estadísticamente significativas.

Grupos	Distancias de Mahalanobis	Valor <i>p</i>	% Reclasificación	% Verificación cruzada
HLF1-HLF2	0,6264	0,2769	62-64	51-58
HLF1 -HLF3	0,8455	0,0095	60-64	53-58
HLF2-HLF3	0,7086	0,015	69-67	66-65
HMF1-HMF2	1,0607	0,0099	72-72	58-64
HMF1-HMF3	1,2678	0,0416	69-80	62-60
HMF2-HMF3	0,6175	0,6581	71-60	57-35

www.bdigital.ula.ve

6.3.1 Análisis de la conformación alar en los machos de *B. ferroae*

En los machos, el primer factor canónico explicó el 85% de la variación total y el segundo el 7,3% (Figura 18). Las distancias de Mahalanobis siempre fueron menores entre los parentales y las tres generaciones de laboratorio alimentadas por hemolinfagia. Por el contrario, estas distancias fueron mayores entre los machos parentales y las generaciones criadas por hematofagia (Tabla 13).

Las tres generaciones de machos alimentados por hemolinfagia en relación con la conformación, no mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto a los parentales. Los machos de las tres generaciones de hemolinfagia (F1, F2 y F3) se clasificaron correctamente en 63, 73 y 74% respectivamente, cuando comparados con los machos parentales. La verificación cruzada mostró que 58, 70 y 68 % de los machos se clasificaron correctamente a su grupo (Tabla 13).

Todas las distancias entre las generaciones de machos de laboratorio alimentados por hematofagia y los machos parentales fueron estadísticamente significativas (Tabla 13). En las pruebas de reclasificación, las tres generaciones de machos alimentados por hematofagia (F1, F2 y F3) se clasificaron correctamente en 93, 92 y 100% respectivamente cuando comparados con los machos parentales. La verificación cruzada mostró que 90, 81 y 88 % de los machos se clasificaron correctamente a su grupo (Tabla 13).

Todas las distancias de Mahalanobis entre los machos de las generaciones contemporáneas o no, criadas en laboratorio con los dos hospedadores (hemolinfagia vs. hematofagia) fueron estadísticamente significativas (Tabla 14).

Cuando se compara la conformación entre los machos alimentados exclusivamente por hemolinfagia o hematofagia, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las tres generaciones de cada uno de los hospedadores (Tabla 15).

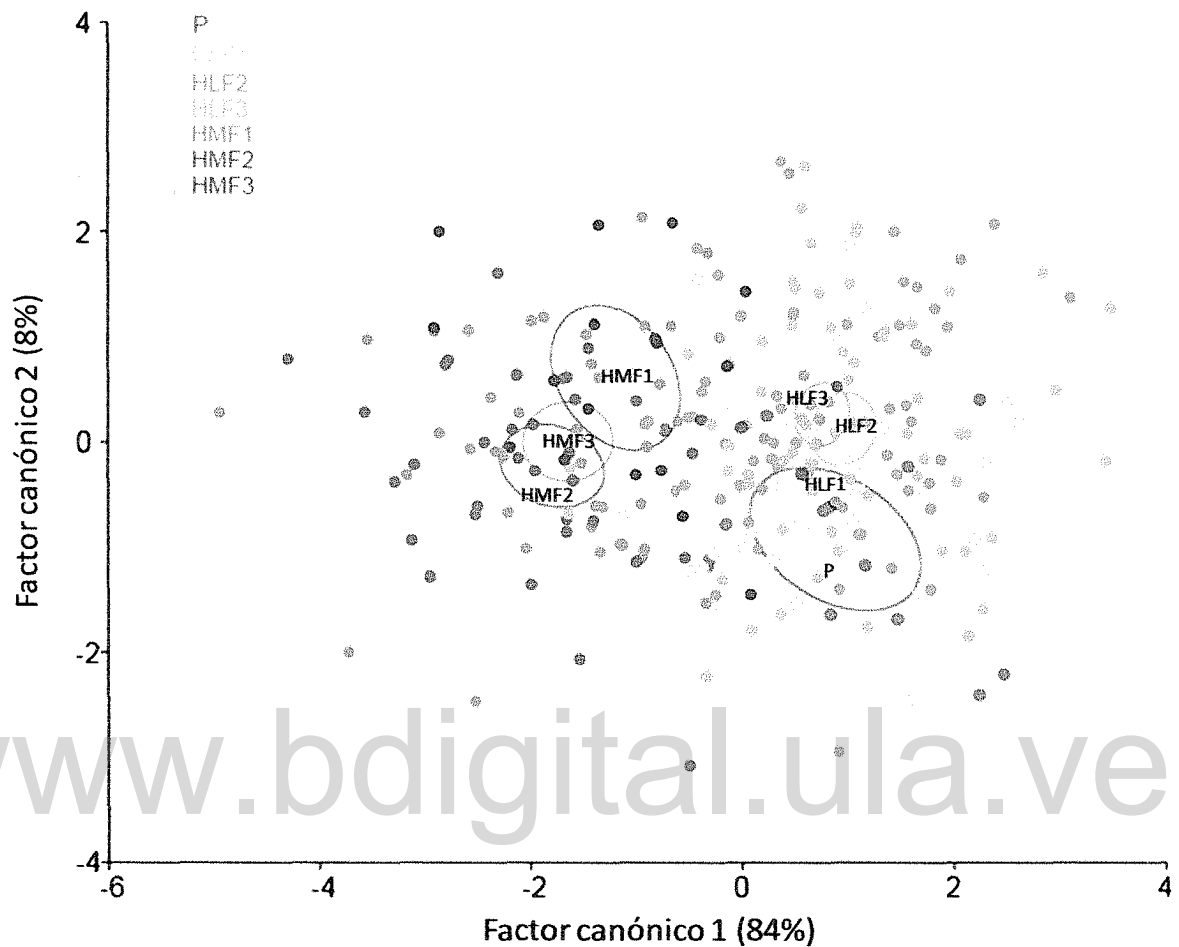


Figura 18. Espacio de la función canónica mostrando la localización de los fenotipos de conformación alar en los machos de las tres generaciones de laboratorio y los parentales. Las elipses representan el intervalo de confianza del promedio de la conformación de cada grupo con una probabilidad del 95%. P (parentales), F1HL (F1, Hemolinfagia), HMF1 (F1, Hematofagia), HLF2 (F2, Hemolinfagia), HMF2 (F2, Hematofagia), HLF3 (F3, Hematofagia), HMF3 (F3, Hematofagia).

Tabla 13. Distancias de Mahalanobis entre los fenotipos de conformación alar de los machos criados en laboratorio (hemolinfagia y hematófagia) y los machos parentales. Las distancias son significativas si $P < 0,00741$ después de la corrección de Bonferroni. Parentales (P), Hemolinfagia (HL) y Hematófagia (HM), F1 (primera generación), F2 (Segunda generación) F3 (Tercera generación), (*) Indica distancias estadísticamente significativas.

Grupos	Distancias de Mahalanobis	Valor p	% Reclasificación	% Verificación cruzada
P - HLF1	0,8561	0,4955	71-63	43-58
P - HLF2	1,2671	0,0103	71-73	50-70
P - HLF3	1,3038	0,0389	79-74	50-68
P - HMF1	2,7723	<.0001*	100-93	79-90
P - HMF2	2,8637	<.0001*	86-92	64-81
P - HMF3	2,658	<.0001*	79-100	64-88

Tabla 14. Distancias de Mahalanobis entre los fenotipos de conformación alar de los machos criados en laboratorio (hemolinfagia vs. hematofagia). Las distancias son significativas si $P < 0,00741$ después de la corrección de Bonferroni. Hemolinfagia (HL) y Hematofagia (HM), F1 (primera generación), F2 (Segunda generación) F3 (Tercera generación), (*) Indica distancias estadísticamente significativas.

Grupos	Distancias de Mahalanobis	Valor p	% Reclasificación	% Verificación cruzada
HLF1-HMF1	2,4688	<.0001*	90-90	87-83
HLF1-HMF2	2,6063	<.0001*	92-92	84-83
HLF1-HMF3	2,2699	<.0001*	90-94	87-88
HLF2-HMF1	2,4497	<.0001*	92-91	87-90
HLF2-HMF2	2,6409	<.0001*	93-89	92-86
HLF2-HMF3	2,1027	<.0001*	89-88	85-77
HLF3-HMF1	2,6471	<.0001*	94-89	94-84
HLF3-HMF2	2,7983	<.0001*	92-89	91-89
HLF3-HMF3	2,3596	<.0001*	94-89	94-100

Tabla 15. Distancias de Mahalanobis entre los fenotipos de conformación alar de los machos criados en laboratorio con un mismo hospedador. Las distancias son significativas si $P < 0,00741$ después de la corrección de Bonferroni. Hemolinfagia (HL) y Hematofagia (HM), F1 (primera generación), F2 (Segunda generación) F3 (Tercera generación), (*) Indica distancias estadísticamente significativas.

Grupos	Distancias de Mahalanobis	Valor <i>p</i>	% Reclasificación	% Verificación cruzada
HLF1-HLF2	0,8409	0,0122	58-70	56-62
HLF1 -HLF3	0,7487	0,1196	58-63	47-54
HLF2-HLF3	0,5363	0,2792	61-64	55-52
HMF1-HMF2	0,7865	0,1514	75-64	59-50
HMF1-HMF3	1,1701	0,0289	80-71	80-53
HMF2-HMF3	1,3165	0,0095	73-77	61-71

www.bdigital.ula.ve

6.3.2 Análisis del efecto alométrico en la conformación alar

El análisis de regresión de las variables de conformación alar de las hembras sobre el tamaño isométrico, reveló una contribución del tamaño en 7,4% a la variación del eje Y (Figura 19). Esta contribución fue estadísticamente significativa ($p < 0001$). La prueba estadística de homogeneidad de las pendientes, rechaza la hipótesis nula de un eje alométrico común para todos los grupos, en los dos análisis paramétrico y no paramétrico (Wilks 0,758 F 1,571 $p = 0,008$; Wilks 0,758 F 1,66 $p = 0,0032$), lo cual implicó que no procediera la corrección del efecto del tamaño sobre la conformación.

El análisis de regresión de las variables de conformación alar de los machos sobre el tamaño isométrico, reveló una contribución del tamaño en 2,9% a la variación del eje Y que fue estadísticamente significativa ($p = 0,0006$) (Figura 20). La prueba estadística de homogeneidad de las pendientes, no permitió aceptar la hipótesis nula de un eje alométrico común para todos los grupos. Tanto para la prueba paramétrica (Wilks 0,762 F 1,657 $p = 0,003$) como para la no paramétrica (Wilks 0,74 F 1,72 $p = 0,001$), razón por la cual no procedió la corrección del efecto del tamaño sobre la conformación alar de los machos.

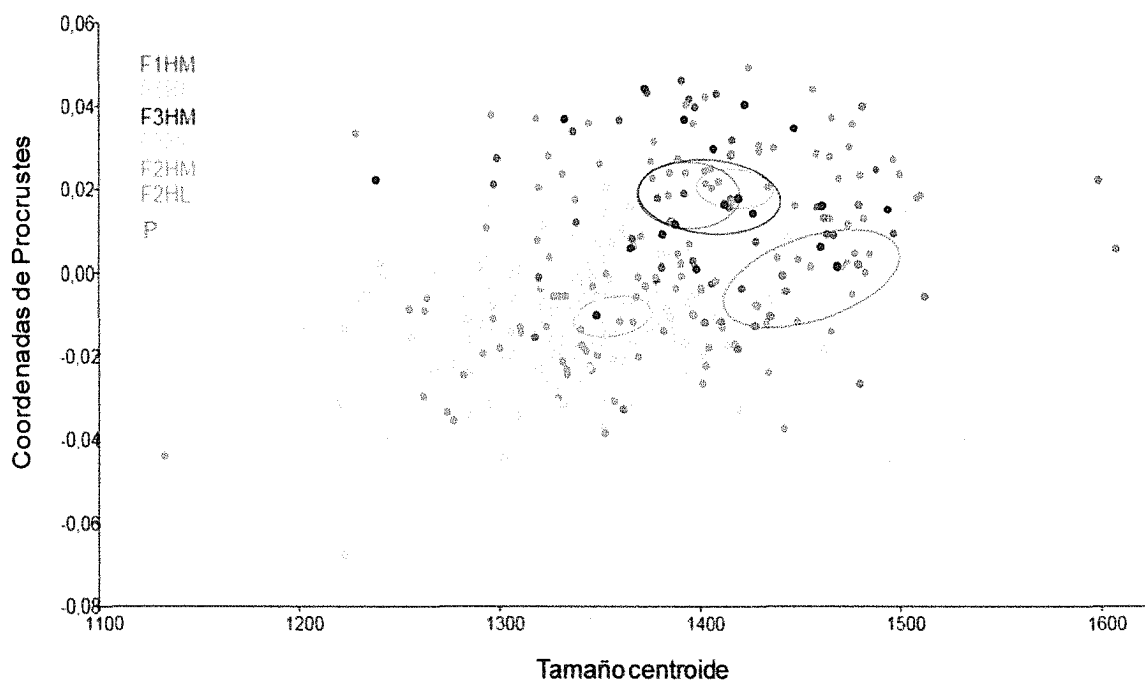


Figura 19. Efecto alométrico. Análisis de regresión entre las variables de conformación, coordenadas de Procrustes (variable dependiente) y el tamaño centroide (variable independiente) de todas las hembras incluidas en el estudio ($n = 305$). Las elipses representan el intervalo de confianza del promedio de la conformación alar de cada grupo localizadas según el tamaño centroide y con una probabilidad del 95%.

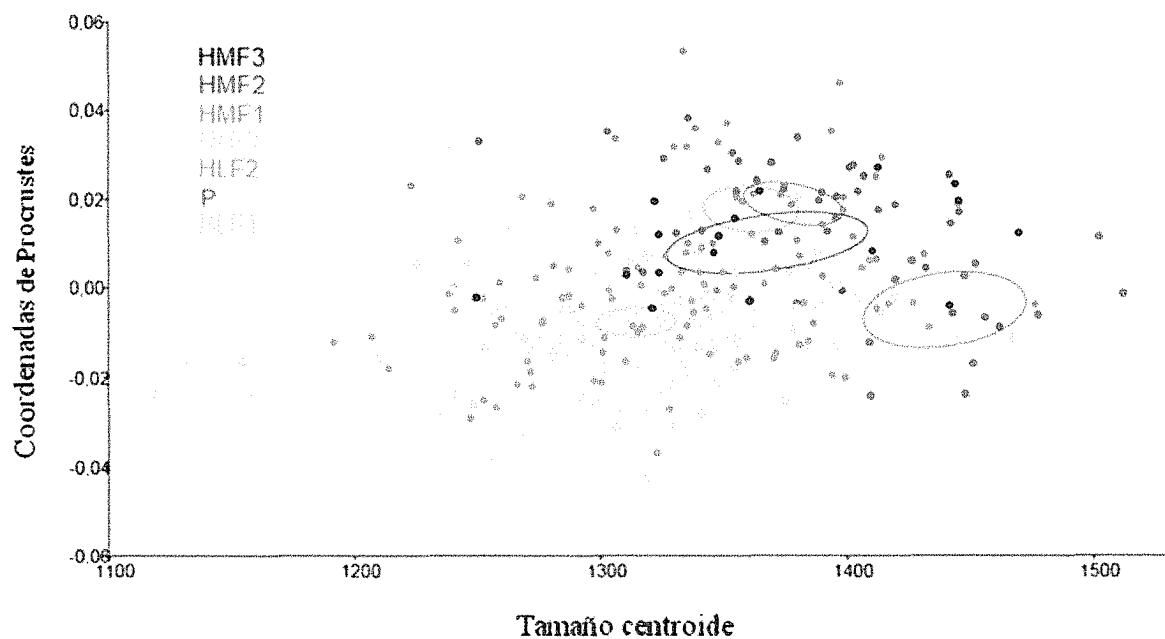


Figura 20. Efecto alométrico. Análisis de regresión entre las variables de conformación, coordenadas de Procrustes (variable dependiente) y el tamaño centroide (variable independiente) de todos los machos incluidos en el estudio ($n = 285$). Las elipses representan el intervalo de confianza del promedio de la conformación alar de cada grupo localizadas según el tamaño centroide y con una probabilidad del 95%.

6.3.3 Visualización de los cambios de la conformación entre pares de configuraciones

En las Figuras 21 y 22 se muestran los cambios en la conformación alar de hembras y machos respectivamente. La configuración referencia (celeste) en este caso particular, describe a la configuración de los parentales, y la azul oscura indica la deformación que sufre la configuración de los parentales al sobreponer la configuración de los insectos criados en laboratorio. Los pares comparados se corresponden a los mismos del análisis discriminante, y de los cuales se obtuvieron los porcentajes de reclasificación y de verificación cruzada (Tablas 10 y 13).

Este análisis permite intuir fácilmente, que existen menores diferencias entre las configuraciones de los parentales y las generaciones alimentadas por hemolinfagia.

Las tendencias en los cambios de la conformación alar fueron similares en las hembras y los machos de cada grupo criado en un determinado hospedador. Los cambios se ubicaron principalmente en los PAR 2 y 4 para las comparaciones entre los parentales y las generaciones criadas por hemolinfagia (Figuras 11 y 12). En el caso de los cambios producidos a la configuración parental al sobreponer las configuraciones de los insectos alimentados por hematofagia, los desplazamientos se ubicaron en los PAR 1, 2, 3 y 4 (Figuras 11 y 12).

Las deformaciones que producen las hembras criadas por hemolinfagia a la configuración parental fueron más acentuadas que las generadas por los machos del mismo grupo (Figuras 11 y 12). La situación inversa se observó en los insectos criados por hematofagia. Es posible verificar este resultado gráfico a través de los porcentajes de reclasificación y de verificación cruzada provistos por el análisis discriminante entre cada una de las configuraciones de los grupos comparados (Tabla 10 y 13).

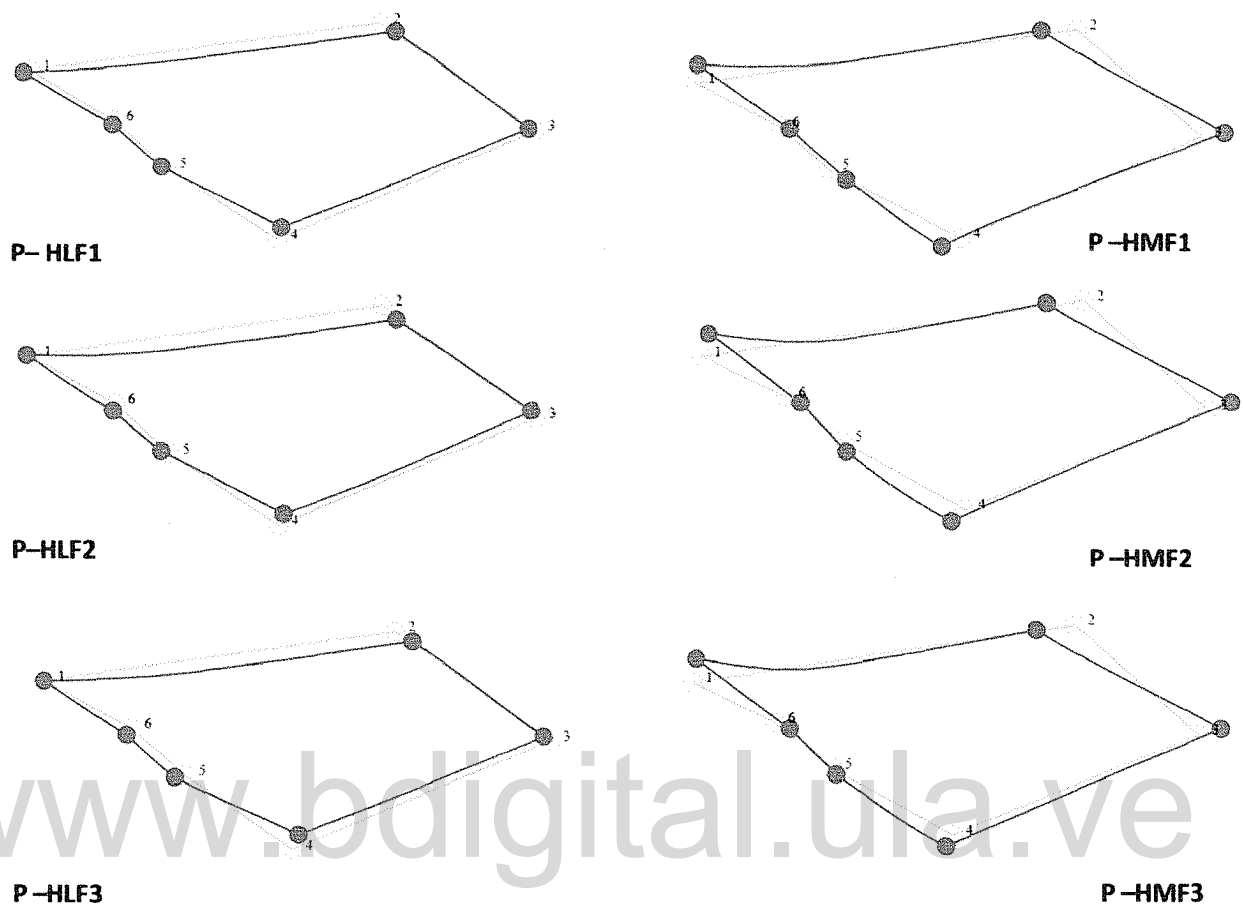


Figura 21. Deformación de la conformación alar en las hembras a través de los gráficos “soft wireframes”. La conformación celeste corresponde a la configuración promedio de las hembras parentales y la azul oscura a la deformación causada por las hembras de hemolinfagia o hematofagia a la configuración parental. Los puntos 1-6 corresponden a los PAR utilizados para definir la configuración. Parentales (P), Hemolinfagia (HL) y Hematofagia (HM), F1 (primera generación), F2 (Segunda generación) F3 (Tercera generación).

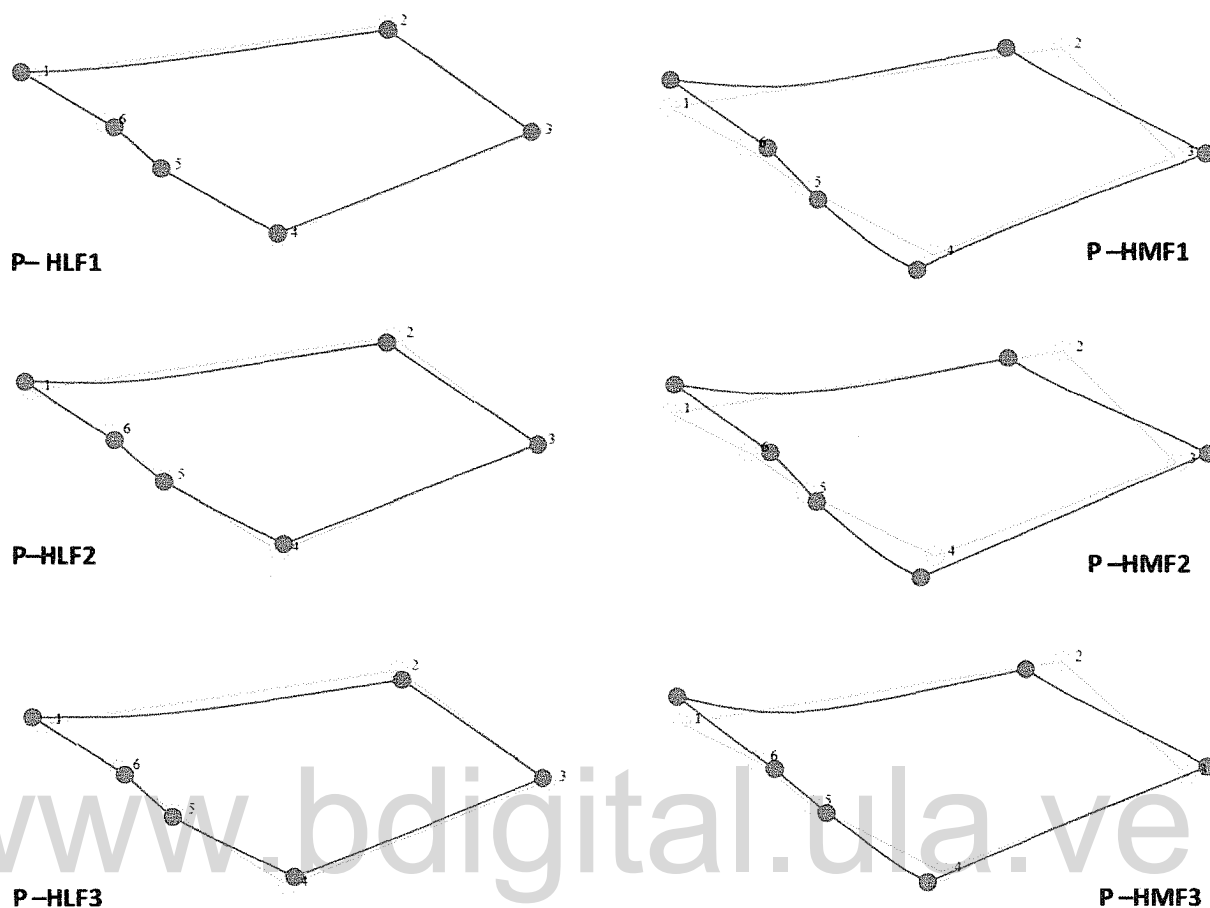


Figura 22. Conformación alar en machos por pares a través de gráficos de “soft wireframes”. La conformación celeste corresponde a la configuración promedio de los machos parentales (referencia) y la azul oscura a la deformación causada por los machos de hemolinfagia o hematofagia según la generación a comparar. Los puntos 1 - 6 corresponden a los PAR utilizados para definir la configuración. Parentales (**P**), Hemolinfagia (**HLF**) y Hematofagia (**HMF**), **F1** (primera generación), **F2** (Segunda generación) **F3** (Tercera generación).

7. Discusión

7.1 El tamaño alar

En los triatominos de los géneros *Rhodnius*, *Triatoma* y *Panstrongylus* es común observar una reducción en el tamaño del cuerpo, al criar estos insectos en el laboratorio por sucesivas generaciones o cuando ocurre la transición de una población silvestre al ambiente domiciliar (Zeledón 1981, Dujardin et al. 1999b, Jaramillo et al. 2002, Rodríguez et al. 2007). En este trabajo se observó una tendencia hacia la reducción en el tamaño alar de hembras y machos de la especie *B. ferroae* criados con ambos hospedadores (cucaracha o roedor). Sin embargo, la reducción en tamaño sólo fue significativa en los individuos alimentados por hemolinfagia (cucaracha).

El análisis de los contenidos intestinales de *B. ferroae*, capturado en los domicilios, sugiere que las cucarachas son el principal hospedador de esta especie (Sandoval et al. 2010). Por lo anterior, podría esperarse una mayor similitud en el tamaño, entre los individuos parentales y los alimentados por hemolinfagia, que con su contraparte alimentada por hematofagia.

En algunas ocasiones la variación del tamaño alar en condiciones naturales, se ha relacionado a las diferencias en el valor nutricional entre los hospedadores vertebrados (Schachter-Broide et al. 2009, Hernández et al. 2011). Por analogía, las diferencias nutricionales en los hospedadores invertebrados de *B. ferroae* encontrados en el campo y el ofrecido en laboratorio, podrían ayudar a explicar, las diferencias encontradas en el tamaño entre los parentales y la progenie alimentada con cucaracha. En el momento de las capturas dentro de los domicilios, los especímenes de *B. ferroae* se hallaron en simpatria con algunos blátidos, entre los que se destacó la presencia de *Periplaneta americana*. En el laboratorio para su alimentación por hemolinfagia utilizamos otra especie de cucaracha capturada en la misma región de procedencia de *B. ferroae*, pero perteneciente al género *Blaberus*. Adicionalmente, es importante considerar que las condiciones experimentales no coinciden totalmente con las encontradas por los insectos que infestan los domicilios; probablemente, enfrentados a restricciones en cuanto a la disponibilidad del hospedador y a mayores fluctuaciones de los factores ambientales como la temperatura, la humedad relativa y el fotoperiodo; sin duda determinantes en el tamaño de los insectos (Jaramillo et al. 2002, Schachter- Broide et al. 2009).

Las diferencias en el tamaño entre las generaciones contemporáneas de *B. ferroae* alimentadas con cucaracha o roedor pueden ser explicadas bajo la hipótesis de crecimiento (Zeledón 1981), la cual sugiere que los prologados tiempos de desarrollo generan insectos grandes y los tiempos cortos, insectos pequeños. En consonancia con lo anterior, Nijhout (1994) señala, que el control del tamaño del cuerpo no es tanto un control del crecimiento, sino un control de cuándo dejar de crecer. El tamaño corporal final se determina por la duración del período disponible para el crecimiento (Nijhout 2003, Schachter-Broide et al. 2009).

Algunos resultados, sobre el ciclo de vida de la especie *B. ferroae* dan apoyo a esta hipótesis. Al señalar que el tiempo de desarrollo desde ninfa a adulto fue significativamente más corto ($p < 0,001$) en los insectos alimentados por hemolinfagia (168.08♂-163.36♀ días) que en los insectos alimentados por hematofagia (218.84♂-223.62♀ días).

Entre los factores conocidos que pueden afectar el tamaño del cuerpo de los insectos bajo condiciones de laboratorio se encuentran: la temperatura, la densidad, la endogamia, la dieta (calidad nutricional) y el hospedador (Jirakanjanaki et al. 2007, Caro-Riaño et al. 2009, Soto et al. 2007, Aytekin et al. 2009, Schachter-Broide et al. 2009, Pavković-Lucić & Kekić 2010).

Las variables como la temperatura y la densidad fueron constantes en las condiciones experimentales bajo las cuales se estudió el ciclo de vida de *B. ferroae*. Luego, las diferencias en tamaño entre las generaciones contemporáneas de laboratorio criadas con los dos hospedadores no pueden ser explicadas por la heterogeneidad en estos factores. Por otro lado, la endogamia parece no incidir de manera importante, debido a que no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en el tamaño entre las sucesivas generaciones no contemporáneas, esto significa que a medida que se avanzó en la generación de laboratorio no hubo cambios consistentes en el tamaño de los insectos criados con uno u otro hospedador. Lo anterior indica que el tamaño se estabilizó a partir de la primera generación, similar a lo observado en *P. geniculatus* por Jaramillo et al. (2002) después cinco generaciones. Estos resultados contrastan con lo mostrado en otras especies de Triatominae, donde la reducción en el tamaño se inició a partir de la tercera generación (Pires et al. 2011) y con los resultados obtenidos en las sucesivas generaciones de *Aedes aegypti* criadas en laboratorio (Jirakanjanakit & Dujardin 2005). Sin embargo, es necesario considerar que en el estudio de *Aedes* se analizan colonias criadas a partir de la generación 17 hasta la generación 564.

Probablemente los efectos de la deriva genética estén operando sobre la variación morfológica (Jirakanjanakit & Dujardín 2005). En el trabajo de Pires et al. (2011), el factor densidad no fue examinado y puede ser determinante en el tamaño de los insectos (Caro-Riaño et al. 2009).

El diseño experimental presentó algunas diferencias en cuanto a la frecuencia del hospedador. Esto es, exposición constante (cucaracha) vs. semanal (roedor). En principio, esta heterogeneidad, podría explicar las diferencias en tamaño para cada uno de los hospedadores. Sin embargo, en roedor a pesar de que se tiene un mayor lapso de tiempo entre ingestas, también se tiene mayor probabilidad para obtener una ingesta completa.

Entonces, sin desconocer la importancia de la disponibilidad del hospedador en el tamaño de los insectos (Caro-Riaño et al. 2009), otros parámetros del ciclo de vida en *B. ferroae*, parecen indicar que las variaciones en cuanto a la disponibilidad en el hospedador, no implican una mayor ventaja para los insectos alimentados con cucaracha. Debido a que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el ritmo de ovipostura entre las hembras alimentadas con los dos hospedadores. Además la fecundidad (# total de huevos /hembra/semana), durante el periodo reproductivo fue mayor en los insectos alimentados con roedor (Ver Capítulo II).

En el caso que un mayor consumo de alimento se produjera en los insectos alimentados con cucaracha, las diferencias en estos dos aspectos reproductivos deberían ser significativas y a favor de este hospedador.

Por lo tanto, es viable considerar que otros factores como la preferencia por el hospedador, relacionado con su historia de vida, afecten el desarrollo del insecto. Guarneri et al. (2000) sugiere que en las especies, *T. infestans* y *T. brasiliensis* los ciclos de vida fueron más cortos al alimentarse con roedor que con ave, probablemente, por su estrecha asociación natural con el mamífero.

Por otro lado, el desempeño en algunos aspectos clave, relacionados con la adaptación a la dieta sanguínea, como son la eficiencia de las enzimas digestivas (Lehane 2005), la evolución de mecanismos para contrarrestar los efectos deletéreos, producto del estrés oxidativo (Graça-Souza et al. 2006) y el adecuado aporte de algunos factores nutricionales como la vitamina B (Eichler & Schaub 2002), podrían estar implicados en el retardo del tiempo de desarrollo de los insectos

alimentados por hematofagia y por ende de la frecuencia de individuos de mayor tamaño en este grupo.

Por otra parte, la existencia de dimorfismo sexual en Triatominae es bien conocida y se expresa con la presencia de hembras, en promedio, más grandes que los machos (Lent & Wygodzinsky 1979).

Nihjout (1994) señala que los individuos grandes almacenan reservas en mayor cantidad y calidad que los individuos pequeños. Un cuerpo de mayor tamaño podría ser más ventajoso para las hembras que para machos, porque incrementa la probabilidad de sobrevivir y de producir un mayor número de huevos (Rivero & West 2002, Salavert et al. 2011). El dimorfismo sexual frecuentemente se considera de carácter adaptativo, por su rol funcional en la reproducción y también porque individuos grandes tendrían más chance de ser seleccionados por su pareja al tener un mayor *fitness* (Salavert et al. 2011).

Sin embargo, en una misma especie el grado pero no la dirección en el dimorfismo sexual, puede verse afectado por las condiciones ambientales (Tammaru & Teder 2005). El análisis cuantitativo de los cambios en tamaño de especies, como *R. domesticus*, *R. prolixus* y *T. infestans* sugiere que la reducción en el tamaño promedio de la hembra puede conducir a una modificación del dimorfismo sexual (Dujardin et al. 1999b). Esta modificación se manifiesta generalmente en una disminución del mismo al someter las especies a condiciones más estables, como ambientes domésticos o crías de laboratorio. Es por esto que la reducción en este carácter morfológico se ha propuesto como un marcador morfológico de la domiciliación en los Triatominae (Dujardin et al. 1999b, Jaramillo et al. 2002, Rodríguez et al. 2007).

La persistencia del dimorfismo sexual en *P. geniculatus* después de la quinta generación en condiciones de laboratorio sugiere que más generaciones pueden ser necesarias para que este fenómeno pueda ser observado (Jaramillo et al. 2002).

La ausencia de dimorfismo sexual en *B. ferroae* colectado de los domicilios podría interpretarse como evidencia de que la incursión en este ambiente no es reciente (Dujardin et al. 1997, Dujardin et al. 1999^b), y que más de cinco generaciones se habrían desarrollado en los domicilios (Jaramillo et al. 2002). Sin embargo, la existencia de dimorfismo sexual después de la primera generación en el

laboratorio en la especie *B. ferroae* alimentada con cualquiera de los dos hospedadores (cucaracha o roedor) señala que en condiciones estables de cría, el dimorfismo sexual puede restablecerse.

A pesar de la consistente reducción del tamaño en la especie *B. ferroae*, no fue posible corroborar la hipótesis de reducción del dimorfismo en ambientes estables propuesta por Dujardin et al. (1999^b). Este resultado difiere también de las observaciones realizadas en otros grupos de insectos, en los cuales un incremento en el grado del dimorfismo sexual, generalmente se acompaña de un aumento en el tamaño del cuerpo de la hembra (Tammaru & Teder 2005). En *B. ferroae* no se percibió tal incremento en el tamaño de la hembra, probablemente otros factores diferentes a los tradicionalmente utilizados para explicar la expresión del dimorfismo sexual podrían estar operando (Salavert et al. 2011). Por ejemplo, los machos pequeños podrían tener mayor ventaja sobre los grandes en la movilidad y en el acceso a las hembras (Moya-Laraño et al. 2002). Igualmente, estos resultados señalan el uso prudente del dimorfismo sexual como marcador de domiciliación para esta especie de Triatominae.

Por otro lado, algunos estudios sugieren que el tamaño de hembra es más sensible que el de los machos a las condiciones ambientales (Tammaru & Teder 2005). En *B. ferroae* no observamos tal diferencia, las hembras y los machos respondieron de manera similar a las condiciones expuestas (Tabla 7).

7.2 La conformación alar

El hospedador es un factor ambiental que afecta los aspectos morfo-fisiológicos de los Triatominae (Dujardin et al. 1999b, Rabinovich et al. 2011, Hernández et al. 2013). En los parámetros demográficos que definen el *fitness* es clara la influencia del hospedador (Cabello et al. 1987). Igualmente en los tiempos de desarrollo (Guarneri et al. 2000, Martínez-Ibarra et al. 2003), en las tasas de mortalidad y fecundidad (Lorosa et al. 2000, Aldana & Lizano 2004, Nattero et al. 2011), lo cual denota su gran valor adaptativo en este grupo de insectos.

En este estudio, se demuestra por primera vez el consistente efecto que ejerce el hospedador sobre la conformación alar en una especie de triatomo, *B. ferroae*. Recientemente, en *T. infestans* se

demostró la influencia del hospedador (paloma y cobayo) en la conformación de la cabeza (Nattero et al. 2013).

Klingenberg et al. (2004) señalan que la conformación presenta mayor estabilidad que el tamaño frente a ciertos factores ambientales. En el triatomino *R. pallens*, los factores como la densidad y la disponibilidad del hospedador no lograron modificar la conformación de las alas y las cabezas en esta especie (Caro-Riaño et al. 2009). Sin embargo, en *Aedes aegypti* el efecto de la densidad y la concentración de alimento influyeron significativamente en la conformación alar, pero los cambios generalmente se asociaron con una fuerte contribución del tamaño (Jirakanjanaki et al. 2007).

En *B. ferroae*, la regresión de las variables de la conformación alar y el tamaño centroidal reveló un bajo efecto alométrico tanto en hembras como en machos (7,4% y 2,9%) respectivamente. Esto significa que las diferencias en la conformación no pueden atribuirse completamente a este efecto, porque aunque significativo, su contribución es pequeña (Gumiel et al. 2003, Zelditch et al. 2004, Soto et al. 2007). Debido a que un importante porcentaje de la conformación es independiente del tamaño, otros factores podrían estar involucrados en las diferencias en la conformación alar entre los grupos. En este estudio partimos de una misma población (el mismo acervo genético) y los factores ambientales como la temperatura y la densidad fueron controlados; lo cual permite sugerir que las divergencias morfológicas encontradas solamente podrían atribuirse al efecto del hospedador.

Varios estudios señalan la influencia que puede ejercer el hospedador o la dieta en la inducción de la plasticidad fenotípica en los organismos. Andersson et al. (2006) demuestran que en la carpa *Carassius carassius* cambios en la conformación del cuerpo fueron inducidos por la dieta (zooplankton o quironomidos bentónicos). De manera similar, la conformación del aparato mandibular en el cíclido *Amphilophus* spp. dependió del estímulo mecánico de la dieta (Muschick et al. 2011). En las especies del género *Drosophila* pertenecientes al grupo *repleta*, la conformación del aedeago difiere significativamente dependiendo de cuál sea el cactus hospedador (Soto et al. 2008).

En *B. ferroae*, el análisis canónico de la varianza mostró que las distancias de Mahalanobis siempre fueron mayores y estadísticamente significativas ($p < 0,0083$), entre el fenotipo de la conformación alar de los parentales y el exhibido por los individuos alimentados por hematofagia en roedor, sea hembra (2,239 - 2,461) o macho (2,658 - 2,863). En contraste, las distancias de Mahalanobis

siempre fueron menores entre el fenotipo de los parentales y el de los insectos alimentados por hemolinfagia en las hembras (1,0127 - 1,5354), con diferencias significativas sólo a partir de la segunda generación ($p < 0,0083$), o en los machos (0,8661 - 1,3038) sin diferencias estadísticamente significativas con respecto a las tres generaciones de laboratorio ($p > 0,0083$). Estos resultados indican una mayor similaridad entre el fenotipo alar entre los parentales y los insectos criados con cucaracha. Por lo tanto, a partir de estos resultados es factible deducir que la población de campo probablemente se está alimentando de un hospedador invertebrado similar al utilizado en laboratorio y da cuenta de la viabilidad del ciclo de vida de *B. ferroae* con cucarachas en condiciones naturales (domicilios). Estos datos se corresponden con la información provista por el perfil alimentario de *B. ferroae* encontrado dentro de los domicilios, que señaló que el 89,6% de los contenidos intestinales tenían hemolinfa, probablemente de cucarachas (Sandoval et al. 2010). Algunas especies de Triatominae como *T. rubrovaria*, *T. caracallosi* y *T. circummaculata* de hábitat rupestre se han encontrado asociadas a diversas especies de cucarachas (Lorosa et al. 2000, Ruas-Neto et al. 2001).

Las diferencias que muestran los gráficos de filamentos (wireframe) en el grado de la deformación que producen las configuraciones de las hembras y los machos criados por hemolinfagia a la conformación parental, donde es evidente que los machos se ajustan mejor a la configuración de los parentales, nos permite suponer que las hembras de campo podrían ser más eclécticas en la dieta, esto es que ocasionalmente incluyen en su alimentación algunos hospedadores vertebrados; como efectivamente lo señala el estudio de los contenidos intestinales de los insectos capturados dentro de los domicilios, y en los cuales se detectó un pequeño porcentaje (7%) con sangre de humano, perro y/o roedor (Sandoval et al. 2010). La situación opuesta en el grado de deformación que produce la configuración alar de las hembras y los machos criados por hematofagia a la configuración parental, es consistente con los resultados de los insectos alimentados por hemolinfagia y fortalece la hipótesis de la existencia de un mayor eclecticismo alimentario en las hembras de las poblaciones naturales de *B. ferroae*. Estas observaciones se soportan bien con los porcentajes de las pruebas de reclasificación y de verificación cruzada obtenidos en el análisis discriminante (Tablas 10 y 13).

Los parámetros demográficos obtenidos a partir del análisis de la historia de vida, proveen información valiosa sobre la capacidad innata de una especie a multiplicarse sobre un determinado hospedador (Vasicek et al. 2001). *B. ferroae* mostró mayores y significativas ventajas reproductivas

a nivel poblacional cuando fue alimentada sobre el hospedador *Blaberus* (Ver Capítulo II). Estos resultados asociados a la similaridad del fenotipo alar con los insectos capturados en campo y al perfil alimentario, permiten sugerir, una mayor adaptación de esta especie con el hospedador invertebrado, como se viene proponiendo por Sandoval et al. (2010).

En cuanto al fenotipo expresado por los individuos criados por hemotofagia, se conoce que la plasticidad fenotípica no es inherentemente adaptativa; en algunos casos puede representar una respuesta inevitable del organismo que no implica una mayor aptitud biológica (Wells & Pigliucci 2000, Meyers & Bull 2002). En consecuencia, individuos criados bajo condiciones ambientales extremas por lo general presentan una considerable distorsión fenotípica, y con el tiempo, estos individuos pueden presentar tasas de reproducción muy baja y mortalidad prematura (Bradshaw, 1965). Lo anterior se correlaciona bien con el bajo éxito reproductivo de *B. ferroae* alimentado por hemotofagia y la elevada mortalidad en la fase de huevo que supone una condición adversa con el hospedador vertebrado (Ver Capítulo II). Aunque este comportamiento debe ser considerado una expresión de la plasticidad fenotípica, en efecto, es reflejo de falta de adaptación a condiciones extremas del ambiente (Chambell et al. 2005). En el caso de *B. ferroae* debido a la alimentación exclusiva por hematofagia.

El análisis de la plasticidad fenotípica, a través de la técnica de la morfometría geométrica en la especie *B. ferroae*, permitió discriminar la expresión morfológica producida por un par de potenciales hospedadores (cucaracha y roedor) e incriminar a las cucarachas como la principal fuente de alimento utilizada por estos insectos dentro de los domicilios. Resultados que fortalecen la hipótesis, de que este Triatominae no es un hematófago obligado y que las especies del género *Belminus* en su espectro de hospedadores incluye principalmente artrópodos y ocasionalmente mamíferos aves y reptiles (Sandoval et al. 2004, Sandoval et al. 2010).

La asociación del fenotipo alar con un factor ambiental, corrobora la utilidad de la plasticidad fenotípica como estrategia para predecir el origen de las poblaciones (Schachter-Broide et al. 2004, Dujardin et al. 2006, Feliciangeli et al. 2007, Hernández et al. 2013) y en el trazado de la movilidad de los triatominos entre los diversos ecotopos como demostrado por Abraham et al. (2008) y Hernández et al. (2011).

Por último, podemos afirmar que el análisis de la conformación alar en la especie *B. ferroae* permitió discriminar y relacionar de manera consistente el hospedador con el fenotipo alar. Lo cual sugiere que este aspecto morfológico del ala es un marcador biológico sensible al hospedador en los Triatominae.

8. Conclusiones

Se encontró un consistente efecto del hospedador en el tamaño y la conformación alar de *B. ferroae*, lo cual confirma la importancia ecológica de este factor ambiental en la morfo-fisiología de los Triatominae.

La similaridad encontrada entre el fenotipo de conformación alar de los insectos capturados en los domicilios y en los insectos criados por hemolinfagia en el laboratorio, es un argumento a favor de la hipótesis que señala a las cucarachas como los principales hospedadores de *B. ferroae*.

Un mayor *fitness* poblacional con cucaracha, la similaridad del fenotipo alar entre los insectos capturados en campo y las generaciones de laboratorio alimentadas con cucarachas, y el perfil alimentario de *B. ferroae* dentro de los domicilios, son evidencias que permiten sugerir que el comportamiento predador en esta especie probablemente esté relacionado con un proceso de tipo adaptativo, y conduce también a fortalecer la hipótesis de que no todos los Triatominae son hematófagos estrictos.

Se confirma una vez más la utilidad del análisis de la plasticidad fenotípica en la detección de patrones morfológicos y su potencial para resolver interrogantes en disímiles contextos biológicos.

9. Referencias

1. Abrahan L, Hernández L, Gorla D, Catalá S 2008. Phenotypic diversity of *Triatoma infestans* at the microgeographic level in the Gran Chaco of Argentina and the Andean valleys of Bolivia *J Med Entomol* 45: 660-666.

2. Agrawal AG 2001. Phenotypic Plasticity. Phenotypic Plasticity in the Interactions and Evolution of Species. *Science* 294: 321-326
3. Aldana E, Lizano E 2004. Defecation index and reproductive success of *Triatoma maculata* (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions. *Rev Biol Trop* 52: 927-30.
4. Andersson J, Johansson F, Soderlund T 2006. Interactions between predator- and diet-induced phenotypic changes in body shape of crucian carp. *Proc R Soc* 273: 431-437.
5. Aytekin S, Aytekin AM, Alten B 2009. Effect of different larval rearing temperatures on the productivity (Ro) and morphology of the malaria vector *Anopheles superpictus* Grassi (Diptera: Culicidae) using geometric morphometrics. *J Vector Ecol* 34: 32-42.
6. Baltanás A, Danielopol DL 2011. Geometric Morphometrics and its use in ostracod research: a short guide. *Joannea Geol Palaont* 11: 235-272.
7. Batista VS., Fernandes FA, Cordeiro-Estrela P, Sarquis O, Lima MM 2012. Ecotope effect in *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae) suggests phenotypic plasticity rather than adaptation. *Med Vet Entomol* Sep 18. doi: 10.1111/j.1365-2915.2012.01043.x. [
8. Bookstein FL 1991. Morphometric Tools for Landmark Data: Geometry and Biology. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 435.
9. Bradshaw AD 1965. Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. *Adv Genet* 13: 115-155.
10. Bustamante DM, Monroy C, Menes M, Rodas A, Salazar-Schettino PM, Rojas G, Pinto N, Guhl F, Dujardin JP 2004. Metric variation among geographic populations of the Chagas vector *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) and related species. *J Med Entomol* 41: 296-301.
11. Cabello DR, Lizano E, Valderrama A 1987. Vital statistics of *Rhodnius neivai* Lent, 1953 (Hemiptera: Reduviidae) under experimental conditions. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 82: 511-524.

12. Caro-Riaño H, Jaramillo N, Dujardin JP 2009. Growth changes in *Rhodnius pallescens* under simulated domestic and sylvatic conditions. *Infect Genet Evol* 9: 162-168.
13. Cassel-Lundhagen A, Tammaru T, Windig JJ, Ryrholm N, Nylin S 2009. Are peripheral populations special? Congruent patterns in two butterfly species. *Ecography* 32: 591-600.
14. Catalá SS, Maida DM, Caro-Riaño H, Jaramillo N, Moreno J 2004. Changes associated with laboratory rearing in antennal sensilia patterns of *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, and *Rhodnius pallescens* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 25-30.
15. Chambel MR, Climent J, Alía R, Valladares F 2005. Phenotypic plasticity: a useful framework for understanding adaptation in forest species. *Invest Agrar: Sist Recur For* 14: 334-344.
16. Debat V, Cornette R, Korol AB, Nevo E, Soulet D, David JR 2008. Multidimensional Analysis of *Drosophila* wing variation in *Evolution Canyon* *J Genet* 87: 407-419.
17. Dorchin N, Scott ER, Clarkin CE, Luongo MP, Jordan S, Abrahamson WG 2009. Behavioural, ecological and genetic evidence confirm the occurrence of host-associated differentiation in goldenrod gall-midges. *J Evol Biol* 22: 729-739.
18. Dujardin JP, Beard CB, Ryckman R 2006. The relevance of wing geometry in entomological surveillance of Triatominae, vectors of Chagas disease. *Infect Genet Evol* 7: 161-7.
19. Dujardin JP, Bermudez H, Casini C, Schofield CJ, Tibayrenc M 1997. Metric differences between silvatic and domestic *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) in Bolivia. *J Med Entomol* 34: 544-551.
20. Dujardin JP, Panzera P, CJ Schofield 1999a. Triatominae as a Model of Morphological Plasticity under Ecological Pressure. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 223-228.
21. Dujardin JP, Steinden M, Chavez T, Machane M, Schofield 1999b. Changes in the sexual dimorphism of triatominae in the transition from natural to artificial habitats. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 565-569.

22. Dujardin JP 2008. Morphometrics applied to medical entomology. *Infect Genet Evol* 8: 875-890.
23. Eichler S, Schaub GA 2002. Development of symbionts in triatomine bugs and the effects of infections with trypanosomatids. *Exp Parasitol* 100: 17-27.
24. Feliciangeli MD, Sanchez-Martin M, Marrero R, Davies C, Dujardin JP 2007. Morphometric evidence for a possible role of *Rhodnius prolixus* from palm trees in house re-infestation in the State of Barinas (Venezuela). *Acta Trop* 101: 169-77.
25. Figueirido B, Palmqvist P, Perez -Claros JA 2008. Ecomorphological correlates of craniodental variation in bears and paleobiological implications for extinct taxa: an approach based on geometric morphometrics *J Zool* 277: 70-80.
26. Fordyce JA 2006. The evolutionary consequences of ecological interactions mediated through phenotypic plasticity. *J Exp Biol* 209: 2377-2383.
27. Graça-Souza AV, Maya-Monteiro C, Paiva-Silva GO, Braz GR, Paes MC, Sorgine MH, Oliveira MF, Oliveira PL 2006. Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. *Insect Biochem Mol Biol* 36: 322-335.
28. Guarneri AA, Pereira MH, Diotaiuti L 2000. Influence of the blood meal source on the development of *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma sordida*, and *Triatoma pseudomaculata* (Heteroptera, Reduviidae). *J Med Entomol* 37: 373-379.
29. Gumiel M, Catalá S, Noireau F, Rojas de Arias A, García A, Dujardin JP (2003). Wing geometry in *Triatoma infestans* (Klug) and *T. melanosoma* Martinez, Olmedo & Caracavallo (Hemiptera: Reduviidae). *Syst Entomol* 28: 173-179.
30. Gurgel-Gonçalves R, Abad-Franch F, Ferreira JB, Santana DB, Cuba CA 2008. Is *Rhodnius prolixus* (Triatominae) invading houses in central Brazil? *Acta Trop* 107: 90-98.
31. Hernández ML, Abraham LB, Dujardin JP, Gorla DE, Catalá SS 2011. Phenotypic variability and population structure of peridomestic *Triatoma infestans* in rural areas of the arid Chaco (Western Argentina): spatial influence of macro- and microhabitats. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11: 503-513.

32. Hernandez ML, Dujardin JP, Gorla DE, Catalá SS 2013. Potential sources of *Triatoma infestans* reinfesting peridomiciles identified by morphological characterization in Los Llanos, La Rioja, Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108: 91-97.
33. Jaramillo N, Dujardin JP 2002. Análisis Morfométrico: significado biológico del tamaño y la conformación. En: F Guhl, CJ Schofield. Proceedings fourth international workshop on populations genetics and control of triatominae, Universidad de Los Andes, Bogotá, Colombia. Cartagena de Indias, p. 151-166.
34. Jaramillo ON, Castillo D, Wolff E M 2002. Geometric morphometric differences between *Panstrongylus geniculatus* from field and laboratory. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 667-673.
35. Jirakanjanakit N, Dujardin JP 2005. Discrimination of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) laboratory lines based on wing geometry. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 36: 858-861.
36. Jirakanjanakit N, Leemingsawat S, Thongrunkiat S, Apiwathnasorn C, Singhaniyom S, Bellec C, Dujardin JP 2007. Influence of larval density or food variation on the geometry of the wing of *Aedes (Stegomyia) aegypti*. *Trop Med Int Health* 12: 1354-1360.
37. Khiaban NGMZ, Haddad Irani Nejad K, Hejazi MS, Mohammadi SA, Sokhandan N. 2010. A geometric morphometric study on the host populations of the Pod Borer, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in some parts of Iran. *Munis Entomology & Zoology* 5: 140-147.
38. Klingenberg CP 2002. Morphometrics and the role of the phenotype in studies of the evolution of developmental mechanisms. *Gene* 287: 3-10
39. Klingenberg CP 2011. MORPHOJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Mol Ecol Resour* 11: 353-357.
40. Klingenberg CP, Barluenga M, Meyer A 2002. Shape analysis of symmetric structures: quantifying variation among individuals and asymmetry. *Evolution* 56: 1909-1920.

41. Klingenberg CP, Leamy LJ, Cheverud JM 2004. Integration and modularity of quantitative trait locus effects on geometric shape in the mouse mandible. *Genetics* 166:1909-1921.
42. Klingenberg CP, Monteiro L 2005. Distances and Directions in Multidimensional Shape Spaces: Implications for Morphometric Applications. *Syst Biol* 54: 678-688.
43. Langerhans RB, DeWitt TJ 2002. Plasticity constrained: over-generalized induction cues cause maladaptive phenotypes. *Evol Ecol Res* 4: 857-870.
44. Lehane MJ 2005. The Biology of Blood-Sucking in Insects, 2nd ed., Cambridge University Press, Cambridge, 320 pp.
45. Lent H, Wygodzinsky P 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. *Bull Am Mus Nat Hist* 163: 123-520.
46. Lorosa ES, Jurberg J, Souza AL, Vinhaes MC, Nunes IM 2000. Hemolinfa de Dictyoptera na manutenção do ciclo biológico silvestre de *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) e *Triatoma circummaculata* (Stal, 1859) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Entomol Vect* 7: 287-296.
47. Mackay, TFC 2004. The genetic architecture of quantitative traits: lessons from *Drosophila*. *Curr Opin Genet Dev* 14: 253-257.
48. Márquez E, Jaramillo-O N, Gómez-Palacio A, Dujardin JP 2011. Morphometric and molecular differentiation of a *Rhodnius robustus*-like form from *R. robustus* Lrousse, 1927 and *R. prolixus* Stal, 1859 (Hemiptera, Reduviidae). *Acta Trop* 120: 103-9.
49. Martínez-Ibarra JA, Novelo López M, Hernández Robles M del R, Grant Guillén Y 2003. Influence of the blood meal source on the biology of *Meccus picturatus* Usinger 1939 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) under laboratory conditions. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 227-32.
50. Meyers LA, Bull JJ 2002. Fighting change with change: Adaptive variation in an uncertain world. *Trends Ecol Evol* 17: 551-557.

51. Moya-Laraño J, El-Sayyid MET, Fox CW 2007. Smaller beetles are better scramble competitors at cooler temperatures. *Biol Lett* 3: 475-478.
52. Mozaffarian F, Sarafrazi A, Nouri Ganbalani G 2007. Host plant-associated population variation in the carob moth *Ectomyelois ceratoniae* in Iran: A geometric morphometric analysis suggests a nutritional basis. 11pp. *J Insect Sci* 7: 02, available online: insectscience.org/7.02.
53. Muschick M, Barluenga M, Salzburger W, Meyer A 2011. Adaptive phenotypic plasticity in the Midas cichlid fish pharyngeal jaw and its relevance in adaptive radiation. *BMC Evol Biol* 11:116 doi:10.1186/1471-2148-11-116.
54. Nattero J, Leonhard G, Rodríguez CS, Crocco L 2011. Influence of the quality and quantity of blood ingested on reproductive parameters and life-span in *Triatoma infestans* (Klug). *Acta Trop* 119: 183-187.
55. Nattero J, Malerba R, Rodríguez CS, Crocco L 2013. Phenotypic plasticity in response to food source in *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Hemiptera, Reduviidae: Triatominae). *Infect Genet Evol* 19: 38 - 44.
56. Nijhout HF 1994. Insect Hormones. Princeton University Press, Princeton, 269 pp.
57. Nijhout HF 2003. The control of body size in insects. *Dev Biol* 261: 1-9.
58. Pavković-Lucić S, Kekić V 2010. Nutrition quality, body size and two components of mating behavior in *Drosophila melanogaster*. *Folia Biol* 58: 113-117.
59. Pires HHR, Barbosa SE, Borges EC, Silva JÁ, Siqueira AM, Diotaiuti L 2011. Head morphometry and isoenzymatic profile of two *Triatoma infestans* Klug 1834, (Hemiptera: Reduviidae), populations. *Acta Trop* 118: 190-195
60. Rabinovich JE, Dan Kitron U, Obed Y, Yoshioka M, Gottdenker N, Chaves LF 2011. Ecological Patterns of Blood-Feeding by Kissing-Bugs (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106: 479-494.

61. Rivero A & West S 2002 The physiological costs of being small in a parasitic wasp. *Evol Ecol Res* 4: 407-420.
62. Rodríguez Rodríguez J, Fuentes González O, Nodarse JF, Monzote Fidalgo L, Dujardin JP 2007. Morphometric changes of *Triatoma flavida* Neiva, 1911 (Hemiptera: Triatominae) in the transition from sylvatic to laboratory conditions. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 49: 127-30.
63. Rohlf FJ, Bookstein FL 2003. Computing the Uniform Component of Shape Variation. *Syst Biol* 52: 66-69.
64. Ruas-Neto AL, Corseuil E, Cavalleri A 2001. Development of rupestrian triatomines (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) following haemolymphagy on blaberids (Blattodea: Blaberidae) in Rio Grande do Sul State, Brazil. *Entomol Vect* 8: 205-216.
65. Sadeghi S, Adriaens D, HJ 2009. Geometric morphometric analysis of wing shape variation in ten European populations of *Calopteryx splendens* (Harris, 1782) (Zygoptera: Odonata). *Odonatologica* 38: 343-360.
66. Salavert V, Zamora-Muñoz C, Ruiz-Rodríguez M, Soler J 2011. Female-biased size dimorphism in a diapausing caddisfly, *Mesophylax aspersus*: effect of fecundity and natural and sexual selection. *Ecol Entomol* 36: 389-395.
67. Sandoval CM, Ortiz N, Jaimes D, Lorosa E, Galvão C, Rodríguez O, Scorza JV, Gutiérrez R 2010. Feeding behaviour of *Belminus ferroae* (Hemiptera: Reduviidae), a predaceous Triatominae colonizing rural houses in Norte de Santander, Colombia. *Med Vet Entomol* 24: 124-31.
68. Sandoval CM, Duarte R, Gutiérrez R, Rocha Dda S, Angulo VM, Esteban L, Reyes M, Jurberg J, Galvão C 2004. Feeding sources and natural infection of *Belminus herreri* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) from dwellings in Cesar, Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 137-140.
69. Santos SM, Lopes CM, Dujardin JP, Panzera F, Perez R, Carbajal de la Fuente AL, Pacheco RS, Noireau F 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.
70. Schachter-Broide J, Dujardin JP, Kitron U, Gürtler RE 2004. Spatial structuring of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) populations from northwestern Argentina using wing geometric morphometry. *J Med Entomol* 41: 643-649.
71. Schachter-Broide J, Gürtler RE, Kitron U, Dujardin JP 2009. Temporal variations of wing size and shape of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) populations from northwestern Argentina using geometric morphometry. *J Med Entomol* 46: 994-1000.
72. Schlichting, C. D. and M. Pigliucci 1998. Phenotypic Evolution a Reaction Norm. Perspective. Sinauer Associates, Sunderland, 387pp.
73. Soto IM, Carreira VP, Soto EM, Hasson E 2007. Wing morphology and fluctuating asymmetry depend on the host plant in cactophilic *Drosophila*. *J Evol Biol* 21: 598-609.
74. Soto IM, Manfrin MH, Hasson E 2008. Host-dependent phenotypic plasticity of aedeagus morphology in a pair of cactophilic sibling *Drosophila* species of the repleta group (Diptera, Drosophilidae). *J Zool Syst Evol Res* 46: 368-373
75. Tammaru T, Teder T 2005. Sexual size dimorphism within species increases with body size in insects. *Oikos* 108: 321-334.
76. Torres K, Avendaño-Rangel F, Lizano E, Rojas M, Rodríguez-Bonfante C, Bonfante-Cabarcas R, Aldana E 2010. Viability and spatial structuring in a *Triatoma maculata* (Hemiptera: Reduviidae) laboratory colony fed with human blood. *Biomédica* 30: 72-81.
77. Toro IMV, Manriquez SG, Suazo GI. 2010. Morfometría Geométrica y el estudio de las formas biológicas: De la morfología descriptiva a la morfología cuantitativa. *Int J Morph* 28: 977-990.
78. Vasicek A, La Rossa F, Paglioni A 2001. Parámetros biológicos y poblacionales de dos especies de Neotoxoptera Theobald (Homoptera: Aphidoidea) sobre ciboulette (*Allium schoenoprasum* L.) en condiciones de laboratorio. *Rev Fac Agronomía UBA* 21: 99-104

79. Villegas J, Feliciangeli MD, Dujardin JP 2002. Wing shape divergence between *Rhodnius prolixus* from Cojedes (Venezuela) and *Rhodnius robustus* from Mérida (Venezuela). *Infect Genet Evol* 2: 121-128.
80. Viscosi V, Cardini A 2011. Leaf Morphology, Taxonomy and Geometric Morphometrics: A Simplified Protocol for Beginners. *PLoS ONE* 6(10): e25630. doi:10.1371/journal.pone.0025630.
81. Wells C, Pigliucci M 2000. Adaptive phenotypic plasticity: the case of heterophylly in aquatic plants. *Perspect Plant Ecol Evol Syst* 3: 1-18.
82. Whitman DW, Agrawal AA 2009. What is phenotypic plasticity and why is it important? In DW Whitman, TN Ananthakrishnan, Phenotypic Plasticity of Insects: mechanisms and consequences, Science Publishers, New Hampshire, p. 1-63.
83. Zelditch M, Swiderski D, Sheets D 2012. A Practical Companion to Geometric Morphometrics for Biologists: Running analyses in freely-available software. Elsevier. <http://booksite.elsevier.com/9780123869036/content/Workbook.pdf>. Fecha de acceso 3 febrero 2013.
84. Zelditch ML, Swiderski DL, Sheets HD, Fink WL 2004. Geometric morphometrics for biologists a primer. Elsevier. Academic press, California, 443 pp.
85. Zeledón R 1981. El *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) y su relación con la enfermedad de Chagas. En INCIESA y Editorial EUNED, 164 pp.

Capítulo IV. Ampliación del análisis morfológico en *B. corredori*, *B. ferroae* y *B. herreri* y la evaluación de sus estatus taxonómicos.

1. Introducción

El empleo de información adicional de algunos marcadores moleculares (isoenzimas, ADN mitocondrial y nuclear) y morfológicos (sensilia antenales, morfometría de alas y cabezas, esculpido corionico de los huevos) ha incrementado el conocimiento de la morfología de los Triatominae, pero no sólo eso, en algunas ocasiones ha respaldado el relacionamiento a nivel tribal y genérico. Además, ha sido de gran utilidad en la evaluación del estatus específico en los Triatominae (Monteiro et al. 1999, Gumiel et al. 2003, Catalá et al. 2005, Páez-Colasante & Aldana 2008).

La mayoría de las especies de triatominos son identificadas con base en la morfología externa y caracteres cromáticos (Lent & Wygodzinsky 1979). Algunas especies han sido descritas a partir de pocos especímenes, lo cual puede implicar que no se tenga en consideración la variación natural dentro del taxón; entonces, cuando más muestra está disponible, algunas veces puede ser difícil demarcar un punto de corte entre la variación geográfica poblacional y una especie diferente (Dujardin et al. 2009, Bargues et al. 2010).

En el presente capítulo, se propone explorar el fenotipo antenal y la morfología del huevo en el género *Belminus*, y con base en la información disponible en la literatura, comparar y discutir los hallazgos en relación con otros *Bolboderini* y demás taxones de las tribus Alberproseniini, Cavernicolini, Rhodniini y Triatomini. También se plantea evaluar el estatus taxonómico de tres especies del género *Belminus* (*B. corredori*, *B. ferroae* y *B. herreri*) con estos mismos marcadores morfológicos, pero además se incluye el análisis de las secuencias del citocromo b; al considerar el reciente cuestionamiento de la designación específica para las especies del género *Belminus* planteado por Schofield & Galvão (2009).

Así mismo, se espera contribuir en el conocimiento de los tipos de receptores en la antena y su distribución en los estadios inmaduros y en los adultos de las especies del género *Belminus*. Esta

información, podrá ser útil en los estudios de morfología cuantitativa, y en los estudios de electrofisiología que involucren los receptores antenales en este grupo de insectos. De igual manera, aportar en la descripción de la fase de huevo en estas especies de Triatominae.

1.1 El fenotipo antenal en los Triatominae

La antena es el mayor sistema no visual que poseen los insectos para monitorear el ambiente (Catalá & Schofield, 1994). El pionero en dirigir la atención hacia las poblaciones de receptores en la antena de los insectos e interpretar su significado biológico fue Chapman (1982), al señalar que su cuantificación podría ayudar a indicar fructíferas líneas de investigación y conducir a un mejor entendimiento del significado fisiológico de los diferentes tipos de receptores y de las diferencias numéricas cuando ocurren.

Dujardin et al. (2009) definen el fenotipo antenal como el número, los tipos y el patrón de distribución de los receptores (sensilia) más comunes en la antena. Es un carácter cuantitativo involucrado en una función básica en los insectos, y probablemente integre además de los patrones ancestrales, el moderno cambio adquirido a través de la conquista de nuevos hospedadores y hábitats (McIver 1987).

1.1.1 Morfología de la antena en Triatominae

En los Triatominae, la antena consiste de cuatro segmentos, los primeros dos (el escapo y el pedicelo) son gruesos y presentan un integumento rugoso; el tercero y cuarto (flagelo I y flagelo II), son delgados y filiformes con integumento delicado y estriado (Figura 23). El integumento de la antena está poblado de proyecciones cuticulares denominadas *sensilia* en plural, *sensilio* en singular. También presenta estructuras internas adheridas con funciones sensitivas. La cutícula varía en cuanto a los niveles de esclerotización; normalmente, la mayor parte de la antena es bien esclerotizada con la excepción de las membranas intersegmentales y algunas áreas de origen de las sensilia. (Schneider 1964, Chapman 1998). La longitud relativa de los segmentos de la antena y los diferentes tipos de sensilia han sido utilizados como caracteres taxonómicos para la subfamilia (Lent & Wygodzinsky 1979, Catalá & Schofield 1994).

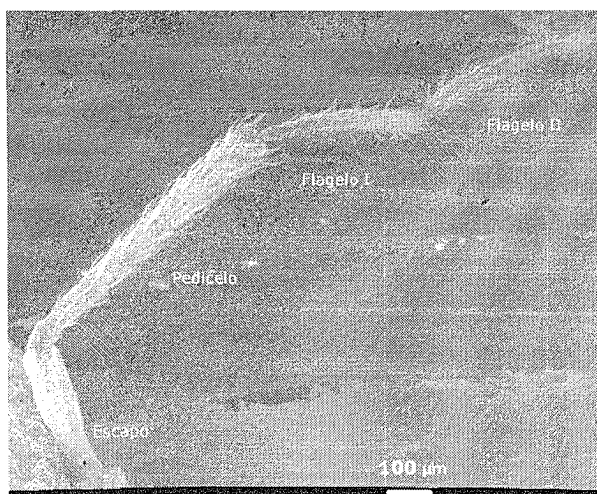


Figura 23. Micrografía de la antena de *B. ferroae* (Hemiptera: Triatominae) mostrando los diferentes segmentos.

1.1.2 Tipos de sensilia presentes en las antenas de los Triatominae con estructuras cuticulares externas

Los primeros estudios sobre la morfología externa y la ultraestructura de los sensilia de la antena en Triatominae, se realizaron a partir de los años treinta. El estudio pionero fue el realizado por Wigglessworth & Gillett (1934), quienes analizaron las sensilia de la antena de *R. prolixus* y describieron cuatro tipos básicos (Bristles I y II, Basicónicos, Tricoide de pared fina (TPF) y Tricoide de pared gruesa (TPG). Bernard (1974) describe en la antena de *T. infestans* cuatro tipos más (Bristles III, sensilio celocónico y el sensilio tricoide Bp). Lent & Wygodzinsky (1979) describen en diversas especies de Triatominae las tricobotrias, que se refieren al sensilio tricoide Bp de Bernard (1974). McIver & Siemicki (1984) proveen un completo estudio sobre la fina estructura de los mecanorreceptores en la antena de *R. prolixus*, reportando por primera vez el sensilio campaniforme y los propioceptores (pelos afilados). McIver & Siemicki (1985) describen la fina estructura del sensilio celocónico de la antena de *R. prolixus*.

Debido a que las sensilia son formaciones homólogas, es común que en la mayoría de los insectos se encuentre una serie de tipos y subtipos que pueden ser clasificados con dificultad (Schneider 1964,

Mclver 1982). Ello ha conducido a la elaboración de numerosas nomenclaturas, que en parte han complicado el estudio de los receptores sensoriales (Zacharuk 1980, Insausti et al. 1999). Catalá & Schofield (1994) además de describir con detalle doce tipos de sensilia antenales en diez especies del género *Rhodnius*, proveen las equivalencias entre las diferentes nomenclaturas. Estos autores, toman como marco de referencia la nomenclatura de Altner & Prillinger (1980), que organiza las sensilia en: no porosas y porosas, y el tipo de base sobre la cual se inserta el sensilio (flexible e inflexible). De esta manera, las siguientes categorías: sensilia no porosas en bases flexibles, sensilia no porosas en bases inflexibles, sensilia porosas en base inflexible y una cuarta categoría para un sensilio señalado por Insausti et al. (1999), que incluiría la categoría porosa con base flexible.

De esta manera al reunir todos los estudios, Insausti et al. (1999) señalan la ocurrencia de 13 tipos de sensilia con estructuras cuticulares externas en Triatominae, compuestas por seis mecanoreceptores, un receptor bimodal (químio-mecanoreceptor) que exhibe un poro terminal, quimiorreceptores entre los cuales se incluye dos tricoides uno de pared fina y otro de pared gruesa, dos tipos de basicónicos y un tipo de celocónica. También señalan un segundo sensilio celocónico que funciona como termo-higroreceptor. A continuación en la tabla 16 publicada por Catalá (1997), se da un resumen de los tipos de sensilia registrados en Triatominae y se señalan algunas características de su morfología interna, externa y su función.

En los triatominos los mecanismos de búsqueda y orientación hacia el hospedador, no están completamente entendidos, pero se considera que incluye la detección de una serie de señales visuales, mecánicas, térmicas, hídricas y químicas emitidas por el hospedador (Otálora-Luna et al. 2004, Barrozo & Lazzari 2006, Guerenstein & Lazzari 2008).

En Triatominae, tres tipos de señales han sido directamente implicadas en la búsqueda del hospedador. Estas son el calor, los olores y las mecánicas, correspondientes a las corrientes de aire (pulsos) generados por la respiración del hospedador. Entre los olores que se han demostrado que evocan una respuesta en los Triatominae tenemos, el CO₂, los aldehídos como el heptanal, el octanal y el nonanal y los ácidos grasos de cadena corta presentes en olores de las aves, los humanos y otros vertebrados. El amonio también es un buen atrayente que está presente en el sudor y la orina de los vertebrados (Guerenstein & Lazzari 2008). En la naturaleza, los triatominos generalmente se enfrentan a mezclas de olores, por lo tanto responden más eficientemente a ellas que a un sólo tipo

de sustancia. Las proporciones de los distintos componentes en el olor le indicarán al insecto con un buen grado de certeza, si la fuente es o no el hospedador esperado (Guerenstein & Lazzari 2008).

De las sensilia reportadas en Triatominae se conoce que los tricoides de pared fina (TPF) responden directamente a la respiración, a los ácidos grasos y al amonio. La basicónica (Ba) a aldehídos, terpenos y furanos (Guerenstein & Lazzari 2008), también a cambios en la temperatura y la humedad (Bernard 1974). Sin embargo la función del tricoide de pared gruesa (TPG), aún no es clara, no existe evidencia de que responda a estímulo alguno; pero teniendo en cuenta, su morfología, se supone que su función debe ser la quimiorrecepción por contacto, primariamente detectando moléculas en fase líquida (Gracco & Catalá, 2000).

1.1.3 Importancia del estudio del fenotipo antenal en los Triatominae (Hemiptera: Reduviidae)

El estudio del fenotipo antenal ha mostrado ser una herramienta taxonómica útil en la identificación de las especies de los géneros *Rhodnius*, *Triatoma* y *Mepraia* (Catalá & Schofield 1994, Gracco & Catalá 2000, Moreno et al. 2006, Carbajal de la Fuente et al. 2008). También se ha indicado que presenta una buena correlación con el número y el tipo de hábitats explorados (Catalá 1997, Carbajal de la fuente & Catalá 2002), la variación geográfica y los ecotopos (Catalá et al. 2005, Esteban et al. 2005, Arroyo et al. 2007, Hernández et al. 2008), el sexo (Arroyo et al. 2007, Catalá et al. 2005) y la condición alar (Moreno et al. 2006) en los triatominos.

Tabla 16. Tipos de sensilia registradas en las antenas en Triatominae. Fuente: Catalá 1997, Catalá & Schofield 1994, Insausti et al. 1999.

Categoría	Sensilio	Morfología	Función	Micrografía
No porosos en base flexible	Tricobotria	Pelos largos y delgados insertados en grandes depresiones en forma de copa (*)	Mecanorecepción (inervación 1 neurona bipolar)	
	Bristle I	Cerdas gruesas en una base con doble anillo. Pared gruesa con surco. Tuberculos en el extremo (F)	Mecanorecepción (1 neurona bipolar)	
	Bristle II	Cerdas delgadas y largas (en flagelo). Base menos desarrollada que los bristles I (B)	Mecanorecepción (1 neurona bipolar)	
	Bristle III	Cerdas de tallo corto con base desarrollada (A)	Mecanorecepción ?	
	Pelo afilado (tapered hair)	Pelos con tallo cónico y afilados, ubicados entre los segmentos.	Propiocepción (monitoreo de los movimientos antenales)	
No porosos con base inflexible	Campaniforme	Domos ovales rodeados por un anillo de cutícula (E)	Propiocepción (1 neurona bipolar). Monitoreo de estrés cuticular.	
	Celocónica	Pequeños pelos en una depresión profunda con base no radiada (*)	Termo-higroreceptores (3 neuronas con dendritas no ramificadas)	
	Celocónica	Pequeños pelos en una depresión profunda con base radiada ©	Quimiorrecepción	
Porosos con base inflexible	Basicónica	Pequeños pelos con una superficie multiporosa y con surcos longitudinales pueden ser de pared fina y de pared delgada ©	Termo-higro-quimio-receptores (5-6 neuronas)	
	Tricoide de Pared Fina	Pelos largos con una superficie multiporosa y extremo redondeado (A)	Quimiorrecepción (15 neuronas)	
	Tricoide de Pared Gruesa	Pelos más delgados que los anteriores y terminando en extremo aguzado. Poros no visibles pero es permeable a colorantes (K)	Quimio-receptores (5 - 6 neuronas)	
Porosos con base flexible	Bristle VII	Presenta la apariencia de un bristle I pero con un poro en la punta	Mecano y quimiorreceptor	

1.2 La morfología del huevo y la importancia de su estudio en *Triatominae*

Beament (1947) y Tuft (1950) son los primeros en estudiar la estructura interna del corion en el *Triatominae R. prolixus*, y la relación entre ésta y los procesos de permeabilidad al agua y a otras sustancias, además de la fertilización y la respiración del embrión.

Estructura del corion

El corion es secretado por el epitelio folicular del ovario durante la coriogénesis, y comprende dos grandes regiones: el exocorio y el endocorio. El primero en ser secretado es el endocorio y se encuentra formado por cinco capas ricas en polifenoles que le confieren resistencia al ataque químico e impermeabilidad al agua. Posteriormente, es depositado el exocorio rígido y por último el exocorio blando, que es una camada espesa responsable por la estructura exocorial (Beament 1947).

Los huevos de los *Triatominae* presentan una amplia variabilidad en el tamaño y la forma, con especies pequeñas que tienen huevos que miden 0,96 mm en el género *Alberprosenia*, a 4 mm en el género *Dipetalogaster*. Huevos de forma cilíndrica en las especies del género *Psammolestes*, a casi esférica en *P. rufotuberculatus* (Lent & Wygodzinsky 1979).

En algunas especies, el huevo puede tener un cuello y un collar que se destacan del resto del cuerpo y en otras, estos dos aspectos no son evidentes. El diseño de huevo con collar es más frecuente en aquellas especies que adhieren los huevos al substrato y que son ornitófilas (Barata 1981). El opérculo puede presentar diseños exocoriales complejos como en *T. delpontei*, o diseños casi lisos como en el género *Alberprosenia*. De igual manera existe una gran variabilidad en los diseños exocoriales del huevo, algunos con líneas claras que demarcan polígonos y otros con contornos difusos (Barata 1998). Las estructuras macroscópicas generales en los huevos de los *Triatominae* son: el opérculo (Op), el borde opercular (Bo), el borde corial (Bc), el cuello (Cu) y la hendidura lateral (Hl) (Figura 2). Las estructuras microscópicas más comunes ubicadas en la región del borde corial son: los aerópilos (Ae), los micrópilos (M), la gotera espermática (Ge). Los aerópilos tienen como función el intercambio gaseoso, y los micrópilos estarían implicados en el proceso de fertilización (Beament 1947).

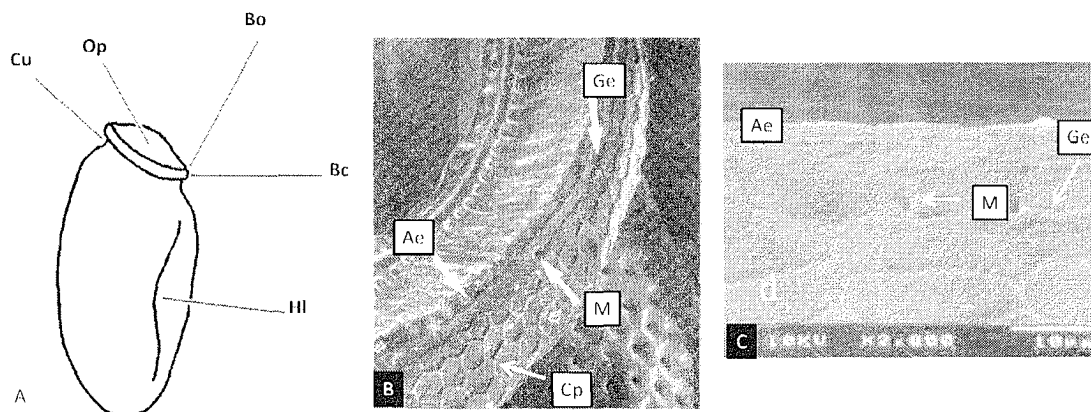


Figura 24. Representación esquemática de un huevo en los Triatominae. **A.** *R. prolixus*, mostrando las estructuras más comunes a nivel macroscópico. Opérculo (Op), borde opercular (Bo), Borde corial (Bc), Cuello (Cu) y Hendidura lateral (HI). Micrografías mostrando en la región del borde corial los Aerópilos (Ae), Micrópilos (M), (Cp) Celda poligonal y la Gotera espermática (Ge). **B.** *R. prolixus*; **C.** *T. sherlocki*. Imágenes tomadas de Barata (1981) y Obara et al. (2007^a).

www.bdigital.ula.ve

Por otra parte, es bien conocida la importancia del estudio de la fase de huevo en los diversos grupos de insectos, porque la ultraestructura del exocorion puede revelar además de propiedades morfológicas, fisiológicas y taxonómicas (Hinton 1981, Suludere et al. 1999, Candan 1999). En Heteroptera, el estudio de esta fase ha permitido registrar caracteres de valor taxonómico y de importancia para la inferencia de relaciones filogenéticas (Barata 1981, Obara et al. 2007^b, González et al. 2009, Matesco et al. 2009).

Matesto et al. (2009) muestran que el estudio del esculpido del corion y el número de estructuras aeromicropilares son caracteres diagnósticos a nivel de género, y que algunas especies pueden ser identificadas en esta fase. Asimismo, señalan que el estudio detallado de estas estructuras, a través de la técnica de microscopía electrónica de barrido, permitió no sólo la revisión de terminología sino el reconocimiento de patrones dentro de la familia Pentatomidae.

Entre los estudios pioneros que han abordado la morfología externa de los huevos en la subfamilia Triatominae, se encuentran los realizados por Pinto (1924) y Galliard (1935). El primero describe la

morfología externa del huevo de *T. brasiliensis*, y el segundo demuestra que la arquitectura del exocorio en Triatominae ayuda en la distinción entre especies. A partir de estos trabajos, numerosos documentos se han abocado a describir los aspectos macroscópicos y microscópicos de los huevos en numerosas especies de la subfamilia (Abalos & Wygodzinsky 1951, Barth & Muth 1958, Forattinni & Barata 1974, Lent & Wygodzinsky 1979).

Sin embargo, son los trabajos de Barata (1981), Costa et al. (1991) y Jurberg et al. (1993), que definen algunas características de valor taxonómico en la fase de huevo para los géneros *Rhodnius*, *Cavernicola* y *Dipetalogaster*.

Barata (1998) amplía este análisis al describir y definir caracteres de valor taxonómico en los géneros *Alberprosenia*, *Cavernicola*, *Dipetalogaster*, *Eratyrus*, *Microtriatoma*, *Panstrongylus*, *Psammolestes*, *Rhodnius* y *Triatoma*.

Más recientemente, diversos estudios han sido motivados por la necesidad de una mayor precisión en la identificación taxonómica de potenciales vectores de *T. cruzi*, cuando sólo se cuenta con el hallazgo de huevos en las áreas infestadas. De esta manera se busca fortalecer la clave taxonómica basada en esta fase de desarrollo (Rosa et al. 2000, Obara et al. 2007^a, Páez-Colasante & Aldana 2008, Santos et al. 2009, Aldana et al. 2013).

El esculpido coriónico del huevo ha mostrado ser útil en estudios de poblaciones y en la detección de especies crípticas. Así, Costa et al. (1997) encuentran diferencias en cuanto al patrón de ornamentación del exocorio al comparar cuatro diferentes poblaciones de *T. brasiliensis*; una de estas poblaciones ha sido recientemente elevada a especie bajo el nombre de *T. juazeirensis* (Costa & Félix 2007). El tamaño del opérculo también ha sido propuesto por Rosa et al. (2003) como marcador de domiciliación en *P. megistus*, al encontrar que colonias de esta especie mostraban una reducción del diámetro de dicha estructura al ser comparados con huevos colectados en condiciones silvestres.

1.3 Utilidad del citocromo b en el estudio de la Sistemática en Triatominae

El análisis de las secuencias de ADN es la técnica molecular más eficiente y versátil usada hoy en día en sistemática; debido a que presenta una alta resolución al proveer información sobre cada nucleótido de un fragmento genómico dado, además que permite el uso de diferentes genomas (mitocondrial y nuclear) y de genes con un amplio rango de conservación (Abad-Franch & Monteiro 2005). En triatominos se considera una de las herramientas más importantes para establecer su clasificación natural (Mas-Coma & Bargues 2009).

Se conoce que el genoma mitocondrial evoluciona diez veces más rápido que el genoma nuclear, y hace de éste un buen marcador, particularmente para especies muy relacionadas y para estudios de filogeografía y de genética de poblaciones. Es por esto que algunos autores sugieren su utilidad en el análisis de los niveles bajos como géneros, especies y poblaciones (Monteiro et al. 2004, Piccinali et al. 2009, Mas-coma & Bargues 2009).

En los Triatominae, el ADN mitocondrial ha sido útil también en el estudio de la taxonomía (Garcia & Powell 1998, Lyman et al. 1999) y la filogenia (Patterson & Gaunt 2010). Fue a través del uso de marcadores mitocondriales que se logró resolver la controversia del estatus taxonómico entre *R. prolixus* y *R. robustus*, y demostrar que son especies diferentes (Lyman et al. 1991, Monteiro et al. 2000). También ha aportado en el análisis del estatus taxonómico de *T. infestans* y *T. melanosoma* (Monteiro et al. 1999), entre poblaciones de *T. brasiliensis* (Monteiro et al. 2004) y en la identificación correcta de ninfas capturadas en palmas (Justi et al. 2010).

2. Objetivo general

Ampliación del análisis morfológico en *B. corredori*, *B. ferroae* y *B. herreri* y la evaluación de sus estatus taxonómico.

3. Objetivos específicos

- 3.1 Describir el fenotipo antenal y la fase de huevo en *B. corredori*, *B. herreri* y *B. ferroae* por microscopía óptica y electrónica de barrido.

- 3.2 Comparar el fenotipo antenal de *Belminus* con otros géneros de Triatominae con base en la información disponible en la literatura.
- 3.3 Comparar la morfología de los huevos de *Belminus* con otros géneros de Triatominae con base en la información disponible en la literatura.
- 3.4 Evaluar el estatus taxonómico de *B. corredori*, *B. herreri* y *B. ferroae* mediante el análisis de fenotipo antenal.
- 3.5 Evaluar el estatus taxonómico de *B. corredori*, *B. herreri* y *B. ferroae* mediante el análisis del patrón poligonal del opérculo del huevo.
- 3.6 Evaluar el estatus taxonómico de *B. corredori*, *B. herreri* y *B. ferroae* mediante el análisis de secuencias del citocromo b.

4. Materiales y métodos

El material biológico utilizado en el análisis morfológico de la antena, el estudio de la morfología del huevo y las secuencias de citocromo b, procede de diferentes regiones de Colombia. *B. ferroae* de las localidades de Santa Catalina y San Alberto del municipio de Toledo en Norte de Santander (Sandoval et al 2010). *B. herreri* del peridomicilio de una vivienda del municipio El Carmen, Santander (Sandoval et al. 2000), y de especímenes capturados en domicilios del municipio de San Martín, Cesar (Sandoval et al. 2004). *Belminus corredori* de una vivienda de San Gil, Santander (Galvão & Angulo 2006).

4.1 Material biológico utilizado en el análisis morfológico de la antena

En el estudio se incluyeron un total de 165 especímenes pertenecientes a las especies *B. herreri*, *B. corredori* y *B. ferroae* (Tabla 17). Se utilizaron especímenes capturados directamente de los domicilios, pero cuando fue necesario, el material se complementó con ninfas de la primera o segunda generación, criadas en el laboratorio con hospedadores invertebrados. Previa verificación

que las ninfas capturadas en campo y las ninfas obtenidas en laboratorio no diferían significativamente en las variables bajo estudio.

Tabla 17. Región geográfica de origen, hábitat y número de especímenes del género *Belminus* utilizados en el análisis del fenotipo antenal.

Especies	Origen (municipio y departamento)	Hábitat	Hospedador	# especímenes
<i>B. herreri</i>	San Martín, Cesar	D		6F, 7M
<i>B. herreri</i>	F:1 y F:2 . San Martin, Cesar	L	<i>R.prolixus</i>	6n1, 7n2, 8n3,6n4,7n5
<i>B.corredori</i>	F:1 San Gil, Santander	L	<i>R. prolixus</i>	7F, 9M, 6n1, 6n2, 7n3, 6n4, 6n5
<i>B. ferroae</i>	Toledo, Norte de Santander	D		15F, 10 M, 7n1, 5n2, 3n3, 6n4, 10n5
<i>B. ferroae</i>	F:1.Toledo, Norte de Santander	L	<i>Blaberus sp.</i>	3n1, 5n2, 7n3

D = domicilio, L = laboratorio, F:1 = primera generación, F:2 segunda generación, F = hembra, M = macho, N1, ninfa de primer estadio; N2, ninfa de segundo estadio II; N3, ninfa de tercer estadio; N4,ninfa de cuarto estadio y N5, ninfa de quinto estadio.

4.2 Material biológico utilizado en el análisis morfológico de los huevos

Se utilizaron huevos de *Belminus*: *B. corredori*, *B. ferroae* y *B. herreri* de colonias de laboratorio, que se criaron exclusivamente con cucarachas del género *Blaberus*.

4.3 Material biológico utilizado para la obtención de las secuencias de ADN del citocromo b

Los especímenes de *B. ferroae* utilizados provienen de capturas realizadas dentro de los domicilios de las localidades de Santa Catalina y San Alberto del municipio de Toledo en Norte de Santander. Para la especie *B. herreri* de dos colonias de diferente origen. Una de especímenes capturados en el peridomicilio de una vivienda del municipio El Carmen, Santander y la otra de especímenes capturados en domicilios del municipio de San Martin, Cesar, alimentadas con *R. prolixus*. Los especímenes de *B. corredori* provienen de una colonia alimentada con *R. prolixus*.

4.4 Procedimientos experimentales

4.4.1 Análisis de receptores antenales por microscopía óptica y electrónica de barrido

4.4.1.1 Identificación de los receptores de la antena por microscopía electrónica de barrido (MEB)

Se usaron como referencia las publicaciones de McIver & Siemicki (1984, 1985) y Catalá & Schofield (1994) para la identificación de los receptores de cada segmento de la antena. Para esta técnica, se utilizaron adultos completos de *B. ferroae*, *B. herreri* y *B. corredori* que se fijaron a un soporte metálico en posición dorsal y ventral con cinta doble faz y metalizados por dos minutos con un aparato Edwards a 10 mA. Las micrografías de las antenas fueron tomadas usando un microscopio (JEOL modelo, JSTM – T330A y JSM 5300) operado a 10, 15 o 20 Kv. Neopan SS 120 Fuji film fue usado para desarrollar las micrografías. La MEB fue realizada en el Departamento de Físico-Química del Instituto de Química de la UNESP, Araraquara, San Paulo, Brasil

4.4.1.2 Preparación de la antena e identificación y conteo de los receptores de la antena por microscopía óptica (MO)

Una antena izquierda de cada espécimen (ninfa o adulto) fue removida a nivel del escapo, se aclaró con KOH al 5% durante 5 minutos, posteriormente se neutralizó con ácido acético al 5%, se lavó con buffer fosfato salino (PBS) pH 7,2 y finalmente se almacenó en una solución 3:1 de glicerina-PBS. Para los conteos en microscopio óptico, las antenas fueron montadas en glicerina bajo un cubreobjeto y la superficie ventral fue examinada en aumento 40X. Los conteos fueron realizados a través de una cámara lúcida, y se incluyeron los tres segmentos de la antena, el pedicelo (P), el Flagelo I (F1) y el Flagelo II (F2). Los siguientes receptores fueron reconocidos: Bristles (BR) Tricoide pared fina (TPF), Tricoide de pared gruesa (TPG) y basicónicos (BA), de acuerdo con Catalá & Schofield (1994) y Gracco & Catalá (2000). Los segmentos fueron medidos en el microscopio con el objetivo 10X, y se utilizó un micrómetro ocular de 100 graduaciones que fue calibrado con un micrómetro de platina marca Leica de 0.01mm. Todos los conteos y las mediciones fueron realizados en un microscopio Leica modelo DMLB100T.

4.4.2 Preparación de los huevos para el análisis morfológico

Hembras jóvenes fecundadas y alimentadas se seleccionaron y se mantuvieron en diferentes cápsulas de vidrio. Diariamente, se recogieron las posturas de una semana y se almacenaron en un recipiente limpio hasta completar un (n) de 20 individuos por grupo. Los huevos eclosionados y sus opérculos se lavaron cinco veces con agua 18 Ω , posteriormente se pasaron por alcohol absoluto y se lavaron con abundante agua, se secaron a 28°C por dos horas y se almacenaron en cápsulas de vidrio a temperatura ambiente. Un grupo de huevos (n = 10) no eclosionados de 24 a 48 horas de puestos, también se utilizaron en el estudio morfológico. Los huevos embrionados se lavaron con abundante agua y se secaron a temperatura ambiente.

4.4.2.1 Mediciones de los huevos

La longitud y el ancho de los huevos embrionados, además el diámetro de los opérculos fueron medidos en aumento 50X, todas las observaciones y mediciones fueron realizadas en un microscopio-estereoscópico marca Wild Heerbrugg. Hembras jóvenes fecundadas y alimentadas se seleccionaron y se mantuvieron en diferentes cápsulas de vidrio. Diariamente, se recogieron las posturas de una semana, se almacenaron en un recipiente limpio hasta completar un (n) de 20 individuos por grupo. Los huevos eclosionados y sus opérculos se lavaron cinco veces con agua 18 Ω , posteriormente se pasaron por alcohol absoluto y se lavaron con abundante agua, se secaron a 28°C por dos horas y se almacenaron en cápsulas de vidrio a temperatura ambiente. Un grupo de huevos (n = 10) no eclosionados de 24 a 48 horas de puestos, también se utilizaron en el estudio morfológico. Los huevos embrionados se lavaron con abundante agua y se secaron a temperatura ambiente.

4.4.2.2 Morfología de los huevos por microscopía electrónica de barrido (MEB)

Por esta técnica se analizaron los huevos embrionados y eclosionados con sus respectivos opérculos libres. Estos fueron inmovilizados con cinta doble faz sobre un soporte metálico, posteriormente metalizados con oro durante 100 segundos en un cobertor iónico SPI-MODULE™ operado a 10 mA. Las micrografías se tomaron con un microscopio electrónico Hitachi S-2500 operado a 20 Kv. Se exploró el diseño poligonal en el exocorio del opérculo y en la región cefálica, media y caudal del cuerpo del huevo, a diferentes aumentos, siguiendo la metodología de González et al. (2009).

Dado que en la región media y caudal del huevo, el arreglo poligonal no fue evidente por MEB, aún cuando perceptible por MO. Se trataron los huevos de *B. ferroae* y *B. corredori* por 1, 3, 4 y 24 horas a 37°C con un buffer de lisis, que contenía Tris-HCL 10mM pH 8,0, EDTA 500mM pH 8,0, N-lauril-sarcosina 1% y 1mg/ml de Proteinasa K. Como no fue posible eliminar con el tratamiento la capa y mejorar la observación del arreglo poligonal, el análisis se restringió al diseño que presentaba el opérculo. Para esto, se tomaron diez micrografías del opérculo por especie en 2000X correspondiente a una superficie de 20.000 μm^2 ubicada en el borde externo de esta estructura. La descripción morfológica general de los huevos siguió la nomenclatura propuesta por Barata (1998).

4.4.3 Procedimiento para la obtención de secuencias de ADN del citocromo b

4.4.3.1 Extracción ADN

Todo el material biológico (insectos) fue preservado en alcohol absoluto. Antes de iniciar el procedimiento cada espécimen se secó con una toalla de papel, y dos de sus patas se removieron con pinzas y se introdujeron en un vial Eppendorf de 1 ml. Posteriormente, fueron crio fracturadas con nitrógeno líquido y con ayuda de un macerador manual. Para la extracción del ADN se utilizó el protocolo para tejidos del kit Genomic ADN Extraction de Real Genomics®.

4.4.3.2 Amplificación ADN por reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR se realizó en un volumen final de reacción de 50 μl que contenía (1,25 unidades) de taq polimerasa, 5 μl dNTPS (100 mM Tris HCl, pH 8,3, 500 mM KCl), 6 μl MgCl_2 (50 mM), 2 μl de cada primer (10 pM) y 3 μl de ADN. La pareja de primers utilizada diseñada por Monteiro et al. (2000) fue Cob 32F GGA CGW GGW ATT TAT TAT GGA TC y Cob-82R ATT ACT CCT CCT AGY TTA TTA GGA ATT.

El protocolo seguido para la reacción fue el siguiente: Desnaturalización a 96°C por 5 minutos; 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, anillamiento a 48°C por 30 segundos, y extensión a 72°C por 45 segundos, seguido por 72°C de extensión por 10 minutos y a 4°C indefinidamente.

Para la visualización de los productos amplificados se utilizaron geles del agarosa al 1% (Ultrapure Invitrogen) en Buffer TBE 0,5X. El sembrado de las muestras se realizó con el buffer de carga 10x

Blue Juice Invitrogen, diluido 1:1 en agua ultra pura y 5 µl de ADN amplificado. Para la coloración de los geles se utilizó una solución de GelRed ® que contenía (20 ml NaCl 1M, 90 ml de agua destilada y 30 µl de GelRed®). El tiempo de coloración osciló entre 10 y 15 minutos (Fig 25).

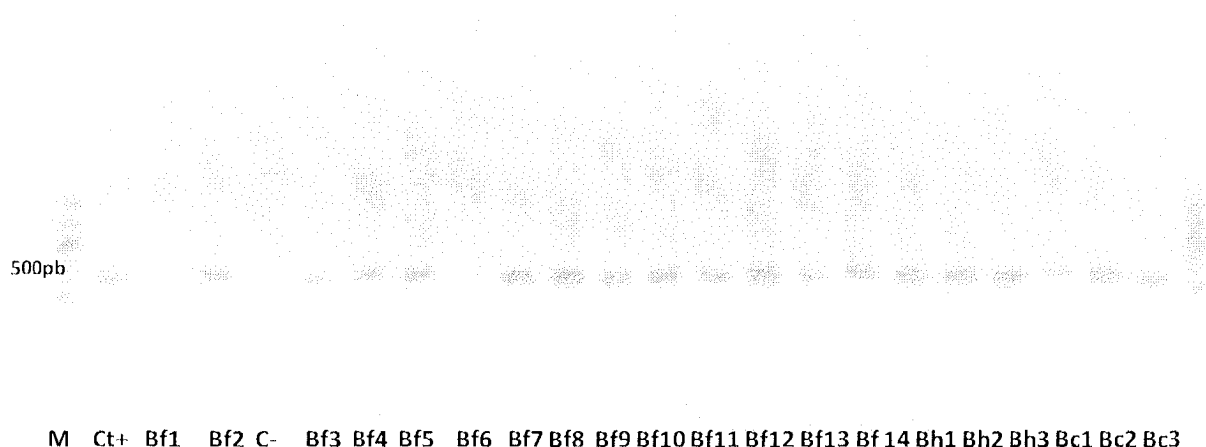


Figura 25. Fotografía de gel de agarosa mostrando la amplificación de un fragmento de 537 pb del citocromo b. M = marcador molecular, Ct+ = control positivo *R. prolixus*, C- = control negativo, Bf3-Bf14 = muestras de *B. ferroae*, Bh1-Bh3 = muestras de *B. herreri*, Bc1-Bc3 muestras de *B. corredori*.

4.4.3.3 Purificación del ADN

Para la purificación de los productos amplificados, se siguió el protocolo del kit Hiyield™ Gel/PCR ADN Extraction de Real Genomics ®. El sobrenadante se almacenó a -20°C hasta su secuenciamiento.

4.4.3.4 Secuenciamiento de ADN

Los productos amplificados y purificados se examinaron por un secuenciador ABI Prism Dye Terminator. Los oligonucleótidos utilizados fueron los mismos que se usaron para la reacción de amplificación.

4.5 Análisis estadístico

4.5.1 Análisis morfológico de la antena

Se calculó el promedio y la desviación estándar del número de sensilia por tipo, en cada segmento. Con estas variables se realizó una comparación entre las de ninfas y los adultos de las tres especies. Se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis y un test de múltiples comparaciones. El análisis se ejecutó en el programa Statistica 7.

Para analizar la similaridad del fenotipo antenal, a través de los diferentes estadios del ciclo de vida para cada especie, se realizó un análisis por Componentes Principales (CP), donde se utilizaron las variables del pedicelo (P) y el flagelo 2 (F2) de la antena (PBR, PTPF, F2BR, F2TPF, F2TPG, F2BA). El análisis de CP fue ejecutado en el software PAST.

Un análisis discriminante (AD) fue usado para verificar la utilidad del fenotipo antenal en la separación de las tres especies bajo estudio. En las hembras las variables que se seleccionaron para el AD fueron (PTPF, FITPF, FITPG y F2TPG) y en los machos (PTPF, FITPF, FITPG, F2TPF). Para la selección de las variables se tuvo en cuenta, a aquellas que mostraron diferencias estadísticamente significativas en el análisis univariado. El software utilizado para el AD fue el PADwin versión 65 (<http://www.mpl.ird.fr/morphometrics>) es un software que ejecuta análisis discriminantes y que estima la significancia estadística (valor de Wilks y las distancias de Mahalanobis) en una vía no paramétrica, por permutación. El número de permutaciones usadas fueron 1000 y el estadístico de significancia después de la corrección de Bonferroni fue $P < 0,0167$

4.5.2 Análisis del arreglo poligonal del opérculo del huevo

Se calculó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de cada tipo de polígono presente en los opérculos de las tres especies bajo estudio. Se exploró la normalidad y la homocedasticidad de estas variables usando las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente. Variables con distribución normal y varianzas homogéneas se analizaron usando ANOVA de una vía y el test de Tukey de múltiples comparaciones. Se utilizó el software SPSS versión 14 y el PAST versión 1,97.

Se utilizó un Análisis Discriminante (AD) para verificar la utilidad del arreglo poligonal del opérculo en la separación de las tres especies. Las variables incluidas en el análisis fueron: número de celdas pentagonales, hexagonales y heptagonales. El software utilizado para el AD fue el mismo que se utilizó en el análisis estadístico del fenotipo antenal.

4.5.3 Análisis de las secuencias de citocromo b

Para cada espécimen se estableció una secuencia consenso a partir de los cromatogramas obtenidos por las secuencias anversa y reversa. Cuando fue necesaria alguna edición ésta se ejecutó con el programa SeqMan II (DNASTAR Inc., Madison, WI). Las secuencias obtenidas para las tres especies se alinearon con el algoritmo CLUSTALW2 en línea (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/>) y las filogenias fueron reconstruidas a través del algoritmo de distancias Neighbour-joining, ejecutado bajo el modelo Kimura 2- parámetros (KP-2) y con máxima verosimilitud bajo el modelo (Tamura 3 parámetros) usando el programa MEGA 5.0 (Tamura et al. 2011). En ambos métodos se ejecutaron 1000 bootstrap para estimar los valores de soporte de las ramas (Felsenstein 1985). La divergencia genética se calculó bajo el modelo de Kimura 2 parámetros y 1000 bootstrap. Este análisis siguió la metodología utilizada para el estudio del estatus taxonómico de algunas especies de Triatominae de los géneros *Panstrongylus*, *Rhodnius*, *Mepraia* y *Triatoma* (Monteiro et al. 2000, Monteiro et al. 2004, Fitzpatrick et al. 2008, Calleros et al. 2010).

5 Resultados

5.1 Antenas

5.1.1 Características generales de la antena

En promedio, la longitud total de la antena en milímetros fue de 2,23 (♀) y 2,21 (♂) en la especie *B. herreri*, en *B. corredori* 2,29 (♀) y 2,3 (♂), y por último en *B. ferroae* 2,69 (♀) y 2,62 (♂). En los estadios ninfales, la longitud total promedio de la antena en milímetros para *B. herreri*, *B. corredori* y *B. ferroae* fue: (0,82-0,82-0,9) en ninfas 1; (0,92-0,97-1,12) en ninfas 2; (1,17-1,25-1,36) en ninfas 3; (1,6-1,5-1,8) en ninfas 4 y (1,90-2,0-2,47) en ninfas 5, respectivamente. En general, las hembras presentaron antenas más largas que los machos; y a medida que avanzó el estadio ninfal se registró un aumento gradual en la longitud de la antena.

5.1.2 Tipos morfológicos de sensilia identificados por MEB

En el primer segmento de la antena, esto es en el escapo, tanto en las ninfas, como en los adultos de ambos sexos se observaron dos mecanorreceptores: los Bristles I y la sensilia campaniforme (Figura 26 A).

En el segundo segmento (pedicelo) de las ninfas, se observaron mecanorreceptores del tipo bristles (I) y una tricobotria distal. En este mismo segmento, en las hembras y los machos de *B. ferroae*, *B. herreri* y *B. corredori* se observaron cuatro tipos de sensilia, que incluyeron tres mecanorreceptores: los Bristles I, los Bristles III, y las tricobotrias (4 por antena) y un tipo de quimiorreceptor: el tricoide de pared fina (TPF) (Figura 26 A y B). En este segmento, la presencia de una estructura sensorial denominada órgano caverna, común en algunas subfamilias de Reduviidae en las que se incluye a Triatominae, también se observó, en las tres especies de *Belminus*. Consideramos importante profundizar en la descripción de este órgano en las especies del género, la cual podrá encontrarse en la publicación que se anexa, y que lleva como título: “Description of the cave organ in three species of the genus *Belminus* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) by optical and scanning electron microscop. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 106: 769-772, 2011”.

En el tercer segmento de la antena (Flagelo I), de los estadios ninfales, sólo se observaron Bristles del tipo I, pero los sensilia tricoides (TPF, TPG) y los basicónicos no se encuentran presentes en estas etapas pre-reproductivas (Figura 27 A y B). En contraste, en este segmento de los adultos los TPF y TPG abundan (Figura 26 D). En el cuarto segmento (Flagelo II) en las ninfas (Figura 27 C y D) y en los adultos de ambos sexos (Figura 26 E y F) se observaron los siguientes receptores: Bristles tipo I, ambos tricoides (TPF y TPG) y los basicónicos, además del sensilio campaniforme. En todas las uniones intersegmentales de la antenas de las ninfas y los adultos se observan propioceptores (T) (Figura 26 A).

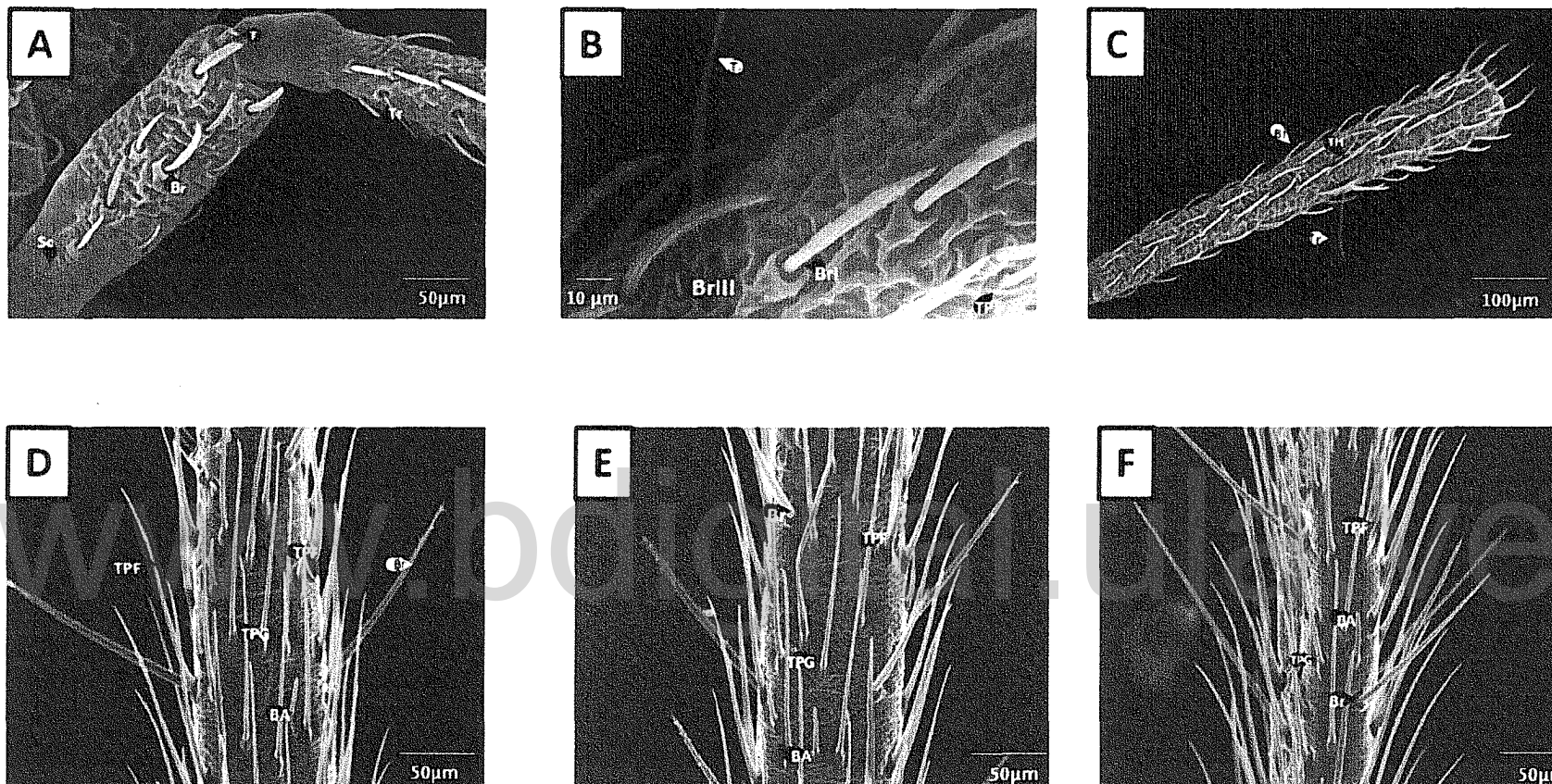


Figura 26. Fenotipo Antenal de *Belminus* spp. **A.** Escapo y región basal del pedicelo de un macho de *B. herreri*. **B.** Superficie lateral del pedicelo de *B. ferroae* (hembra). **C.** Vista ventral del pedicelo de *B. herreri* (hembra). **D.** Flagelo I de *B. herreri* (hembra) Vista Ventral. **E.** Flagelo II de *B. herreri* ventral (hembra). Flagelo II de *B. corredori* (macho) en vista ventral. Bristles I y III (BrI y BrIII), Sensilio campaniforme (Sc), Pelo afilado (T), Tricobotria (Tr). Tricoide pared fina (TPF), Tricoide de pared gruesa (TPG) y Basicónica (BA).

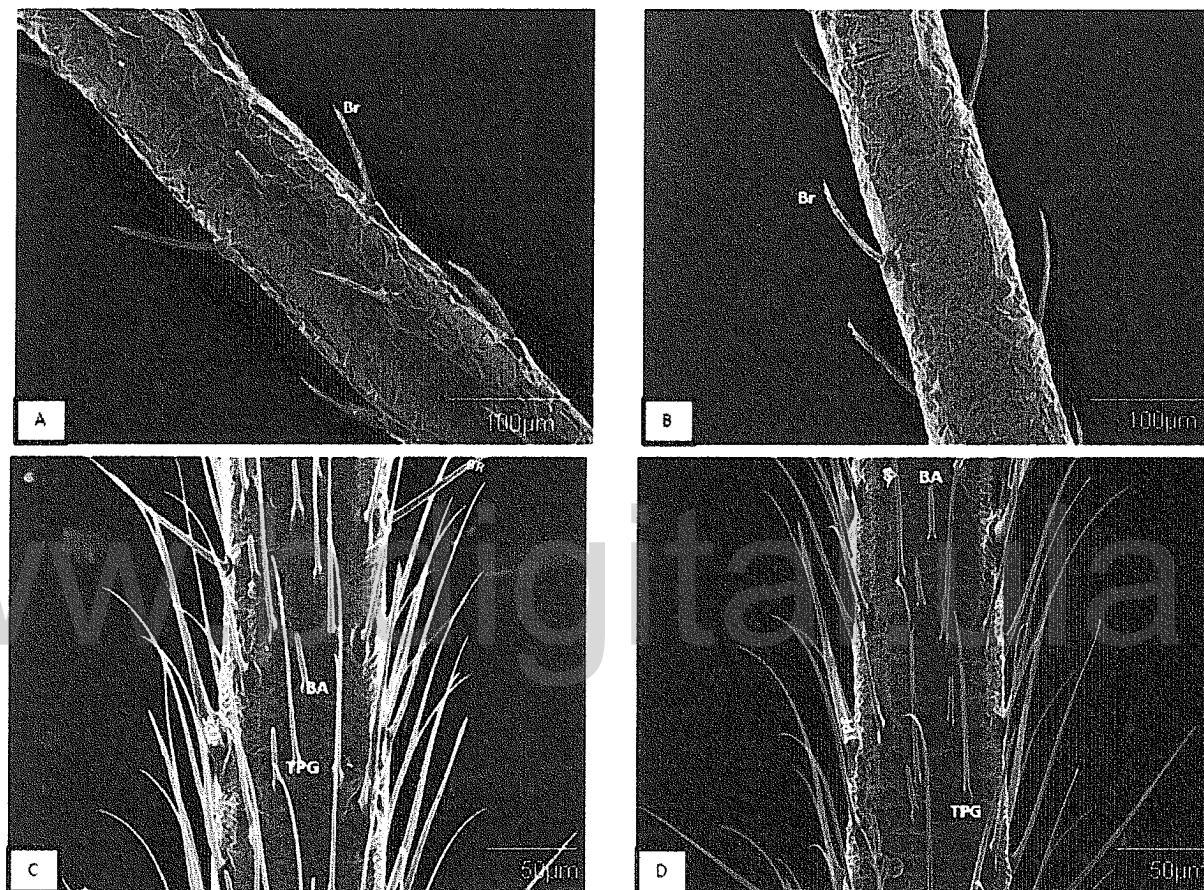


Figura 27. Fenotipo Antenal de ninfas de V estadio. Flagelo I. **A.** *B. herreri*, **B.** *B. corredori*. Flagelo II. **C.** *B. herreri*, **D.** *B. corredori*. Br (Bristle I), TPF (Tricoide de pared fina), TPG (Tricoide de pared gruesa) y BA (Basicónica).

5.1.3 Fenotipo antenal

En la tabla 18 se muestra el número promedio de sensilia por segmento en cada estadio ninfal de las tres especies. En general, los PBR son los sensilia que aumentan gradual y notoriamente en número, a medida que avanza el desarrollo ninfal. Los TPG fueron los sensilia más abundantes en la antena.

La tabla 19 muestra el número promedio de sensilia en cada segmento antenal de acuerdo al sexo, en adultos de las tres especies estudiadas. En los análisis univariados, los PTPF (Tricoides de pared fina en el pedicelo) en todas las especies exhibieron dimorfismo sexual, siendo estos receptores más abundantes en los machos que en las hembras, *B. herreri* ($p = 0,001$), *B. corredori* ($p = 0,0008$) y *B. ferroae* ($p = 0,00004$). Además, en *B. corredori* diferencias significativas entre machos y hembras también se detectaron en los F2TPF ($p = 0,001$), y en la especie *B. ferroae* en los receptores F1TPF ($p = 0,0007$) y los F2TPF ($p = 0,0006$).

www.bdigital.ula.ve

Tabla 18. Promedio (m) y desviación estándar (DS) del número de sensilia por segmento y tipo de receptor. Valores con letras diferentes (a, b, c) en cada estadio ninfal, indican que existen diferencias significativas entre las especies ($p \leq 0,0167$).

Estadio	Especie	Pedicelo		Flagelo 1		Flagelo 2								# Total sensilla (3 segmentos)	
		BR		BR		BR		TPF		TPG		BA		m	DS
		m	DS	m	DS	m	DS	m	DS	m	DS	m	DS		
N1	Bh	9 ^a	1,6	6 ^a	2,0	6 ^a	1,7	3 ^a	1,0	27 ^a	5,1	6 ^a	1,3	51	6,99
	Bc	8 ^a	0,0	5 ^a	0,5	5 ^a	1,0	4 ^a	1,2	30 ^a	4,4	7 ^a	1,2	53	3,76
	Bf	8 ^a	0,8	5,75 ^a	1,7	7 ^a	1,9	4,3 ^a	1,3	30 ^a	3,0	7,67 ^a	1,6	54	4,39
N2	Bh	11 ^a	2,1	6 ^a	1,8	6 ^a	1,4	4 ^a	0,8	23 ^a	5,5	7 ^a	1,5	51	7,04
	Bc	8,8 ^{a,b}	0,8	5 ^a	0,0	6,17 ^a	1,3	3,5 ^a	1,6	28,8 ^a	4,0	7,83 ^a	2,9	51	5,63
	Bf	8,25 ^b	0,3	5,33 ^a	0,5	7 ^a	1,2	4,5 ^a	1,0	31 ^a	4,1	7,3 ^a	1,4	58	3,77
N3	Bh	13 ^a	1,8	7 ^a	1,4	7 ^a	1,5	4 ^a	1,3	32 ^a	5,6	8 ^a	1,0	64	7,04
	Bc	10,57 ^b	1,0	5,14 ^a	0,4	5,86 ^a	0,7	3,86 ^a	1,1	27,3 ^a	4,6	7,14 ^a	1,5	55	4,95
	Bf	11,89 ^{a,b}	0,7	5,6 ^{a,b}	0,5	7,5 ^a	1,8	5,5 ^a	1,2	33 ^a	4,3	7,5 ^a	2,0	55	6,67
N4	Bh	21 ^a	2,3	7 ^a	2,0	7 ^a	1,4	4 ^{a,b}	1,3	36 ^a	6,1	11 ^a	3,5	78	10,21
	Bc	11,8 ^b	0,8	5,2 ^a	1,0	6,2 ^a	0,8	3,4 ^a	1,6	35,4 ^a	1,6	9,4 ^a	1,6	66	2,58
	Bf	15,33 ^{a,b}	1,2	5,83 ^a	0,4	6 ^a	0,9	7,5 ^b	1,0	40 ^a	4,5	8 ^a	2,1	77	6,89
N5	Bh	21 ^a	4,9	8 ^a	2,8	7 ^a	1,1	5 ^a	2,0	32 ^a	4,7	8 ^a	2,3	72	8,99
	Bc	17,83 ^b	1,0	5,17 ^a	0,4	6,33 ^a	0,8	6,5 ^a	1,8	36,6 ^{ab}	7,0	11,12 ^a	1,3	78	5,94
	Bf	19,7 ^{a,b}	1,0	6,1 ^a	0,5	5 ^a	0,8	7,8 ^a	2,0	44 ^b	6,5	9 ^a	3,9	86	10,35

Bristles (BR), Tricoide de pared fina (TPF), Tricoide de Pared gruesa (TPG), Basicónica (BA). Bh (*B. herreri*), Bc (*B. corredori*), Bf (*B. ferroae*). N1, ninfa de primer estadio; N2, ninfa de segundo estadio II; N3, ninfa de tercer estadio; N4, ninfa de cuarto estadio; N5, ninfa de quinto estadio.

Tabla 19. Promedio (m) y desviación estándar (DE) del número de sensilia por segmento y tipo de receptor en la antena de los machos y las hembras de *B. herreri*, *B. corredori* y *B. ferroae*.

Segmento	Sensilla	<i>B. herreri</i>				<i>B. corredori</i>				<i>B. ferroae</i>			
		macho		hembra		macho		hembra		macho		hembra	
		m	DE	m	DE	m	DE	m	DE	m	DE	m	DE
Pedicelo	BR	23,71 ^{a,b}	1,60	27,25 ^{a,b}	3,86	19,4 ^a	1,51	20,86 ^a	2,04	26,17 ^o	0,94	28,2 ^b	2,59
	TPF	<u>19,57^{a*}</u>	3,41	4,75 ^{a,b}	0,96	<u>6,8^{b*}</u>	1,55	0,14 ^a	0,37	<u>20,83^{o*}</u>	4,02	5,07 ^b	0,77
Flagelo 1	BR	7,29 ^a	1,11	5,75 ^{a,b}	0,96	5,1 ^o	0,57	5,29 ^a	0,95	7,5 ^c	1,07	8,71 ^b	1,53
	TPF	6,71 ^a	1,89	9,5 ^{a,o}	1,73	4,8 ^a	1,14	4,57 ^a	1,13	12,83 ^{o*}	2,36	10,93 ^o	1,91
	TPG	16,43 ^a	2,82	23,75 ^a	7,72	30,7 ^{a,b}	3,33	31,29 ^{a,b}	2,43	<u>38,17^o</u>	4,99	37,43 ^o	6,94
	BA	4,43 ^a	2,88	4,75 ^a	1,26	5,1 ^a	0,88	4,43 ^a	1,13	4,83 ^a	1,57	4,86 ^a	1,73
	BR	3 ^a	1,41	6 ^a	1,83	6,11 ^o	0,93	5,86 ^a	1,21	6 ^a	1,37	7,07 ^a	1,58
	TPF	12,57 ^a	2,30	13,75 ^a	5,85	<u>8,89^{o*}</u>	1,17	6,43 ^o	1,27	<u>13,67^{a*}</u>	1,63	10,33 ^{a,o}	2,13
Flagelo 2	TPG	33 ^a	6,35	38 ^a	6,78	46,89 ^a	5,13	49,71 ^a	3,99	52,17 ^a	3,89	51,47 ^a	5,34
	BA	7,43 ^a	2,82	6,5 ^a	0,58	11,56 ^a	3,47	11,43 ^{a,b}	2,44	9,83 ^a	2,21	13,2 ^b	2,73
Total		89	7,58	99	7,58	99,55	7,93	94,42	4,99	112,00	7,98	128,00	8,32

Bristles (BR), Tricoide de pared fina (TPF), Tricoide de Pared gruesa (TPG), Basicónica (BA). Valores con letras diferentes o que no comparte ninguna letra (a, b, c) entre los machos y entre las hembras de las tres especies, indican diferencias significativas ($p \leq 0,0167$). (*) Indica diferencias significativas entre ambos sexos de cada especie ($p \leq 0,01$).

En el análisis multivariado de componentes principales, el porcentaje de la varianza explicada por los componentes 1 y 2 fue del 82% en *B. herreri*, 91% en *B. corredori*, y del 92% para *B. ferroae*. En *B. herreri* las variables que presentaron los mayores pesos en el componente 1 fueron (PBR, PTF) y para el 2 (F2TPF, PTPF), en *B. corredori* (F1TPF, PBR) y (PTPF, F2TPF), y en *B. ferroae* (PTF) y (F2TPG, PBR) respectivamente. En general, se observa que el componente 1 separa las diferentes etapas del desarrollo y el componente dos las hembras de los machos. Esto permite observar la modificación gradual que presenta el fenotipo antenal durante el desarrollo y el dimorfismo sexual en todas las especies estudiadas (Figura 28 A, B y C).

El análisis discriminante de las variables del fenotipo antenal en las hembras clasificó correctamente el 100% de los individuos a su propia especie, y en una segunda reclasificación 100% fueron correctamente asignados a la especie *B. corredori* en un 92% y a *B. ferroae* y *B. herreri* en un 100%. Las dos funciones discriminantes obtenidas contribuyeron al 100% de la varianza observada (74% primera y 26% segunda). En los machos el análisis discriminante clasificó correctamente el 100% de los individuos a su propia especie tanto en la primera como en la segunda reclasificación. Las dos funciones discriminantes obtenidas contribuyeron al 100% de la varianza observada (57% la primera y 43% segunda). Todas las distancias de Mahalanobis obtenidas en el AD fueron estadísticamente significativas, tanto en hembras como en machos (Tabla 20 y Figura 29).

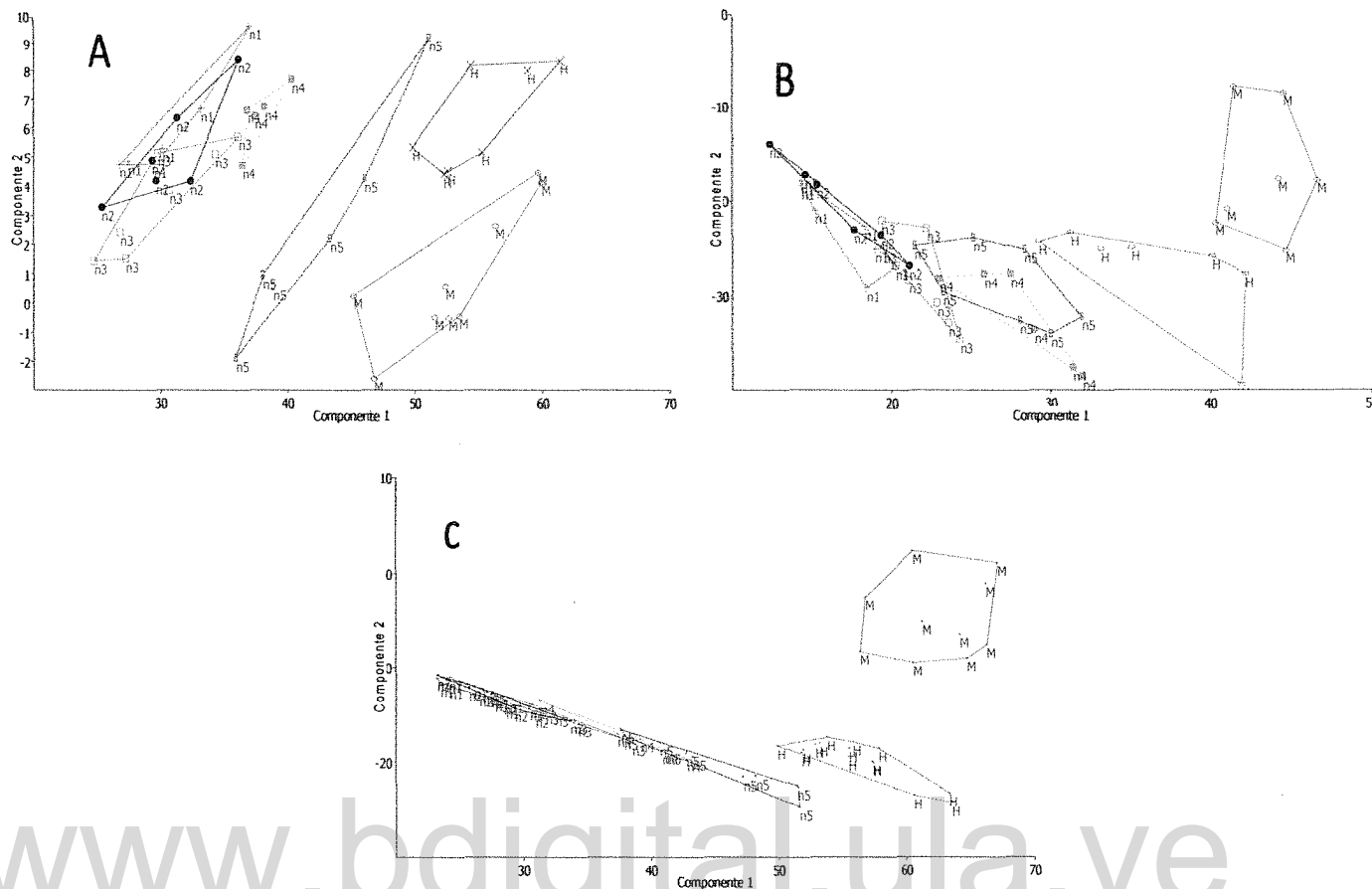


Figura 28. Análisis de componentes principales (ACP). Cada punto representa un espécimen sobre los ejes canónicos 1 y 2. Los polígonos encierran los especímenes de cada etapa del desarrollo las ninfas y los adultos. *B. corredori* (A), *B. herreri* (B), *B. ferroae* (C). N1, ninfa I; N2, ninfa II; N3, ninfa III; N4, ninfa IV; N5, ninfa V. Hembra (H), Macho (M).

Tabla 20. Distancias de Mahalanobis entre especies (por sexo) después de ejecutar el análisis discriminante. Todas las distancias entre las especies fueron significativas ($p \leq 0,001$), después de la corrección de Bonferroni.

Especies	Distancias de Mahalanobis	
	hembras	machos
<i>B.corredori</i> - <i>B.ferroae</i>	6,27	6,41
<i>B.corredori</i> - <i>B.herreri</i>	7,68	6,42
<i>B.ferroae</i> - <i>B.herreri</i>	4,38	7,04

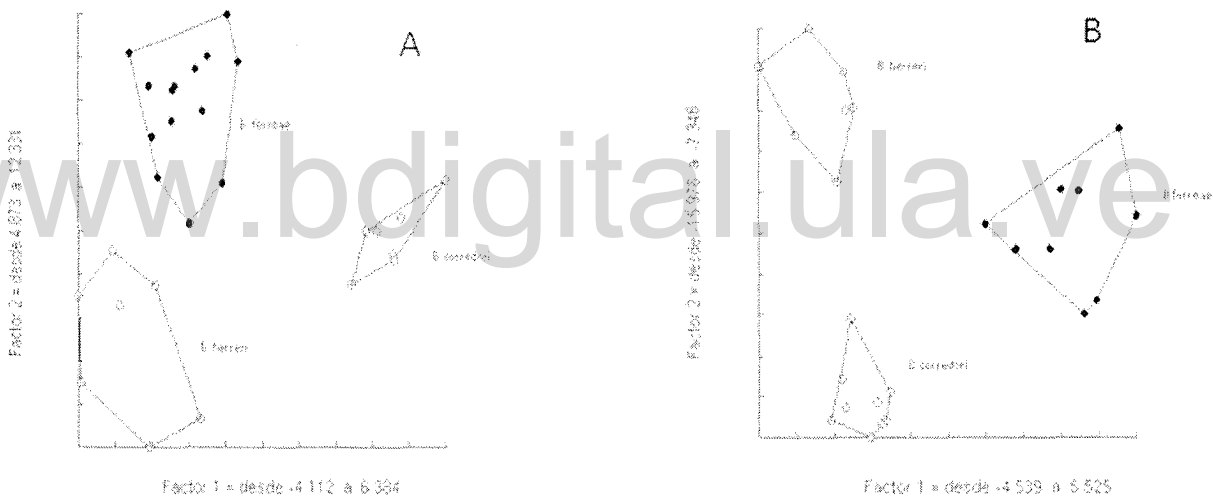


Figura 29. Análisis discriminante ejecutado con cuatro variables de la antena en adultos hembras (A) y en machos (B) de *B. corredori*, *B. herreri* y *B. ferroae*.

5.4 Huevos

5.4.2 Aspectos macroscópicos

5.4.2.1 Color, forma y tamaño

Los huevos de las especies de *Belminus* estudiadas, son puestos por la hembra de manera individual y sin adherirlos al sustrato. Los huevos recién puestos son de color blanquecino que al avanzar en el desarrollo embrionario, pasa por crema claro a un rojo brillante. Cuando eclosionado el corion es blanco, transparente y brillante (Figura 30). Tienen forma ovalada y presentan una región caudal redondeada, hendidura lateral no prominente y un opérculo simple convexo y verdadero (Figura 31: lámina 1 (1)). No se observa collar ni cuello, sino una continuidad entre el borde corial y el resto del cuerpo del huevo. La longitud promedio del huevo entre las especies varió de 1,03 - 1,17 mm y el ancho entre 0,72 mm - 0,80 mm. (Tabla 21).

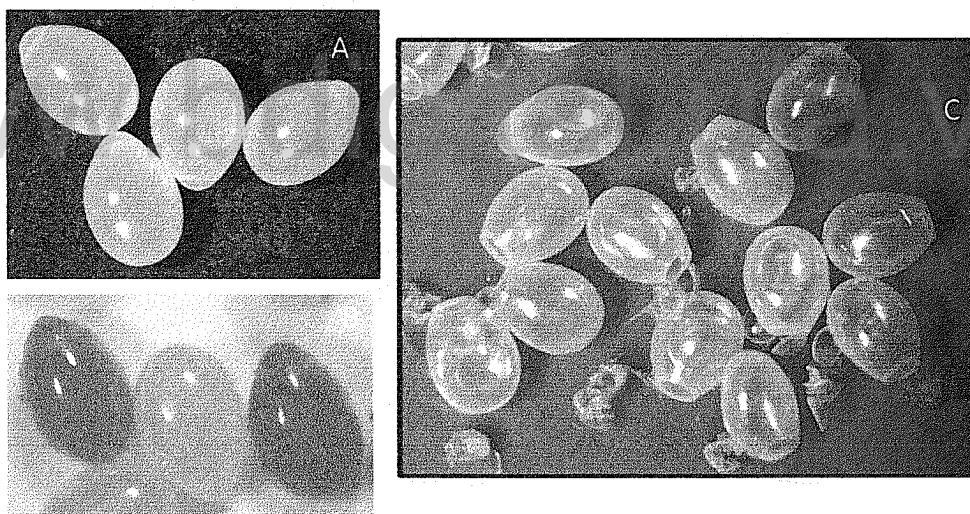


Figura 30. Huevos de *Belminus* sp. (A) recién puestos ± 24 horas, (B) Huevos de color rojo ± 14 días de puestos, (C) Huevos eclosionados.

Tabla 21. Promedio, desviación estándar y coeficiente de variación el tamaño de los huevos medidos en milímetros y número de aerópilos y micrópilos en las especies *B. corredori*, *B. herreri* y *B. ferroae*.

Especies	Huevo completo		Opérculo	# Aerópilos	# Micropilos
	Largo	Ancho	diametro		
<i>B. corredori</i>	1,06 ±0,04	0,77 ±0,03	0,72±0,02	40±17,69	10,75±2,5
	3,86	4,66	0,01	44,23	79,9
<i>B. herreri</i>	1,03±0,03	0,72±0,02	0,71±0,03	42±16,32	6,00±2,3
	3,28	3,19	7,79	38,85	38,33
<i>B. ferroae</i>	1,17±0,07	0,80±0,03	0,76±0,03	32,5±21,32	7,33±5,86
	6,34	3,16	5,91	65,68	23,25

5.4.3 Aspectos microscópicos

5.4.3.1 Opérculo

Es un disco simple, convexo, que en su superficie externa muestra un arreglo poligonal sin proyecciones, tubérculos o perforaciones. En la especie *B. corredori*, la parte superior del opérculo es redondeada, y se observa levemente puntiaguda en *B. ferroae* y *B. herreri* Figura 31: lámina 1 (2-4). Las celdas ubicadas en la base opercular presentan bordes elevados, que no se fusionan completamente entre sí, este tipo de celda poligonal es más frecuente en el opérculo de *B. ferroae* que en *B. corredori*. Las celdas superiores del opérculo difieren de las anteriormente descritas por presentar bordes fusionados, sin bordes elevados, con aspecto de baldosa y a medida que se avanza hacia la parte apical del opérculo, los bordes se desvanecen, y hacen menos perceptible el arreglo poligonal, por su aspecto liso, en *B. corredori* y *B. herreri*, mientras que éste se mantiene en casi toda extensión del opérculo en *B. ferroae*, y sólo empieza a disiparse en la región más apical. Las celdas poligonales presentes en las tres especies fueron de tipo tetragonal pentagonal, hexagonal, heptagonal. En *B. corredori* se observaron celdas de bordes menos nítidos (Figura 31: lámina 1 (5-7)). El diámetro del opérculo osciló entre 0,71 mm en *B. herreri* y 0,76 mm en *B. ferroae* (Tabla 21).

5.4.3.2 *Región cefálica*

En las tres especies estudiadas, corresponde a la región inmediatamente por debajo del borde corial, la cual presenta celdas lisas, algunas con aspecto redondeado, sin perforaciones y de bordes más prominentes que en el resto del huevo (Figura 31: lámina 1 (1); por otra parte, en la región del borde corial que contacta al opérculo, se observan tres capas y unas proyecciones globulares (Figura 31: lámina 1 (9) y (Figura 31: lámina 2 (12,15). Las aberturas de los micrópilos se situaron en el borde externo del borde corial, siempre asociadas a una o varias ranuras de longitud variable entre 38 y 68 μm (Figura 31: lámina 1 (8) y (Figura 32: lámina 2 (10, 11, 13, 14, 15,16). Los aerópilos se ubicaron en el borde corial donde limita con el opérculo (Figura 31: lámina 1 (9) y (Figura 32: lámina 2 (10-12, 13, 15,16). Se observó variación tanto en el número de aerópilos (5-57) como de micrópilos (5-14). (Tabla 21). No se observó gotera espermática.

El arreglo de las celdas poligonales en la región media y caudal del huevo observado por MO, no fue evidente por MEB, las celdas en este caso se observaron cubiertas de una capa de cemento, la cual no pudo ser removida aún después del tratamiento con proteinasa K. En las regiones donde el tratamiento enzimático removió parte del cemento, se observaron perforaciones en las celdas poligonales (Figura 32: lámina 2 (17,18)).

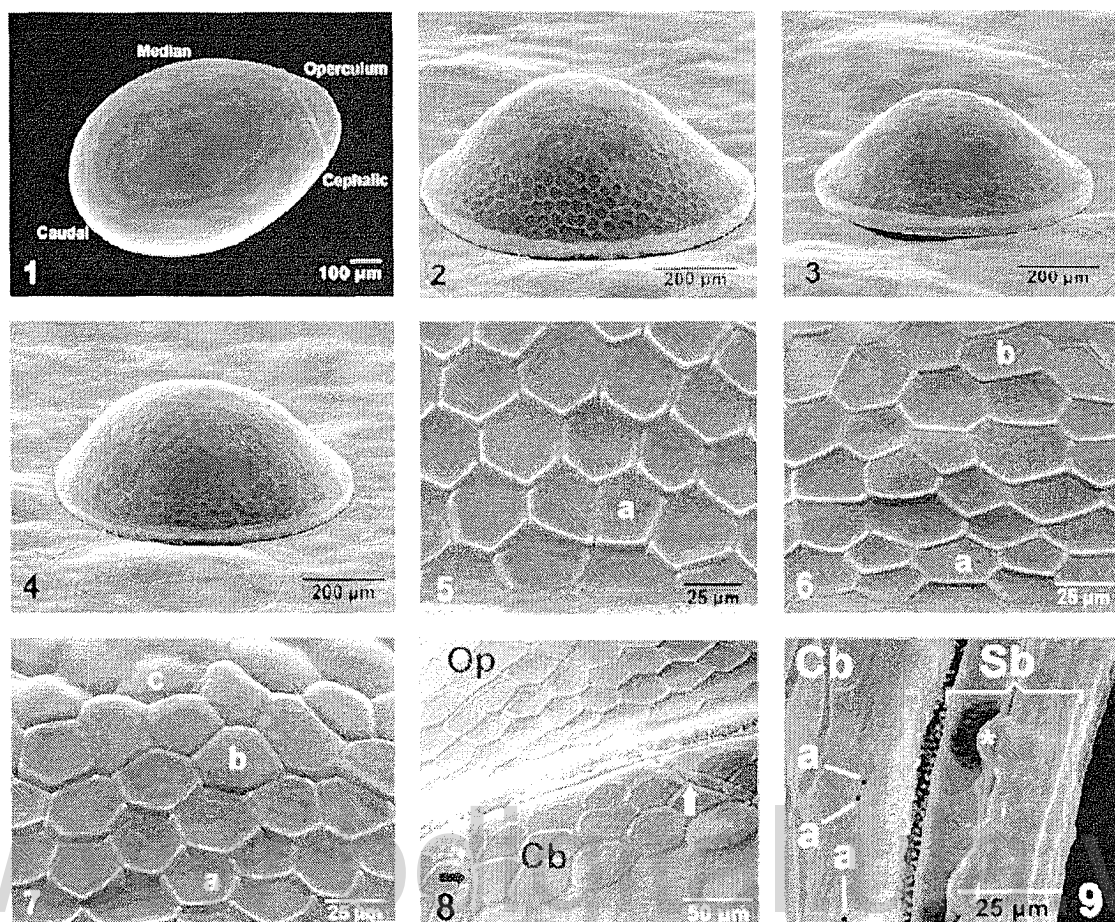


Figura 31. Lámina 1. 1. Huevo completo de *B. herreri* mostrando las diferentes regiones: cefálica, media, caudal y opérculo. 2. Opérculo de *B. ferroae*. 3. Opérculo de *B. herreri*. 4. Opérculo de *B. corredori*. 5. Borde externo del opérculo de *B. ferroae*, (a) Celdas de bordes levantados. 6. Borde externo del opérculo de *B. herreri*, (a) Celdas de bordes levantados (b), Celdas en forma de baldosa. 7. Borde externo del opérculo de *B. corredori*, (a) Celdas de bordes levantados, (b) Celdas en forma de baldosa, (c) Celdas irregulares. 8. Ranuras asociadas a los micrópilos en *B. ferroae*. 9. Detalle del borde corial en huevo eclosionado (vista superior) en *B. ferroae*. Opérculo (Op), borde corial (Cb), barra de sellado (Sb), aerópilos (a), Ranuras (flecha) y proyecciones globulares (*).

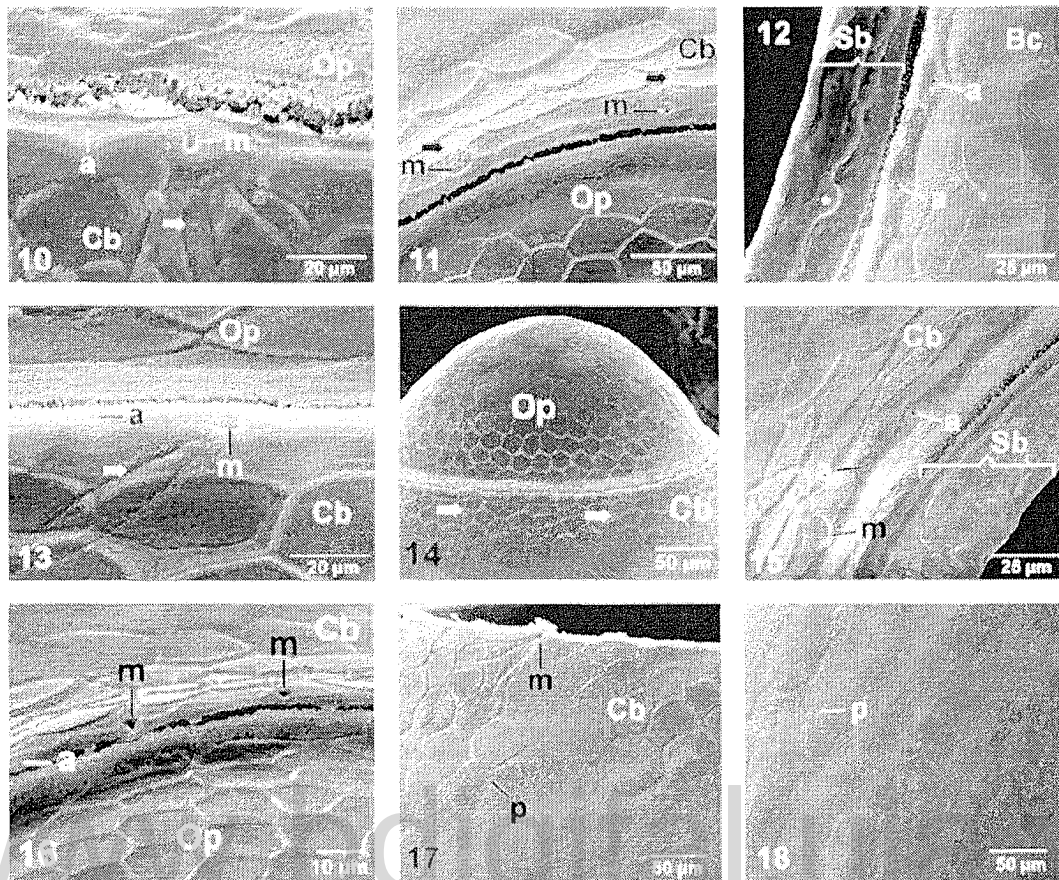


Figura 32. Lámina 2. **10.** Detalle del margen superior del borde corial en vista lateral mostrando aerópilos y micrópilos en *B. ferroae* **11.** Ranuras asociadas a los micrópilos 1500X en *B. corredori* **12.** Detalle del borde corial en huevo eclosionado (vista superior) en *B. corredori* **13.** Detalle del borde corial en vista lateral mostrando los micrópilos y aerópilos en *B. corredori*. **14.** Ranuras asociadas a los micrópilos en huevo de *B. herreri*. **15.** Detalle del borde corial en huevo eclosionado (vista superior) en *B. herreri*. **16.** D Detalle del margen superior del borde corial en vista lateral mostrando aerópilos y micrópilos en *B. herreri*. **17.** *B. ferroae* huevos tratados con proteinasa K (24 horas) mostrando poros (p) en la región cefálica. **18.** *B. ferroae* huevos tratados con proteinasa K (24 horas) mostrando poros (p) en la región media. Opérculo (Op), borde corial (Cb), barra de sellado (Sb), aerópilos (a), Ranuras (flecha) y proyecciones globulares (*).

5.4.3.3 Descripción y análisis del arreglo de las celdas poligonales en el borde del opérculo

En la Tabla 22 se muestra el número promedio de celdas poligonales que se observaron en las tres especies y que correspondieron a tetrágonos, pentágonos, hexágonos y heptágonos. Celdas de bordes menos nítidos sólo fueron observadas en *B. corredori*. El tipo de celda poligonal más frecuente en las tres especies fue la hexagonal.

La especie con el mayor promedio de celdas fue *B. herreri*, seguida de *B. corredori* y por último *B. ferroae*. Diferencias en el número total de celdas fue estadísticamente significativa entre *B. herreri* y *B. ferroae* ($p = 0,009$). En cuanto al tipo de celda, los tetrágonos ($p = 0,590$) y hexágonos ($p = 0,281$) no registraron diferencias significativas. Sin embargo diferencias significativas en el número de celdas pentagonales se observaron entre *B. corredori* - *B. ferroae* ($p = 0,024$) y *B. corredori* - *B. herreri* ($p = 0,005$). También se encontraron diferencias en las celdas heptagonales en las especies *B. ferroae* - *B. herreri* ($p = 0,003$) y *B. ferroae* - *B. corredori* ($p = 0,013$).

El análisis discriminante de las variables del opérculo tanto en la primera como en la segunda clasificación asignó correctamente los especímenes pertenecientes a *B. ferroae* y *B. corredori* en un 80% y *B. herreri* en 70%.

Las dos funciones discriminantes contribuyeron al 100% de la varianza observada (62% primera y 38% segunda). Todas las distancias de Mahalanobis fueron estadísticamente significativas *B. ferroae* - *B. herreri* (1,79) $p = 0,010$; *B. ferroae* - *B. corredori* (2,16) $p = 0,002$ y *B. herreri* - *B. corredori* (1,83) $p = 0,008$. (Figura 33).

Tabla 22. Promedio y desviación estándar del número de celdas poligonales presentes en el borde del opérculo de las especies *B. corredori*, *B. herreri* y *B. ferroae*.

Especie	Tipo de celdas					Total
	tetraagonales	pentagonales	hexagonales	heptagonales	lados irregulares	
<i>B. herreri</i>	0,6±0,8	6,8±2,35	9,7±2,53	2,9±1,37	0	20±7,06
<i>B. corredori</i>	0,5±0,92	3,4±1,96	9,1±1,64	2,6±1,11	1,7±0,78	17,3±6,42
<i>B. ferroae</i>	0,9±0,8	6,2±1,94	8±2,45	1±0,77	0	16,1±5,99

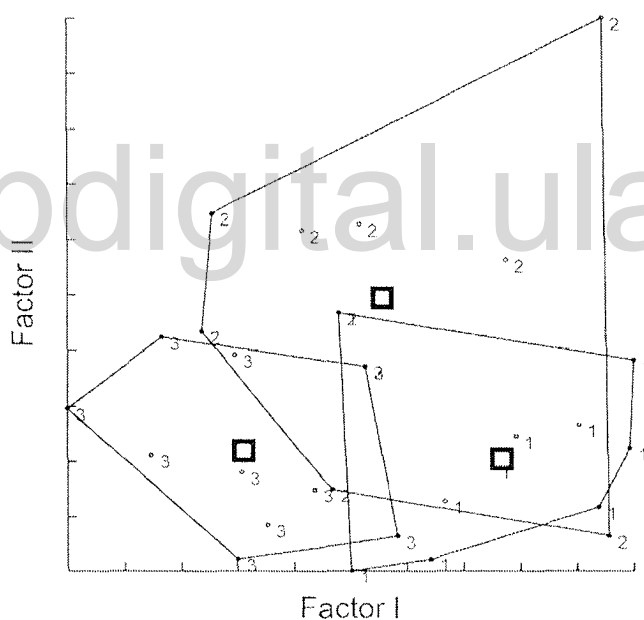


Figura 33. El Análisis discriminante ejecutado con tres variables del opérculo en *B. herreri* (1), *B. ferroae* (2) y *B. corredori* (3). Factor I: de -2.583 a 2.152. Factor II: de 2.445 a 7.578.

5.4.4 Resultados del análisis filogenético a través del citocromo b

Un total de ocho haplotipos del citocromo b fueron observados en 33 secuencias de 537 pares de bases (1 haplotipo, $n = 3$ *B. corredori*; 4 haplotipos, $n = 8$ *B. herreri* y 3 haplotipos, $n = 22$ *B. ferroae*) (Tabla 23). El alineamiento reveló 140 sitios variables (26%), con 21 substituciones no sinónimas. La tasa de transiciones/transversiones R fue de 3,2. La composición nucleotídica fue sesgada hacia AT, A = 33.28%, T = 33.28%, C = 16.72%, y G = 16.72%.

El análisis de las secuencias obtenidas para el citocromo b, generaron un árbol con tres clados principales que presentaron la misma topología por el método de neighbor-joining (99% valores de bootstrap) (Figura 34) y el de máxima verosimilitud (100% - 99% valores de bootstrap) (Figura 35). El grado de diferenciación genética entre los tres clados, y expresado como el promedio general de substituciones nucleotídicas entre pares de secuencias fue de $0,2638 \pm 0,0264$ para *B. ferroae* - *B. herreri*, $0,2511 \pm 0,0256$ *B. ferroae* - *B. corredori* y $0,1534 \pm 0,0194$ *B. corredori* - *B. herreri*.

www.bdigital.ula.ve

Tabla 23. Sitios variables para un fragmento de 537 pares de bases del gen de *citocromo b* observados en ocho haplotipos encontrados en 33 secuencias del género *Belminus*

[illegible]

N = número de insectos. Localidades: SC = Santa Catalina, SA = San Alberto, BE = Belén, N de Sder = Norte de Santander.

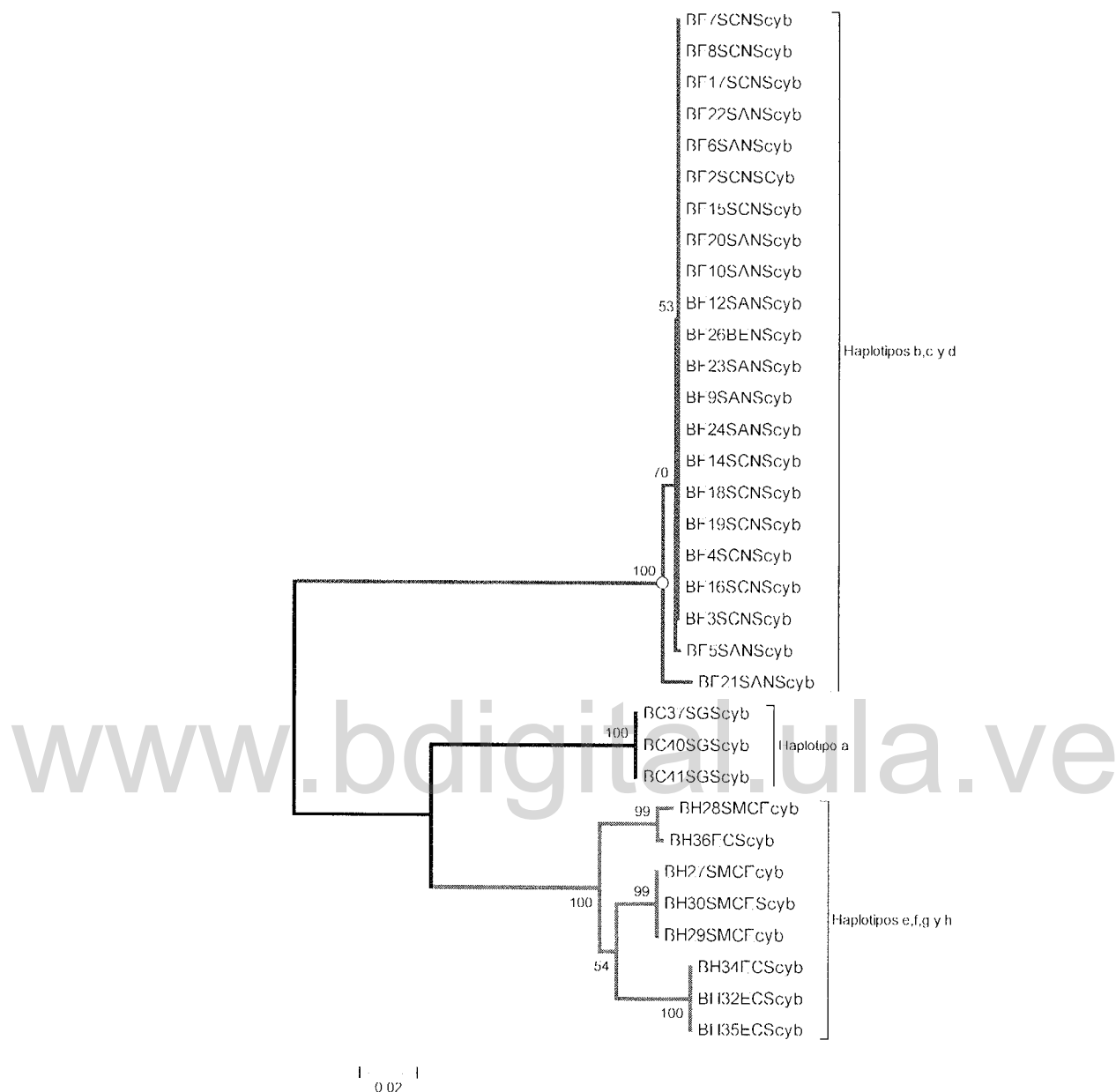


Figura 34. Árbol filogenético (consenso) obtenido con 33 secuencias de citocromo b, usando el método de Neighbor Joining y con el modelo Kimura 2 parámetros como el estimador de distancias. Los números sobre los nodos representan el soporte estadístico con 1000 bootstraps.

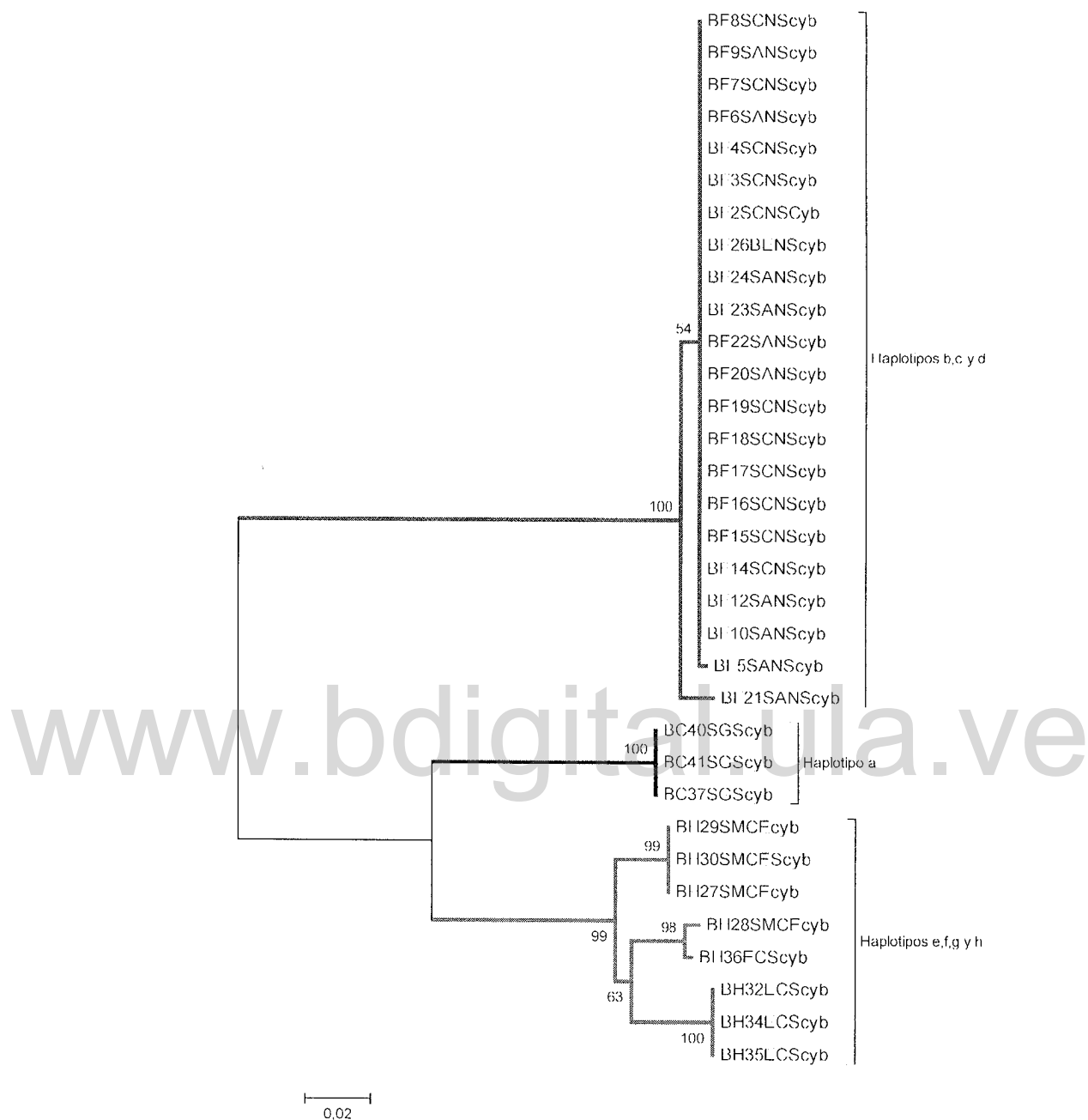


Figura 35 Árbol filogenético (consenso) obtenido con 33 secuencias de citocromo b, usando el método de Máxima Verosimilitud y con el modelo Tamura 3 parámetros como estimador de distancias. Los números sobre los nodos representan el soporte estadístico con 1000 bootstraps.

6 Discusión

6.1 Antenas

Los tipos de sensilia y el patrón de distribución que se observaron en las antenas de las ninfas y los adultos de las especies, *B. corredori*, *B. ferroae* y *B. herreri* son similares a los descritos por Catalá & Schofield (1994), para otras especies de Triatominae que presentan un reconocido comportamiento hematófago.

La presencia de quimiorreceptores sobre el pedicelo es común en los adultos de las especies del género *Triatoma*, *Psammolestes*, *Cavernicola* y *Panstrongylus*. El género *Belminus* presenta un sólo tipo de quimiorreceptor en este segmento, el tricoide de pared fina (TPF) similar a *T. infestans*. En otras especies como *T. sordida*, *T. guasayana*, *P. megistus*, *T. dimidiata*, y *T. pseudomaculata*, presentan además el Tricoide de pared gruesa (TPG) y los basicónicos (BA) (Catalá et al. 1997, Catalá et al. 2005, Villela et al. 2005, Arroyo et al. 2007, Carbajal de la Fuente et al. 2008). Esta mayor complejidad en el arreglo del patrón de sensilia sobre el pedicelo, es considerado por Catalá (1997) como reflejo de una mayor amplitud en el rango de hábitats a explotar. En este sentido, el fenotipo antenal mostrado por las especies de *Belminus*, podría indicar un margen estrecho de hábitats a ocupar.

Por otra parte, la relación entre el morfotipo alar y el número de tricoides multiporosos (TPF) en el pedicelo de las especies de *Belminus* fue similar a la observada en los triatominos del género *Mepraia* por Moreno et al. (2006). *B. ferroae* y *B. herreri* son insectos macrópteros y sus machos presentan un significativo número de TPF cuando comparado con *B. corredori*, la única especie braquíptera del género (Tabla 19). Este reducido número de sensilia y la condición braquíptera puede sugerir una baja capacidad dispersiva para la especie *B. corredori* probablemente asociada a una gran persistencia en un determinado hábitat, como observado en diversos grupos de insectos con polimorfismo alar y en ambas especies del género *Mepraia* (Zera & Denno 1997, Moreno et al. 2006).

La presencia de dimorfismo sexual en la antena, es frecuente en la mayoría de las especies de Triatominae; la excepción es la tribu *Rhodniini*, cuyos miembros ocasionalmente muestran esta característica (Catalá & Schofield 1994, Catalá, 1997). En este estudio, un mayor número de TPF fue observado en el pedicelo de los machos cuando comparados con las hembras de todas las

especies de *Belminus* examinadas, lo cual apoya la idea de que este receptor multiporoso (TPF) podría estar relacionado con la recepción de feromonas sexuales (Catalá 1997, Moreno et al. 2006).

6.1.1 Cambios en el fenotipo antenal durante el desarrollo

En ninfas y adultos es común observar la presencia de mecanorreceptores en todos los segmentos de la antena. Sin embargo, una distribución muy distinta presentan los quimiorreceptores en los estadios pre-reproductivos (ninfas), limitados exclusivamente al segundo flagelo de la antena. Es sólo en el estado adulto, que el pedicelo y el primer segmento del flagelo despliegan los quimiorreceptores. Estas diferencias entre las ninfas y los adultos fueron observadas por primera vez por Bernard (1974) en *T. infestans*, y llamó la atención por la ausencia de quimiorreceptores sobre el primer segmento flagelar en la ninfas y un aumento en el número de tricobotrias en los adultos (Catalá 1997). En los insectos la tendencia general es a incrementar el número de receptores, particularmente los quimiorreceptores. Al respecto, Chapman (1982) sugiere que estos cambios podrían reflejar requerimientos adicionales en los adultos relacionados a la reproducción y a la dispersión activa mediante el vuelo. En hemípteros de la familia Pentatomidae, el dimorfismo sexual en las sensilia de la antena fue evidente, así como diferencias en el patrón de sensilia durante la transición de ninfa a adulto (Silva et al. 2010).

En el flagelo II de la antena, las ninfas y los adultos tienen ambos tipos de receptores (quimiorreceptores y mecanorreceptores), así que este segmento podría estar relacionado a las funciones básicas del insecto, como la búsqueda de alimento y refugio (Catalá, 1997).

Durante el periodo de transición de ninfa de quinto estadio a adulto en Triatominae, el número de quimiorreceptores incrementa notablemente. Catalá (1997) refiere una correlación positiva entre la densidad de las sensilia y el número de hábitats explorados para 22 especies de Triatominae. En *T. sordida* los quimiorreceptores aumentan de 6,24 y en *T. infestans* 1,95 veces. La primera especie presenta una gran capacidad para la dispersión activa y la colonización de nuevos hábitats, mientras la segunda está más relacionada a ambientes domiciliarios y peridomiciliarios. *T. sordida* ha sido considerada como una de las especies más generalistas, en cuanto al hábitat y tiende a presentar mayor variabilidad poblacional cuando comparada con otras especies. Aunque en algunos insectos el número de receptores está directamente relacionado con el tamaño de la antena (Chapman 1982), este no parece ser el caso, ya que *T. sordida* presenta antenas cortas, pero muestra una mayor densidad en quimiorreceptores que otras especies de Triatominae que la superan en tamaño (Catalá et

al. 2000). Los resultados de este trabajo indican un incremento de 2,27 veces en *B. ferroae*, 2,21 veces en *B. herreri* y 2,04 veces en *B. corredori*, lo cual podría sugerir una baja capacidad para la dispersión en las especies de este género.

Con relación al estatus específico, fue posible a partir del fenotipo antenal de los adultos diferenciar claramente las tres especies de *Belminus* bajo estudio. Resultados, que apoyan la designación específica de estos taxones. Así mismo el estudio permitió corroborar, una vez más la resolución que se puede alcanzar a través del análisis de éste órgano en los Triatominae y su utilidad como herramienta taxonómica, ampliamente demostrada (Catalá & Schofield 1994, Gracco & Catalá 2000, Moreno et al. 2006, Carbajal de la Fuente et al. 2008).

6.2 Huevos

Numerosos trabajos han abordado el estudio morfológico de los huevos a partir de la arquitectura del exocorio, al describir y definir caracteres de valor taxonómico para las especies y los géneros de la subfamilia Triatominae. Sin embargo, poco se conoce de estos aspectos en al menos cinco géneros de la subfamilia: *Bolboderia*, *Belminus*, *Parabelminus*, *Hermanlenticia*, *Paratriatoma* (Barata 1998). Hasta el momento, para especies de *Belminus*, sólo se cuenta con el reporte de características macroscópicas y un acercamiento al arreglo poligonal por microscopía óptica (Lizaraso 1957). Con el cual se coincide en la descripción macroscópica y la observación del arreglo poligonal, restringido a la región cefálica y al opérculo del huevo para las cuatro especies (*B. corredori*, *B. ferroae*, *B. herreri* y *B. peruvianus*). El presente trabajo se constituye como el primer estudio detallado de los aspectos microscópicos del huevo en las especies del género *Belminus*.

La morfología de los huevos de las tres especies estudiadas, *B. corredori*, *B. herreri* y *B. ferroae*, difiere notablemente de la descrita para otros Bolboderini como *Microtriatoma borhai* y de las especies de las tribus Cavernicolini y Rhodniini, porque no presenta un cuello evidente, que se destaque del resto del cuerpo y la hembra no los adhiere al sustrato, de esta manera, son similares a la mayoría de las especies de la tribu Triatomini. Su pequeño tamaño, la forma elipsoide, la presencia de un arreglo poligonal evidente por MEB sólo en el opérculo y en la región cefálica del cuerpo del huevo, son características que comparte con los huevos de la tribu Alberproseniini,

específicamente *Alberprosenia malheroi*, exceptuando el diseño de las celdas y la adhesión al sustrato (Costa et al.1991, Barata 1998).

De manera similar que en los huevos de *Belminus*, en especies de Miridae, se observa un claro arreglo poligonal, restringido a la región cefálica del huevo; que durante su formación en el proceso de coriogénesis una población específica de células foliculares parece ser la responsable (Ma et al. 2002). En especies de la subfamilia Ectrichodiinae como *H. nigroviolaceus*, *G. nigripennis* y *E. pilicornis*, el desvanecimiento del arreglo poligonal a partir de la región cefálica hacia la parte media y caudal del huevo, se presume sea producto de la deposición de una secreción de las glándulas accesorias de la hembras, que ayuda en la adhesión de los huevos al sustrato en estas especies (Haridass 1986).

En *R. prolixus* se ha descrito de manera similar, que una capa de cemento de naturaleza proteica es depositada por la hembra en el momento de la oviposición, para su adhesión al sustrato (Beament 1948). En los huevos de las tres especies de *Belminus* estudiadas, la remoción completa de la capa que cubre el corion con el uso de la proteinasa K no fue posible, sin embargo, en los sectores donde actuó la enzima detectamos que la capa sella unas perforaciones que hacen parte de la arquitectura coriónica. Dado que los huevos de los *Belminus* son puestos libremente, ésta capa de cemento probablemente no cumple la función de adhesión al sustrato, sino la de conferir resistencia mecánica, defensa contra los patógenos y/o protección a la desecación.

En la subfamilia Triatominae, existe variación en el diseño del borde corial. Sin embargo, las estructuras externas asociadas, que tienen como función el intercambio gaseoso, los aerópilos (Tuft 1950, Southwood 1956) y la entrada de los espermatozoides para el proceso de fertilización, los micrópilos (Beament 1947) presentan un patrón característico. En el género *Belminus* la posición relativa del sistema aeromicropilar resultó ser similar en las tres especies estudiadas, con los aerópilos más pequeños y numerosos, y siempre ubicados en un nivel más elevado que los micrópilos, patrón que se correspondió con el presentado por especies como *T. rubrofasciata*, *L. costalis* y *L. confusus*. Con relación al número de aerópilos este fue de 92-177 en los géneros *Triatoma* y *Linshcosteus* respectivamente (Haridass 1986), en *Rhodnius* 200 (Beament 1947) y en las especies de *Belminus* se registra un número de 5-57 por huevo.

Diferencias en cuanto a la posición de los aerópilos en las especies de *Belminus* son notables en relación con las especies del género *Rhodnius* y *Triatoma*, en estos últimos generalmente los aerópilos se ubican en la región lateral del borde corial (Barata 1981, Rosa et al. 2000) y en *Belminus* entre la región superior del borde corial y muy cerca del borde del opérculo.

En cuanto a la presencia de ranuras asociadas a los micrópilos, parece ser un carácter único para el género *Belminus*, por cuanto no está reportado en ninguno de los diez géneros de la subfamilia, en los cuales han sido estudiados sus huevos (Barata 1998; Haridass 1986). Otro carácter notable es la ausencia de una gotera espermática externa como la descrita en *Rhodnius* por Barata (1981) y en *T. circummaculata*, *T. rubrovaria*, *T. matogrossensis* y *T. sherlocki* (Rosa et al. 2000, Obara et al. 2007^a). En cuanto al número de micrópilos en las tres especies de *Belminus* estudiadas resultó variable de 5 a 14, similar a lo reportado en *Rhodnius* (15), *Triatoma* (12-16) y *Linshcosteus* (9-16) (Haridass 1986, Tuft 1950).

De otra parte, un acercamiento cuantitativo al arreglo de las celdas poligonales en el cuerpo del huevo en especies y géneros de la subfamilia Triatominae, fue explorado por primera vez por González et al. (2009) y se logró discriminar entre los géneros *Meccus* y *Triatoma*. En las especies del género *Belminus*, no fue posible analizar el arreglo poligonal del cuerpo del huevo con esa metodología. Sin embargo, como previamente Silva et al. (2005) demostraron la utilidad de las características macroscópicas del opérculo para separar *T. vanda* de *T. williamsi*, se optó por analizar el nítido arreglo poligonal que brindó el opérculo de las especies de *Belminus*, lo que resultó ser un carácter que permitió separar a *B. herreri*, *B. corredori* y *B. ferroae* de manera confiable y abrió la posibilidad para el uso de esta estructura y/o del arreglo poligonal en el resto del cuerpo del huevo, en especies, donde la regularidad de las celdas poligonales y su arquitectura lo permitan. Por lo tanto, la cuantificación de las celdas poligonales en la superficie del huevo se propone como herramienta taxonómica en la subfamilia Triatominae.

Las distancias de Mahalanobis obtenidas en el análisis discriminante de las variables del opérculo, fueron menores entre la especie *B. ferroae* y *B. herreri* (1,79) y mayores entre esta dos especies y *B. corredori* (2,16 y 1,83), resultados que se corresponden con los obtenidos en el fenotipo antenal (PTPF) y con la similitud descrita entre las dos primeras especies, con referencia a su tegumento oscuro, su fenotipo alar (macrópteras) y que estas habitan en altitudes menores y ambientes húmedos, mientras que *B. corredori* presenta un tegumento claro, es braquíptera y habita en

altitudes mayores y ambientes más secos (Sandoval et al. 2004, Galvão & Angulo 2006, Sandoval et al. 2010).

6.3 Análisis de secuencias del citocromo b

El análisis de las secuencias de citocromo b indicó que los 33 especímenes examinados pueden ser divididos en tres clados separados, y estos se corresponden con la designación específica actualmente atribuida a *B. herreri* por Lent & Wygodzinsky 1979, a *B. corredori* por Galvão & Angulo 2006 y a *B. ferroae* por Sandoval, Pabón, Jurberg & Galvão 2007. Los clados no solo se soportan por los altos valores de bootstrap obtenidos con ambos métodos de reconstrucción filogenética, sino también por el grado de divergencia observado entre las secuencias del citocromo b para las tres especies de *Belminus*. Es interesante observar como las distancias entre las especies guardan relación con la genitalia de los machos. Así, *B. ferroae* es la especie más distante y es la única en el género que presenta un soporte del falosoma abierto en el ápice, mientras que *B. herreri* y *B. corredori* a pesar de no compartir el patrón cromático del cuerpo y presentar mayores diferencias respecto al fenotipo alar, antenal y al patrón poligonal del opérculo del huevo, ambas especies presentan un soporte del falosoma con ápice cerrado (Lent & Jurberg 1984, Sandoval et al. 2007). Las distancias genéticas observadas permiten afirmar que *B. ferroae* es la especie más distante y que *B. herreri* y *B. corredori* están filogenéticamente más relacionadas. Además, que los marcadores morfológicos como el fenotipo antenal y el patrón poligonal del opérculo, aunque discriminan las especies de una manera confiable, presentan un importante componente ambiental que oscurece las verdaderas relaciones filogenéticas.

Previos trabajos con marcadores mitocondriales que evaluaron el estatus taxonómico de algunas especies de Triatominae, reportan valores de divergencia inferiores a los registrados en este estudio para las especies de *Belminus*. Por ejemplo, entre las poblaciones de *Triatoma brasiliensis* evaluadas por el citocromo b la mayor divergencia genética de algunas poblaciones osciló entre 0,075 - 0,084 uno de los argumentos que llevaron a los autores a sugerir la elevación de la población de Juazeiro al estatus de especie, formalmente descrita por Costa & Felix (2007). Entre especies cercanas como *T. infestans* y *T. platensis* (0,081) y *T. sordida* y *T. garciabesi* (0,082) o alejadas como *T. brasiliensis* y *T. infestans* 0,130 (Monteiro et al. 1999, Monteiro et al. 2004). En los Triatominae, los valores promedios de distancia o divergencia genética en treinta comparaciones interespecíficas oscilaron

entre $0,504 \pm 0,341$, mientras los valores registrados entre poblaciones (relaciones intraespecíficas), usualmente fluctuaron entre $0,013 \pm 0,009$, esto último basado en 142 comparaciones (Abad-Franch & Monteiro 2005). Los resultados de éste estudio sugieren que las diferencias genéticas encontradas al analizar el citocromo b en los tres clados de *Belminus* son consistentes con una relación interespecífica.

7 Conclusiones

Diferencias en el fenotipo antenal entre los Rhodniini y los Triatomini han sido señaladas por Catalá & Schofield (1994) respecto a la presencia o no de quimiorreceptores en el pedicelo. Sin embargo, cuando se adicionan a los análisis nuevos taxones pertenecientes a Cavernicolini e incluso del mismo Rhodniini (*Psammolestes*), esta diferencia no es terminante. Los Cavernicolini presentan los tres tipos de quimiorreceptores y *Psammolestes* uno (los basicónicos) (Catalá 1997). Por lo tanto, es difícil a partir del fenotipo antenal hacer una clara delimitación a nivel tribal y por lo tanto inferir un relacionamiento en ese nivel para Triatominae con este carácter morfológico.

La homología morfológica y funcional entre los huevos de las especies de *Belminus* y los de la mayoría de los Triatomini, permite inferir un relacionamiento más cercano con las especies de esta tribu, que el esperado con el Bolboderini del género *Microtriatoma*, este último probablemente más relacionado con los Cavernicolini y los Rhodniini, como se evidenció en el capítulo V de este estudio con el marcador nuclear 28SD2.

Por otra parte, la correspondencia encontrada entre los dos marcadores morfológicos (el fenotipo antenal y el patrón poligonal del opérculo del huevo) y el marcador molecular (citocromo b), es decir, entre el fenotipo y el genotipo, apoya la designación específica de los tres taxones de *Belminus* examinados. Sin embargo, futuros estudios que incluyan un mayor número de poblaciones, muestras de otras especies de *Belminus* y experimentos de entrecruzamiento recíproco serán necesarios para aclarar y fortalecer el estatus taxonómico de las especies del género *Belminus*.

8 Referencias

1. Abad-Franch F & Monteiro FA 2005. Molecular research and the control of Chagas disease vectors. *An Acad Bras Cienc* 77: 437-454.

2. Abalos JW, Wygodzinsky P 1951. Las Triatominae Argentinas (Reduviidae, Hemiptera). Universidad Nacional de Tucumán, Instituto de Medicina Regional, Monografía 2, Publicación 601, Argentina, 178 pp.
3. Aldana E, Arrieche S, Lizano E 2013. Análisis morfológico del exocorion de huevos de Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) mediante microscopia electrónica de barrido. *Acta Microsc.* En prensa.
4. Altner H, Prillinger L 1980. Ultrastructure of invertebrate chemo-, thermo-, and hygroreceptors and its functional significance. *Int Rev Cytol* 67: 69-139.
5. Arroyo CM, Esteban L, Catalá S, Angulo VM 2007. Antennal phenotype variation in sylvatic, peridomestic and domestic populations of *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) from Santander, Colombia. *Biomédica* 1: 92-100.
6. Barata JMS 1981. Aspectos morfológicos de ovos de Triatominae II—Características macroscópicas e exocoriais de dez espécies do gênero *Rhodnius* Stål, 1859 (Hemiptera: Reduviidae). *Rev Saude Publica* 15: 490-542.
7. Barata, JMS 1998. Macroscopic and exocorial structures of Triatominae eggs (Hemiptera, Reduviidae). In Carcavallo RU, Galindez-Girón I, Jurberg J, Lent H. Atlas of Chagas disease vectors in the Americas, vol. II. Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 409-448.
8. Bargues MD, Schofield CJ, Dujardin JP 2010. Classification and phylogeny of the Triatominae. In Telleira J, Tibayrenc M. American Trypanosomiasis Chagas disease. One hundred years of research. En Elsevier, London, p 119-148.
9. Barrozo RB, Lazzari CR 2006. Orientation response of haematophagous bugs to CO₂: the effect of the temporal structure of the stimulus. *J Comp Physiol* 192: 827-831.
10. Barth R & Muth H 1958. Estudos anatômicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae (Heteroptera: Reduviidae). VIII. Observações sobre a superfície de ovos de espécies mais importantes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 56: 197-208.
11. Beament JW 1948. The penetration of the insect egg-shells; penetration of the chorion of *Rhodnius prolixus*, Stål. *Bull Entomol Res* 39: 359-83.
12. Beament JWL 1947. The formation and structure of the micropylar complex in the eggshell of *Rhodnius prolixus* Stål (Heteroptera: Reduviidae). *J Exp Biol* 23: 213-235.

13. Bernard J 1974. Etude electrophysiologique des récepteurs impliqués dans la orientation vers l'hôte et dans l'acte hemophage chez un hemiptere *Triatoma infestans*. Thesis, Universite de Rennes.
14. Calleros L, Panzera F, Bargues MD, Monteiro FA Klisiowicz DR, Zuriaga MA, Mas-Coma S, Pérez A. Systematics of *Mepraia* (Hemiptera-Reduviidae): Cytogenetic and molecular variation. *Mol Phylogenet Evol* 10: 221-228.
15. Candan S, Suludere Z 1999. Chorionic Structure of *Graphosoma lineatum* (Linnaeus, 1758). (Heteroptera, Pentatomidae). *J Entomol Res Soc* 1: 1-7.
16. Carbajal de la Fuente AL, Catalá S 2002. Relationship between antennal sensilla pattern and habitat in six species of Triatominae. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 1121-1125.
17. Carbajal de la Fuente AL, Noireau F, Catalá SS 2008. Inferences about antennal phenotype: the "*Triatoma maculata* complex" (Hemiptera: Triatominae) is valid? *Acta Trop* 106: 16-21.
18. Catalá S 1997. Antennal sensilla of triatominae (Hemiptera, Reduviidae): A comparative study of five genera. *Int J Insect Morphol Embryol* 26: 67-73.
19. Catalá S, Sachetto C, Moreno M, Rosales R, Salazar-Schetrino PM, Gorla D 2005. Antennal phenotype of *Triatoma dimidiata* populations and its relationship with species of phyllosoma and protracta complexes. *J Med Entomol* 42: 719-725.
20. Catalá S, Schofield C 1994. Antennal sensilla of *Rhodnius*. *J Morphol* 219: 193-203.
21. Catalá SS, Maida DM, Caro-Riaño H, Jaramillo N, Moreno J 2004. Changes associated with laboratory rearing in antennal sensilla patterns of *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, and *Rhodnius pallescens* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 25-30.
22. Chapman R 1982. Chemoreception: the significance of receptors numbers. *Adv Insect Physiol* 16: 247-356.
23. Chapman RF 1998. The insects. Structure and function. 4th Edition. Cambridge University Press, Cambridge, 770 pp.
24. Costa J, Bart OM, Marchon-Silva V, de Almeida CE, Freitas-Sibajev MGA, Panzera F 1997. Morphological studies on the *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) genital structures and eggs of different chromatic forms. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92: 493-498.

25. Costa J, Felix M 2007. *Triatoma juazeirensis* sp. nov. from the state of Bahia, Northeastern Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 87-90.
26. Costa JM, Jurberg J, Barth MO 1991. Estudos morfológicos de *Cavernicola lenti* Barreto & Arias, 1985 (Hemiptera: Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86: 247-263.
27. Dujardin JP, Costa J, Bustamante D, Jaramillo N, Catalá S 2009. Deciphering morphology in Triatominae: the evolutionary signals. *Acta Trop* 110: 101-111.
28. Esteban L, Angulo VM, Feliciangeli MD, Catalá S 2005. Analysis of antennal sensilla patterns of *Rhodnius prolixus* from Colombia and Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 909-914.
29. Felsenstein J 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
30. Fitzpatrick S, Feliciangeli MD, Sanchez-Martin MJ, Monteiro FA, Miles MA 2008. Molecular Genetics Reveal That Silvatic *Rhodnius prolixus* Do Colonise. Rural Houses. *PLoS Negl Trop Dis* 2 (4): e210. doi:10.1371/journal.pntd.0000210
31. Forattini OP, Barata JMS 1974. Nota sobre a diferenciação de ovos de *Rhodnius neglectus* e *R. prolixus*. *Rev Saude Publica* 8: 444 - 450.
32. Galliard H 1935. Recherches sur les Réduvidés Hématophages *Rhodnius* et *Triatoma*. V. Morphologie de l'ouef des Triatomes. *Ann Parasitol Hum Comp* 13: 511-527.
33. Galvão C, Angulo VM 2006. *Belminus corredori*, a new species of Bolboderini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from Santander, Colombia. *Zootaxa* 1241: 61-68.
34. Garcia BA, Powell JR 1998. Phylogeny of species of *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae) based on mitochondrial DNA sequences. *J Med Entomol* 35: 232-238.
35. González G, Aldana E, Lizano E, López G 2009. Arreglo de los polígonos del exocorion de huevos eclosionados de algunas especies de los géneros *Triatoma* Laporte, *Meccus* Stål y *Nesotriatoma* Usinger (Heteroptera: Reduviidae). *EntomoBrasilis* 2: 76-79.
36. Gracco M, Catalá S 2000. Inter-specific and developmental differences on the array of antennal chemoreceptors in four species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 295: 67-74.
37. Guerenstein PG, Lazzari CR 2008. Host-seeking: How triatomines acquire and make use of information to find blood. *Acta Trop* 110: 148-158.

38. Gumiel M, Catalá S, Noireau F, Rojas de Arias A, García A, Dujardin JP 2003. Wing geometry in *Triatoma infestans* (Klug) and *T. melanosoma* Martinez, Olmedo & Caracavallo (Hemiptera: Reduviidae). *Syst Entomol* 28: 173-179.
39. Haridass ET 1986. Ultrastructure of the eggs of Reduviidae: III. Eggs of Triatominae and Echtrichodiinae (Insecta-Heteroptera). *Proc Indian Acad Sci* 95: 447-456.
40. Hernández L, Abraham L, Moreno M, Gorla D, Catalá S 2008. Phenotypic variability associated to genomic changes in the main vector of Chagas disease in the southern cone of South America. *Acta Trop* 106: 60-67.
41. Hinton H (1981). Biology of insect eggs. Pergamon Press, New York, 1125 pp.
42. Insausti, TC, Lazzari CR, Campanucci VA 1999. Neurobiology of behaviour: morphology of the nervous system and sense organs. In Carcavallo RU, Galindez-Girón I, Jurberg J, Lent H. Atlas of Chagas' Disease. Vectors in America. Vol III. Fiocruz, Rio de Janeiro, pp. 1017-1051.
43. Jurberg J, Fagundes LM, Barth OM 1993. Estudo morfológico de ovos e ninfas de *Dipetalogaster maxima* (Uhler, 1894) (Hemiptera, Triatominae). *Rev Bras Biol* 53: 269-283.
44. Justi SA, Noireau F, Cortez MR, Monteiro FA 2010. Infestation of peridomestic Attalea phalerata palms by *Rhodnius stali*, a vector of *Trypanosoma cruzi* in the Alto Beni, Bolivia. *Trop Med Int Health* 15: 727-732.
45. Lent H, Jurberg J. A genitália externa na tribu Bolboderini (Hemiptera: Reduviidae Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 79: 1-27.
46. Lent H, Wygodzinsky P 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. *Bull Am Mus Nat Hist* 163: 123-520.
47. Lizaraso Y 1957. Estudio morfológico de los huevos de algunos triatominos hallados en el Perú (Reduviidae, Hemiptera). *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 11: 51-69.
48. Lyman DE, Monteiro FA, Escalante AA, Cordon-Rosales C, Wesson DM, Dujardin, JP Beard C 1999. Mitochondrial DNA sequence variation among triatomine vectors of Chagas disease. *Am J Trop Med Hyg* 60: 377-386.
49. Ma PW, Baird S, Ramaswamy SB 2002. Morphology and formation of the eggshell in the tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Palisot de Beauvois) (Hemiptera: Miridae). *Arthropod Struct Dev* 31: 131-146.

50. Mas-Coma S, M.D. Bargues 2009. Populations, hybrids and the systematic concepts of species and subspecies in Chagas disease triatomine vectors inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA. *Acta Trop* 110: 112-136.
51. Matesco VC, Furstenau BRJ, Bernardes JC, Schwertner CF, Grazia J 2009. Morphological features of the eggs of Pentatomidae (Hemiptera: Heteroptera). *Zootaxa* 1984: 1-30.
52. McIver SB 1982. Sensilla mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 19: 489-535.
53. McIver SB 1987. Sensilla of haematophagous insects sensitive to vertebrate host-associated stimuli. *Insect Sci Appl* 8: 627-63.
54. McIver SB, Siemicki R 1984. Fine structure of antennal mechanosensilla of adult *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae). *J Morphol* 180: 19-28.
55. McIver SB, Siemicki R 1985. Fine structure of antennal putative thermohygrosensilla of adult *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae). *J Morphol* 183: 15-23.
56. Monteiro F, Marcet P, Dorn P 2010. Population Genetics of Triatomines. En Telleria J, Tibayrenc M, American Tripanosomiasis Chagas Disease. One Hundred Years of Research. En Elsevier, London, p 848.
57. Monteiro FA, Donnelly MJ, Beard CB, Costa J 2004. Nested clade and phylogeographic analyses of the Chagas disease vector *Triatoma brasiliensis* in northeast Brazil. *Mol Phylogenet Evol* 32: 46-56.
58. Monteiro FA, Perez R, Panzera F, Dujardin JP, Galvão C, Rocha D, Noireau F, Schofield C, Beard C (1999). Mitochondrial DNA variation of *Triatoma infestans* populations and its implication on the specific status of *T. melanosoma*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 229-238
59. 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.
60. Moreno ML, Gorla D, Catalá S 2006. Association between antennal phenotype, wing polymorphism and sex in the genus *Mepraia* (Reduviidae: Triatominae). *Infect Genet Evol* 6: 228-234.
61. Obara MT, Barata JM, da Silva NN, Ceretti, WJr, Urbinatti PR, da Rosa JA, Jurberg J, Galvão C 2007b. Morphologic, morphometrical, and histological aspects of the eggs of four species of the genera *Meccus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 13-19.

62. Obara MT, da Rosa JÁ, da Silva NN, Ceretti WJr, Urbinatti PR, Barata, JM, Jurberg J, Galvão C (2007a). Morphological and histological study of eggs of six species of the *Triatoma* genus (Hemiptera: Reduviidae). *Neotropical Entomol* 36:798-806.
63. Otálora-Luna F, Perret JL, Guerin PM 2004. Appetence behaviours of the triatomine bug *Rhodnius prolixus* on a servosphere in response to the host metabolites carbon dioxide and ammonia. *J Comp Physiol* 190: 847-854.
64. Páez-Colasante X, Aldana E 2008. Morfometría geométrica del borde corial y del collar de huevos de cinco especies del género *Rhodnius* Stål (Heteroptera, Reduviidae, Triatominae). *EntomoBrasilis* 1: 57-61.
65. Patterson JS, Gaunt MW 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.
66. Piccinali RV, Marcet PL, Noireau F, Kitron U, Gurtler RE, Dotson EM 2009. Molecular population genetics and phylogeography of the Chagas disease vector *Triatoma infestans* in South America. *J Med Entomol* 46: 796-809.
67. Pinto C (1924). Biología do *Triatoma brasiliensis* Neiva. *Sci Med* 2: 541- 543.
68. Rosa JA, Barata JM, Santos JL, Cilense M 2000. Morphology of the eggs of *Triatoma circummaculata* and *Triatoma rubrovaria* (Hemiptera, Reduviidae). *Rev Saude Publica* 34 538-542.
69. Rosa JA, Justino HH, Barata JM 2003. Differences in the size of eggshells among three *Panstrongylus megistus* colonies. *Rev Saude Publica* 37: 528-30.
70. Sandoval CM, Joya MI, Gutierrez R, Angulo VM 2000. Cleptohaematophagy of the Triatomine bug *Belminus herreri*. *Med Vet Entomol* 14: 100-101.
71. Sandoval CM, Duarte R, Gutiérrez R, Rocha Dda S, Angulo VM, Esteban L, Reyes M, Jurberg J, Galvão C 2004. Feeding sources and natural infection of *Belminus herreri* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) from dwellings in Cesar, Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 137-140.
72. Sandoval CM, Ortiz N, Jaimes D, Lorosa E, Galvão C, Rodriguez O, Scorza JV, Gutiérrez R 2010. Feeding behaviour of *Belminus ferroae* (Hemiptera: Reduviidae), a predaceous Triatominae colonizing rural houses in Norte de Santander, Colombia. *Med Vet Entomol* 24: 124-131

73. Sandoval CM, Pabón E, Jurberg J, Galvão C 2007. *Belminus ferroae* n. sp. from the Colombian north-east, with a key to the species of the genus (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Zootaxa* 1443: 55-64.
74. Santos CM, Jurberg J, Galvão C, Rosa JA, Júnior WC, Barata JM. & Obara MT 2009. Comparative descriptions of eggs from three species of *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 1012-1018.
75. Schneider D 1964. Insect Antennae. *Annu Rev Entomol* 9: 103-122.
76. Schofield CJ, Galvão C 2009. Classification, evolution, and species group within the Triatominae. *Acta Trop* 110: 88-100.
77. Schofield CJ, Lehane MJ, McEwan P, Catalá SS, Gorla DE 1991. Dispersive flight by *Triatoma sordida*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 85: 676-678.
78. Silva CCA, Capdeville G, Moraes MCB, Falcao R, Solino LF, Laumann R, Silva J P. Borges M 2010. Morphology, distribution and abundance of antennal sensilla in three stink bugs species (Hemiptera: Pentatomidae). *Micron* 41: 289-300.
79. Silva MB, Jurberg J, Barbosa H.S, Rocha Dda S, Carcavallo RU & Galvão C 2005. Comparative morphology of eggs and nymphs of *Triatoma vandae* Carcavallo, Jurberg, Rocha, Galvão, Noireau & Lent, 2002 and *Triatoma williamsi* Galvão, Souza & Lima, 1965. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 549-561.
80. Southwood TRE 1956. The structure of the eggs of the terrestrial heteroptera and its relationship to the classification of the group. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 108: 163-221.
81. Suludere Z, Candan S, Kalender Y 1999. Chorionic sculpturing in eggs of six species of *Eurydema* (Heteroptera: Pentatomidae): A scanning electron microscope investigation. *J Entomol Res Soc* 1: 27-56.
82. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* 28 (10): 2731-2739. doi: 10.1093/molbev/msr121.
83. Tuft PH 1950. The structure of the insect egg-shell in relation to the respiration of the embryo. *J Exp Biol* 26: 327-334
84. Villela MM, Catalá S, Jurberg J 2005. Patterns of antenal sensilia of *Panstrongylus megistus* from three Brazilian states. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 699-702.

85. Wigglesworth VB, Gillet JD 1934. The function of the antennae in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) and mechanism of orientation to the host. *J Exp Biol* 11: 20-139.
86. Zacharuk RY 1980. Function of insect chemosensilia *Ann Rev Entomol* 25: 27-47.
87. Zera AJ, Denno RF 1997. Physiology and ecology of dispersal polymorphism in insects. *Annu Rev Entomol* 44: 207-31.

www.bdigital.ula.ve

Capítulo V. ¿Son los *Belminus* un taxón válido de los Triatominae? Una aproximación a través de la reconstrucción filogenética de la subfamilia con dos marcadores moleculares (28SD2 y citocromo b).

1. Introducción

Las secuencias de ADN ribosomal (rADN) han sido útiles en el estudio de la sistemática de Reduviidae (Hwang & Weirauch, 2012) y de Triatominae (Monteiro et al. 2000, Marcilla et al. 2001, Patterson & Gaunt 2010). El cistron de rADN codifica para tres partes estructurales del ribosoma (18S, 5.8S y 28S). Cada una de estas unidades es separada por un espaciador transcrito (ETS) y este cistron presenta cerca de 100 copias por genoma nuclear, lo cual lo hace un buen blanco para la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Independientemente de las mutaciones que puedan originarse en las diferentes copias, este cistron tiende a homogenizarse a través de procesos conocidos como “evolución concertada” (Monteiro et al. 2010). Esto le da una uniformidad tal a los individuos de una población, que es suficiente con obtener la secuencia de uno solo para caracterizar una población local, pero los hace poco atractivos para ser utilizados en análisis interpopulacionales, y está indicado su uso para el análisis en los niveles altos como géneros, tribus y subfamilias (Mas-Coma & Bargues 2009).

El citocromo b ha sido utilizado también para resolver la filogenia de Triatominae (Patterson & Gaunt, 2010), sin embargo, es un marcador más adecuado para tratar los relacionamientos de los niveles bajos, como especies, subespecies y poblaciones, debido a su elevada tasa evolutiva (Monteiro et al. 2010, Bargues et al. 2010). En las reconstrucciones filogenéticas de niveles altos, puede ser utilizado como información complementaria a la obtenida con marcadores nucleares (Mas-Coma & Bargues 2009).

El presente trabajo está específicamente enfocado en resolver si el género *Belminus* puede ser considerado o no un taxón válido de los Triatominae. Para dar respuesta a ese interrogante taxonómico, debemos plantearnos a la luz de las reconstrucciones filogenéticas más robustas, cuáles serían los grupos externos a Triatominae que van a ser considerados como grupos hermanos.

En este sentido, se asume a los géneros *Zelurus* y *Opisthacidius* como los clados filogenéticamente más relacionados a Triatominae, y a los clados de la subfamilia Stenopodinae y Vesciinae como los inmediatamente más cercanos a éstos. Esta hipótesis de relacionamiento fue en parte propuesta por Weirauch & Munro (2009) y desarrollada completamente por Hwang & Weirauch (2012), este último trabajo descansa sobre un muestreo robusto de 178 taxones de Reduviidae y cinco loci que abarcaron aproximadamente 4800 caracteres. La topología para Triatominae presentó un alto soporte estadístico por el método de máxima verosimilitud.

2. Objetivo general

Analizar a través de una reconstrucción filogenética de los Triatominae, si el género *Belminus* es un taxón válido de esta subfamilia.

3. Objetivos específicos

3.1 Obtener secuencias de ADN de la subunidad ribosomal 28SD2 en tres especies del género *Belminus*.

3.2 Realizar una reconstrucción filogenética de la subfamilia Triatominae con el locus 28SD2 por el método de máxima verosimilitud.

3.3 Realizar una reconstrucción filogenética de la subfamilia Triatominae con el citocromo b por el método de máxima verosimilitud.

4 Materiales y Métodos

4.1 Material biológico utilizado para la obtención de las secuencias de ADN de la subunidad ribosomal 28SD2

Se utilizaron especímenes de *B. ferroae* que provienen de capturas realizadas dentro de los domicilios de las localidades de Santa Catalina y San Alberto del municipio de Toledo en Norte de Santander, Colombia (Sandoval et al. 2010). Para la especie *B. herreri*, se incluyeron especímenes provenientes de dos colonias de diferente origen. Una colonia fue establecida de especímenes capturados en el peridomicilio del municipio El Carmen, Santander, Colombia y la otra de especímenes capturados en domicilios del municipio de San Martín, Cesar, Colombia alimentadas

con *R. prolixus* (Sandoval et al. 2000, Sandoval et al. 2004). Los especímenes de *B. corredori* provienen de una colonia de insectos capturados dentro de una vivienda de la localidad de Puente Tierra en el municipio de San Gil en Santander, Colombia (Galvão & Angulo 2006).

Las secuencias de citocromo b pertenecientes al género *Belminus* se seleccionaron a partir de las secuencias analizadas en el capítulo IV de esta tesis.

4.2 Extracción ADN

Los insectos se preservaron en alcohol absoluto, antes de iniciar el procedimiento de extracción de ADN, cada espécimen se secó con una toalla de papel, y dos de sus patas se removieron con pinzas y se introdujeron en un vial Eppendorf de 1 ml. Posteriormente, fueron criofracturadas con nitrógeno líquido y utilizando un macerador manual. Para la extracción del ADN se utilizó el protocolo para tejidos del kit Genomic ADN Extraction de Real Genomics®.

4.3 Amplificación ADN por reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR se realizó en un volumen final de reacción de 25 µl que contenía (1,25 unidades) de taq polimerasa, 5 µl dNTPS (100 mM Tris ·HCl, pH 8,3, 500 mM KCl)), 6 µl MgCl₂ (50mM), 2 µl de cada primer (10pM) y 3µl de ADN. La pareja de primers utilizada diseñada por Monteiro et al. (2000), fue: 28S-D2-R TTG GTC CGT GTT TCA AGA CGG G y 28S D2-F GCG AGT CGT GTT GCT TGA TAG TGC AG

El protocolo seguido para la reacción fue el siguiente: desnaturalización 94°C por 5 minutos; 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, anillamiento a 65°C por 30 segundos, y extensión a 72°C por 45 segundos, seguido por 72°C de extensión por 10 minutos y a 4°C indefinidamente.

Para la visualización de los productos amplificados se utilizaron geles del agarosa al 1% (Ultrapure Invitrogen) en Buffer TBE 0,5X. El sembrado de las muestras se realizó con el buffer de carga 10 x Blue Juice Invitrogen, diluido 1:1 en agua ultra pura y 5 µl de ADN amplificado. Para la coloración de los geles se utilizó una solución de GelRed ® que contenía: 20 ml NaCl 1M, 90 ml de agua destilada y 30 µl de GelRed®. El tiempo de coloración osciló entre 10 y 15 minutos, y los geles se visualizaron en un iluminador de UV (Figura 36).

4.4 Purificación del ADN

Para la purificación de los productos amplificados, se siguió el protocolo del kit Hiyield™ Gel/PCR ADN Extraction de Real Genomics®. El sobrenadante se almacenó a -20°C hasta su secuenciamiento.

4.5 Secuenciamiento de ADN

Los productos amplificados y purificados se examinaron por un secuenciador ABI Prism Dye Terminator. Los oligonucleótidos utilizados fueron los mismos que se usaron para la reacción de amplificación.



Figura 36. Fotografía de un gel de agarosa mostrando la amplificación de un fragmento de aproximadamente 640pb de 28SD2. M = marcador molecular, Ct+ = control positivo *R. prolixus*, Ct- = control negativo, Pozo 1-6 Bf = muestras de *B. ferroae*, Pozo 7-9 = muestras de *B. herreri*, Pozo 10-11 muestras de *B. corredori*.

4.6 Edición de las secuencias de ADN de la subunidad ribosomal 28SD2

Para cada espécimen de *Belminus* se estableció una secuencia consenso a partir de los cromatogramas obtenidos por las secuencias anversa y reversa. Cuando fue necesaria alguna

edición, ésta se ejecutó con el programa SeqMan II (DNASTAR Inc., Madison, WI). Las secuencias obtenidas para las especies de *Belminus* fueron cotejadas en el genbank para confirmar su identidad a través del algoritmo de BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

4.6 Alineamiento de las secuencias ADN de la subunidad ribosomal 28SD2 y Citocromo b

Las secuencias de *Belminus* y las demás secuencias de Triatominae y de las otras subfamilias de Reduviidae extraídas del genbank o cedidas por FIOCRUZ (Tabla 24), se alinearon con el algoritmo KALIGN en línea (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/>) para el marcador 28SD2 y el citocromo b. El número de caracteres utilizados en las reconstrucciones filogenéticas fue 810 pb para 28SD2 y para citocromo b de 720 pb. Sin embargo, dada la heterogeneidad en la longitud de las secuencias para citocromo b, un segundo alineamiento fue realizado usando el algoritmo de MUSCLE en línea a través del portal (<http://www.phylogeny.fr/>), y se usó el parámetro de “curado de bloques”, de esta manera se obtuvo un alineamiento con 352 pb para el citocromo b. Las matrices producto de los alineamientos fueron exportadas en el formato phylm.

4.7 Análisis filogenéticos utilizando el marcador 28SD2 y el citocromo b

La filogenia de Triatominae con el marcador 28SD2 y el citocromo b se reconstruyó por separado, y utilizando el programa PALM (Phylogenetic Analysis by Maximum Likelihood) (Guindon & Gascuel 2003), el cual selecciona el modelo de sustitución nucleotídico utilizando el programa jModeltest (Posada 2008). El modelo seleccionado para ejecutar ambas reconstrucciones filogenéticas (28SD2 y el citocromo b), fue el modelo general reversible en el tiempo, en inglés (*General Time Reversible, GTR*), con la distribución gamma para estimar el parámetro alfa (α), esto es el modelo (GTR+G). Se ejecutaron 1000 bootstrap para estimar los valores de soporte de las ramas (Felsenstein 1985). Además, para las reconstrucciones filogenéticas con el marcador mitocondrial (citocromo b), se exploró la exclusión del tercer codón como sugerido por Mas-Coma & Bargues (2009), para el análisis en los niveles altos, pero la topología resultante fue la misma que cuando se utilizó la información de los tres codones y los valores de bootstrap fueron similares. Los árboles filogenéticos recuperados por el citocromo b con la metodología anteriormente descrita

presentaron valores muy bajos de bootstrap. Por eso, se optó por una nueva estrategia para la reconstrucción con un curado en el alineamiento y el modelo de substitución nucleotídica HKY85 (Hasegawa-Kishino-Yano, 1985) y se ejecutó en el programa PHYLIM 3.0 en el portal (<http://www.phylogeny.fr/>) con 100 bootstrap. En este análisis se recuperó la misma topología que en los anteriores, pero con altos valores de bootstrap (>80% para Triatominae, Figura 38). Los árboles de máxima verosimilitud se identificaron a través de una búsqueda heurística usando el método NNIs (nearest neighbor interchanges).

5 Resultados

Los resultados y la discusión se apoyaron casi exclusivamente en la reconstrucción filogenética del locus 28SD2, y la filogenia del citocromo se tuvo en cuenta como dato complementario. Esto al considerar el bajo muestreo de los taxones para el marcador mitocondrial, respecto al logrado para 28SD2. Un total de 49 secuencias, 16 secuencias de grupos externos y 33 secuencias de los géneros *Triatoma*, *Rhodnius*, *Psammolestes*, *Mepraia* y *Belminus*. Las especies de los géneros *Dipetalogaster*, *Eratyrus*, *Panstrongylus*, *Cavernicola* y *Microtriatoma* no cuentan con representantes en la filogenia de la subfamilia con el citocromo b.

La reconstrucción filogenética obtenida en este estudio por el método de máxima verosimilitud entre los reduvidos de las subfamilias Vesciinae, Stenopodinae, Reduviinae (*Zelurus* y *Opisthacidius*), y Triatominae se presenta en la Figura 37. Un total de sesenta y seis secuencias de 28SD2 se analizaron en este estudio, las cuales representan 44 taxones de Triatominae pertenecientes a los géneros: *Rhodnius*, *Psammolestes*, *Cavernicola*, *Microtriatoma*, *Belminus*, *Eratyrus*, *Panstrongylus*, *Triatoma*, *Paratriatoma*, *Mepraia*, *Linshcosteus* y *Dipetalogaster*. Una secuencia de Vesciinae, 7 de Stenopodinae y 8 de Reduviinae. Los resultados de mayor relevancia son la ubicación del género *Belminus* dentro del clado de los Triatominae + *Opisthacidius*. Los *Belminus* más relacionados a Triatomini que a Rhodniini. Los Rhodniini como grupo hermano de Cavernicolini+*Microtriatoma*, y por lo tanto, en esta reconstrucción no se recupera la tribu Bolboderini.

La reconstrucción filogenética del citocromo b también muestra a los *Belminus* más relacionados con la tribu Triatomini que con Rhodniini (Figura 38).

Tabla 24. Fuente y números de acceso a las secuencias de 28SD2 y Citocromo b utilizadas en este estudio.

Subfamilia	Tribu	Genero	Especie	Fuente	28S-D2	Cytb
Harpactorinae		<i>Sphedanolestes</i>	<i>impressicollis</i>	Genbank		EU286549
Harpactorinae		<i>Rhynocoris</i>	<i>altaicus</i>	Genbank		EU286540
Harpactorinae		<i>Coranus</i>	<i>lativentris</i>	Genbank		EU128710
Harpactorinae		<i>Manicocoris</i>	<i>rufipes</i>	Genbank		JQ942358
Harpactorinae		<i>Harpactorinae</i>	<i>sp</i>	Genbank		GQ869676
Harpactorinae		<i>Calliclopius</i>	<i>nigripes</i>	Genbank		JQ942356
Reduviinae		<i>Platymenis</i>	<i>biguttata</i>	Genbank		GQ869678
Harpactorinae		<i>Apiomerus</i>	<i>venosus</i>	Genbank		JQ942340
Harpactorinae		<i>Heniarthes</i>	<i>putumayo</i>	Genbank		JQ942337
Harpactorinae		<i>Agriosphodrus</i>	<i>dohrni</i>	Genbank		JN089551
Harpactorinae		<i>Cydnocoris</i>	<i>russatus</i>	Genbank		EU128718
Harpactorinae		<i>Sycanus</i>	<i>croceovittatus</i>	Genbank		JN089568
Vesitinae		<i>Mirambulus</i>	<i>niger</i>	Genbank	JQ897645	
Stenopodinae		<i>Stenopoda</i>	<i>cinerea</i>	Genbank		GQ869681
Stenopodinae		<i>Stenopodessa</i>	<i>sp</i>	Genbank	FJ230611	
Stenopodinae		<i>Stenopoda</i>	<i>sp</i>	Genbank	FJ230574	
Stenopodinae		<i>Ctenotrachelus</i>	<i>sp</i>	Genbank	FJ230575	
Stenopodinae		<i>Sastrapada</i>		Genbank	FJ230583	
Stenopodinae		<i>Gageus</i>	<i>micropterus</i>	Genbank	FJ230606	
Stenopodinae		<i>Oncoccephalus</i>	<i>sp</i>	Genbank	FJ230562	
Stenopodinae		<i>Canthesancus</i>	<i>sp</i>	Genbank	JQ897624	
Reduviinae		<i>Leogorrus</i>	<i>sp</i>	Genbank		GQ869680
Reduviinae		<i>Zelurus</i>	<i>alcides</i>	Genbank	JQ897771	
Reduviinae		<i>Zelurus</i>	<i>sp</i>	Genbank	JQ897688	
Reduviinae		<i>Zelurus</i>	<i>pinto</i>	Genbank	JQ897687	
Reduviinae		<i>Zelurus</i>	<i>petax</i>	Genbank	FJ230653	
Reduviinae		<i>Zelurus</i>	<i>sp</i>	Genbank	FJ230572	GQ869679
Reduviinae		<i>Opisthacidius</i>	<i>mexicanus</i>	Genbank	JQ897653	
Reduviinae		<i>Opisthacidius</i>	<i>chinai</i>	Genbank	JQ897652	
Reduviinae		<i>Opisthacidius</i>	<i>sp</i>	Genbank	JQ897654	GQ869674
Triatominae	Rhodniini	<i>Rhodnius</i>	<i>pictipes</i>	Genbank	JQ897671	AF045713
Triatominae	Rhodniini	<i>Rhodnius</i>	<i>brethesi</i>	FIOCRUIZ	+	AF045714
Triatominae	Rhodniini	<i>Rhodnius</i>	<i>ecuadoriensis</i>	FIOCRUIZ	+	AF045715
Triatominae	Rhodniini	<i>Rhodnius</i>	<i>pallescens</i>	FIOCRUIZ	+	EF071584

Triatominae	Rhodniini	<i>Rhodnius</i>	<i>colombiensis</i>	FIOCRUZ	+	
Triatominae	Rhodniini	<i>Rhodnius</i>	<i>nasutus</i>	Genbank	AF435856	
Triatominae	Rhodniini	<i>Rhodnius</i>	<i>stali</i>	Genbank		FJ887791
Triatominae	Rhodniini	<i>Psammolestes</i>	<i>coreodes</i>	Genbank	AF045719	
Triatominae	Rhodniini	<i>Rhodnius</i>	<i>domesticus</i>	FIOCRUZ	+	
Triatominae	Rhodniini	<i>Rhodnius</i>	<i>neivai</i>	FIOCRUZ	+	
Triatominae	Rhodniini	<i>Rhodnius</i>	<i>neglectus</i>	Genbank	JQ897670	AF045716
Triatominae	Rhodniini	<i>Rhodnius</i>	<i>robustus</i>	Genbank	AF435859	EF011720
Triatominae	Rhodniini	<i>Rhodnius</i>	<i>prolixus</i>	Genbank	AF435860	AF421339, EF011716
Triatominae	Rhodniini	<i>Psammolestes</i>	<i>arthuri</i>	Genbank	GQ853380	
Triatominae	Rhodniini	<i>Psammolestes</i>	<i>arthuri</i>	FIOCRUZ	+	
Triatominae	Rhodniini	<i>Psammolestes</i>	<i>tertius</i>	FIOCRUZ	+	
Triatominae	Cavernicolini	<i>Cavernicola</i>	<i>pilosa</i>	Genbank	JQ897671	
Triatominae	Triatomini	<i>Mepraia</i>	<i>gajardoi</i>	Genbank		JN102359
Triatominae	Triatomini	<i>Mepraia</i>	<i>spinolai</i>	FIOCRUZ	+	JN102358
Triatominae	Triatomini	<i>Triatoma</i>	<i>gerstaeckeri</i>	FIOCRUZ	+	
Triatominae	Triatomini	<i>Triatoma</i>	<i>dimidiata</i>	Genbank	JQ897679	AY062161
Triatominae	Triatomini	<i>Triatoma</i>	<i>recurva</i>	Genbank	FJ230577	DQ198813
Triatominae	Triatomini	<i>Triatoma</i>	<i>pallidipennis</i>	FIOCRUZ	+	DQ198814
Triatominae	Triatomini	<i>Triatoma</i>	<i>longipennis</i>	FIOCRUZ	+	DQ198815
Triatominae	Triatomini	<i>Triatoma</i>	<i>sanguisuga</i>	Genbank	GQ853392	HQ141313
Triatominae	Triatomini	<i>Triatoma</i>	<i>rubida</i>	Genbank	GQ853391	DQ198811
Triatominae	Triatomini	<i>Triatoma</i>	<i>protracta</i>	Genbank	FJ230603	AF045727
Triatominae	Triatomini	<i>Triatoma</i>	<i>lecticularia</i>	Genbank	GQ853378	
Triatominae	Triatomini	<i>Triatoma</i>	<i>rubrofasciata</i>	Genbank	GQ853371	
Triatominae	Triatomini	<i>Triatoma</i>	<i>venosa</i>	Genbank	JQ897681	
Triatominae	Triatomini	<i>Triatoma</i>	<i>brasiliensis</i>	Genbank	GQ853395	AY494170
Triatominae	Triatomini	<i>Triatoma</i>	<i>infestans</i>	FIOCRUZ	+	EF639038
Triatominae	Triatomini	<i>Triatoma</i>	<i>delpontei</i>	FIOCRUZ	+	
Triatominae	Triatomini	<i>Triatoma</i>	<i>nitida</i>	Genbank		AF045723
Triatominae	Triatomini	<i>Triatoma</i>	<i>phyllosoma</i>	Genbank		DQ198818
Triatominae	Triatomini	<i>Triatoma</i>	<i>eratyrusiformis</i>	Genbank		JN102360
Triatominae	Triatomini	<i>Triatoma</i>	<i>picturata</i>	Genbank		DQ198817
Triatominae	Triatomini	<i>Triatoma</i>	<i>mazzotti</i>	Genbank		DQ198816
Triatominae	Triatomini	<i>Triatoma</i>	<i>costalimai</i>	FIOCRUZ	+	
Triatominae	Triatomini	<i>Triatoma</i>	<i>platensis</i>	Genbank	GQ853399	
Triatominae	Triatomini	<i>Triatoma</i>	<i>matogrossensis</i>	Genbank	GQ853398	

Triatominae	Triatomini	<i>Triatoma</i>	<i>guazu</i>	FIOCRUZ	+	
Triatominae	Triatomini	<i>Triatoma</i>	<i>breyeri</i>	Genbank		JN102361
Triatominae	Bolboderini	<i>Microtriatoma</i>	<i>trinidadensis</i>	Genbank y FIOCRUZ	GQ853379	
Triatominae	Bolboderini	<i>Belminus</i>	<i>ferroae</i>	SA, To, NS, Colombia	*	*
Triatominae	Bolboderini	<i>Belminus</i>	<i>ferroae</i>	SC, To, NS, Colombia	*	*
Triatominae	Bolboderini	<i>Belminus</i>	<i>herrerii</i>	SM, Cesar, Colombia	*	*
Triatominae	Bolboderini	<i>Belminus</i>	<i>herrerii</i>	EC, Santander, Colombia	*	*
Triatominae	Bolboderini	<i>Belminus</i>	<i>corredori</i>	SG, Santander, Colombia	*	*
Triatominae	Bolboderini	<i>Belminus</i>	<i>herrerii</i>	EC, Santander, Colombia	*	*
Triatominae	Triatomini	<i>Dipetalogaster</i>	<i>maxima</i>	FIOCRUZ	+	
Triatominae	Triatomini	<i>Paratriatoma</i>	<i>hirsuta</i>	Genbank	FJ230604	
Triatominae	Triatomini	<i>Panstrongylus</i>	<i>geniculatus</i>	Genbank	JQ897657	
Triatominae	Triatomini	<i>Panstrongylus</i>	<i>lignarius</i>	Genbank	JQ897656	
Triatominae	Triatomini	<i>Panstrongylus</i>	<i>megistus</i>	Genbank	GQ853381	
Triatominae	Triatomini	<i>Eratyrus</i>	<i>mucronatus</i>	Genbank	JQ897635	
Triatominae	Triatomini	<i>Eratyrus</i>	<i>mucronatus</i>	FIOCRUZ	+	
Triatominae	Triatomini	<i>Linshcosteus</i>	<i>karupus</i>	Genbank	GQ853372	

+ Secuencias sin publicar cedidas por Fernando Araujo Monteiro. Departamento de Medicina Tropical, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil.

*Secuencias obtenidas durante este estudio en la pasantía realizada en El Departamento de Medicina Tropical, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil.

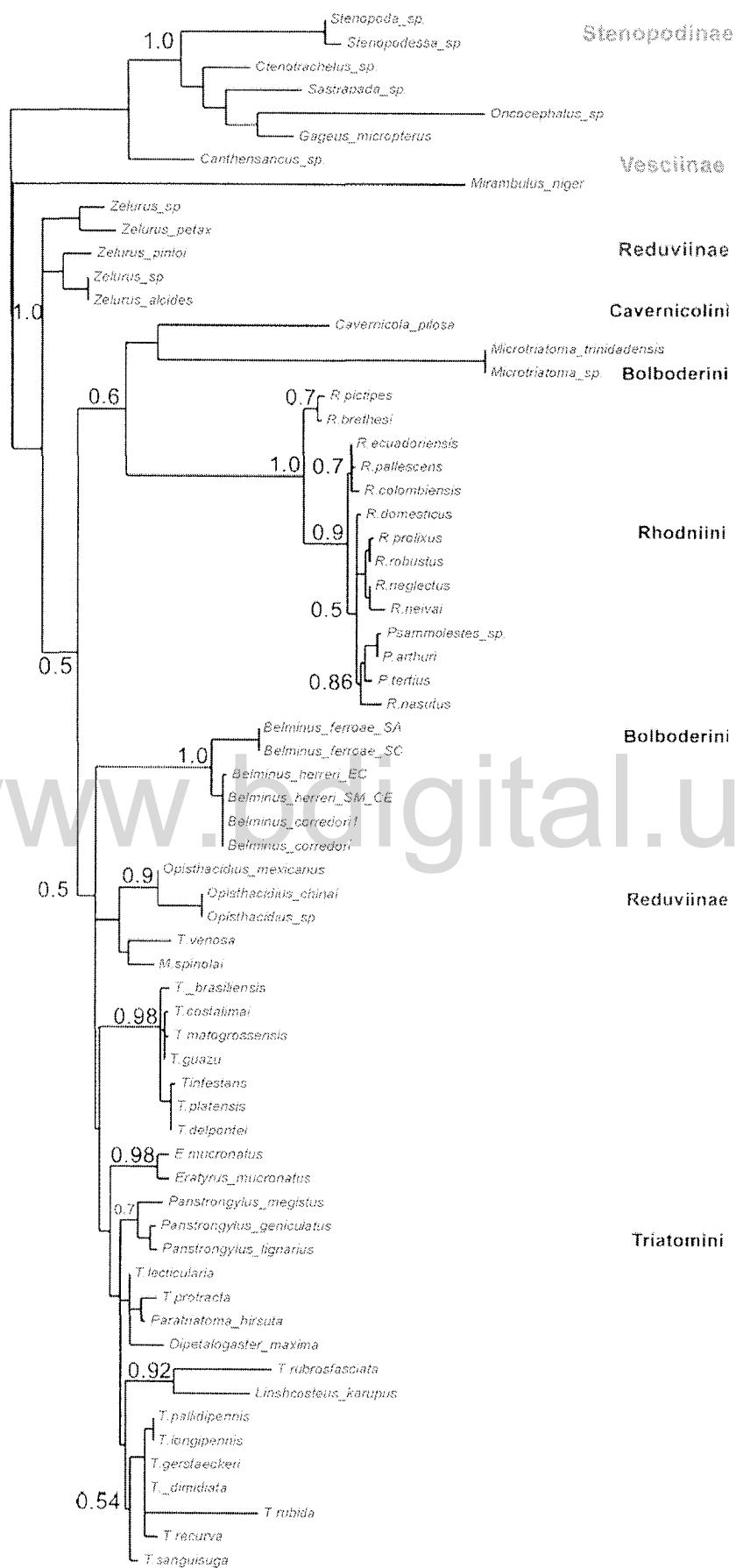


Figura 38. Filogenia de la subfamilia Triatominae con el marcador nuclear 28SD2 por el método de máxima verosimilitud (LN-5668,3926) y

1000 bootstrap.

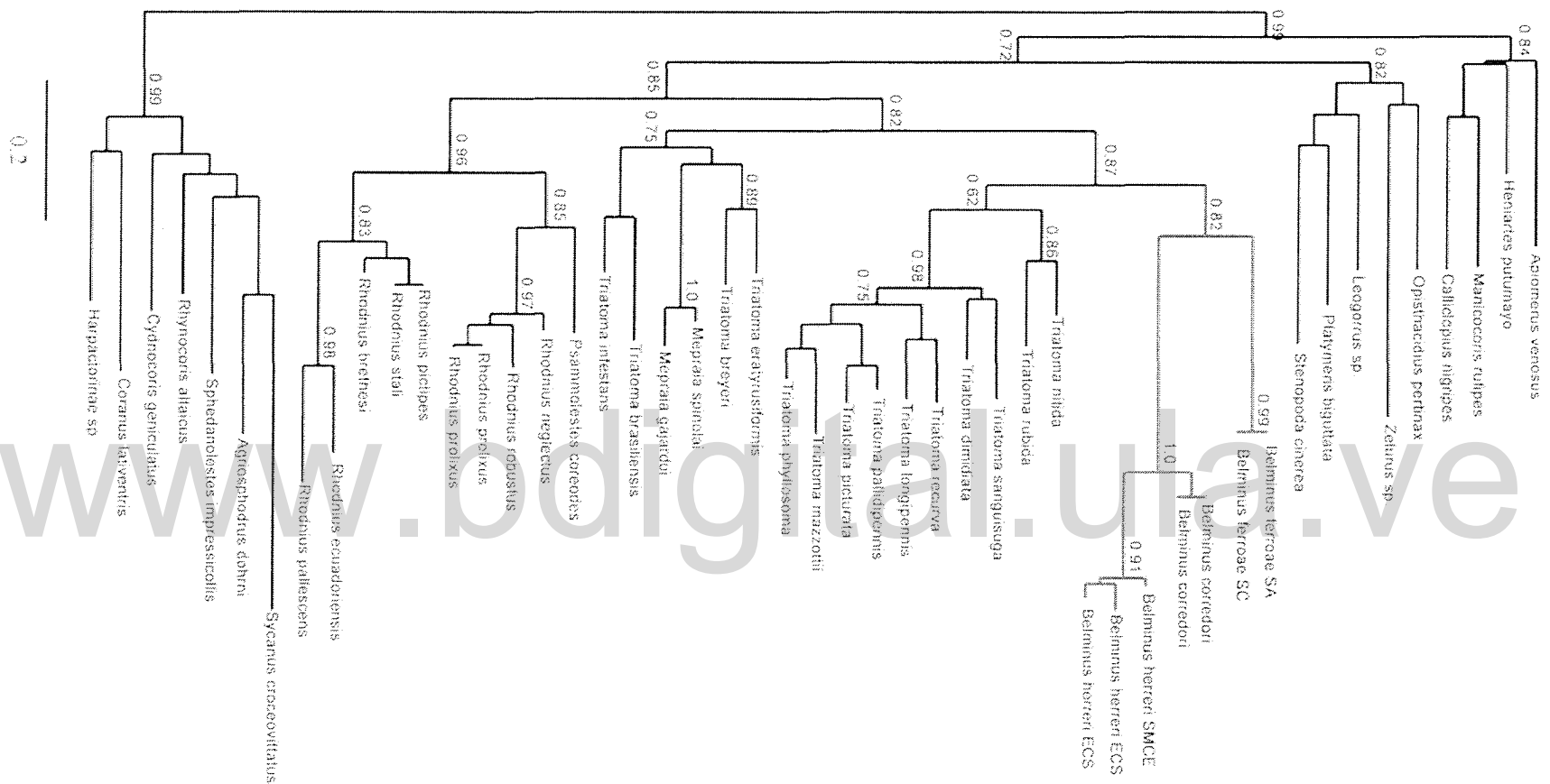


Figura 40. Filogenia de la subfamilia Triatominae con el citocromo b, obtenida por el método de máxima verosimilitud (LN= -6077.41525) bajo el modelo HKY85 y 100 bootstrap

6 Discusión

Es importante mencionar que el objetivo de este estudio no es resolver la filogenia de Triatominae, aún cuando fue necesario recurrir a su reconstrucción. Para lograrlo seleccionamos las filogenias publicadas, que a criterio nuestro podrían considerarse como las más robustas, esto al examinar la calidad del muestreo y por el tipo de marcador utilizado en el nivel donde se pretendió hacer el análisis. Entonces, para decidir los taxones filogenéticamente más cercanos a Triatominae, se tomó como base la reconstrucción filogenética de los Reduviidae realizada por Hwang & Weirauch (2012). También se usó como criterio el análisis de la topología al interior de Triatominae de clados ya resueltos por previos autores con diversos marcadores moleculares (Lyman et al. 1999, Monteiro et al. 2000, Marcilla et al. 2001, Hypsa et al. 2002, Paula et al. 2005, Patterson & Gaunt 2010), con el propósito de procurar fundamento y coherencia de la topología recuperada en este estudio y proveer respaldo a la ubicación de nuestro clado problema los *Belminus*.

La reconstrucción filogenética presentada en este estudio y basada en un locus, la subunidad ribosomal 28SD2, es hasta el momento la filogenia de la subfamilia Triatominae con la mayor cobertura en representantes tribales, con cuatro de las cinco tribus reconocidas muestreadas (Rhodniini, Cavernicolini, Bolboderini y Triatomini).

El clado de las especies del género *Belminus* con un bootstrap de 100% se ubicó aparte de los Rhodniini + (Cavernicolini + *Microtriatoma*), y se mostró más relacionado con los *Opisthacidius* y los Triatomini, con un valor de bootstrap (50%).

Este resultado se constituye como la primera evidencia que señala que el género *Belminus* no es un grupo externo de Triatominae y que por lo tanto, su comportamiento alimentario, no sustenta la hipótesis de un estado temprano en evolución hacia la hematofagia.

La segunda implicación de este hallazgo, es que no recuperamos un Bolboderini monofilético como había sido propuesto por Usinger (1944) y Lent & Wygodzinsky (1979). Lo cual pone de manifiesto la necesidad de incluir los otros miembros de la tribu Bolboderini, como son las especies de los géneros *Bolbodera* y *Parabelminus* para validar o no ese ordenamiento tribal en nuevas reconstrucciones filogenéticas.

Otro de los aspectos sobresalientes de este estudio, es la indicación de Rhodniini como grupo hermano de Cavernicolini + *Microtriatoma* con un valor de bootstrap de 64%. Previos estudios recuperan parcialmente este clado en distintas filogenias, por ejemplo, Rhodniini + Cavernicolini (98% bootstrap) recuperado por Hwang & Weirauch (2012), y Rhodniini + *Microtriatoma* (100%

bootstrap) por Patterson & Gaunt (2010). Lo cual permite inferir que el clado Rhodniini + (Cavernicolini + *Microtriatoma*) encontrado en este estudio es consistente. Adicionalmente, consideramos que algunos caracteres morfológicos y funcionales de la fase de huevo dan soporte a este clado y permite separarlo de los clados *Belminus* y Triatomini. En el primer clado, esto es Rhodniini + (Cavernicolini + *Microtriatoma*), se agrupan especies con huevos que presenta un cuello nítido, en general de forma elipsoide, pero asimétricos, y las hembras los pegan fuertemente al substrato.

En los otros dos, tenemos a la mayoría de las especies de los géneros *Belminus*, *Dipetalogaster*, *Panstrongylus*, *Eratyrus*, *Mepraia* y *Triatoma*, con huevos sin cuello ni collar, elipsoides, y simétricos, el borde corial es continuo al plano del opérculo de la cáscara del huevo. Los huevos son puestos libremente, sin adhesión al substrato. Cuando las hembras de algunas especies de *Triatoma* pegan los huevos al substrato, en especies como *T. delpontei*, *T. lecticularia*, *T. platensis* y *T. protracta*, tenemos huevos con un borde corial no continuo al plano del opérculo de la cáscara del huevo. Esta analogía morfológica con los huevos de los géneros *Rhodnius* y *Psammolestes* probablemente se deba al hábito ornitófilo (Barata 1998).

Entonces, la homología funcional y morfológica observada por Barata (1998) en los huevos de Rhodniini y Cavernicolini y complementaríamos con la de los huevos de *Microtriatoma* (huevos que se fijan fuertemente al substrato, asimétricos, con collar nítido y un borde corial que se destaca del resto del cuerpo, descripción dada por Barata 1998), al lado de la nueva evidencia molecular, puede ayudar a sustentar las relaciones filogenéticas del clado.

En heteróptera la fase de huevo ha sido útil en la reconstrucción de relaciones filogenéticas (Southwood 1956, Cobben 1968, Hassan & Kitching 1993, Wheeler et al. 1993), y en la subfamilia Pentatomidae ha sido importante en el reconocimiento de tribus y subfamilias (Hassan & Kitching 1993, Matesco et al. 2009).

Desde el punto de vista ecológico, la mayoría de las especies de este clado son de hábitat arbóreo (*Rhodnius* y *Psammolestes*) con la excepción de las especies de la tribu Cavernicolini, de cuevas de murciélagos (Lent & Wygodzinsky, 1979). *Microtriatoma trinidadensis* se conoce asociado a palmas y es usual su presencia en huecos de árboles, escondido entre cavidades con ramas y especialmente en nidos de marsupiales (Lent & Wygodzinsky, 1979). De la Riva et al. (2001) lo encuentran en Bolivia, colonizando gallineros construidos con elementos de palma de la especie *Attalea phalerata*.

Con respecto a las topologías publicadas, es importante destacar que la topología obtenida en este estudio es congruente con la reconstrucción filogenética de los Reduviidae basada en el método de máxima verosimilitud publicada por Hwang & Weirauch (2012), donde se ubicó a la subfamilia Vesciinae y Stenopodinae, como los grupos más relacionados al clado de los *Zelurus* y con un alto valor de bootstrap 100%. El clado *Zelurus* como grupo hermano de (Triatominae + *Opisthacidius*), recuperando por lo tanto la parafilia de la subfamilia con un valor de bootstrap del 50%.

Al interior de Triatominae, se recupera un Rhodniini monofilético (100%) y la reconocida parafilia de *Rhodnius* con respecto a *Psammolestes*, previamente observada con marcadores mitocondriales (Lyman et al. 1999, Hypsa et al. 2002). En la topología de Rhodniini, se observan varios clados con alto soporte, el clado *R. pictipes* + *R. brethesi* de la región Amazónica y el clado andino *R. colombiensis* + *R. pallescens* + *R. ecuadoriensis*, ambos con 70% bootstrap y el clado compuesto por el grupo *prolixus* (*R. prolixus* + *R. robustus* + *R. neglectus*) junto con *R. neivai* con un 50% bootstrap. El grupo *prolixus* más relacionado al clado de los *Psammolestes* como observado por Lyman et al. (1999) y Monteiro et al. (2000).

En relación con Triatomini, no se recupera una tribu monofilética, lo cual contrasta con un Triatomini monofilético recuperado con alto valor de bootstrap (94%) por Hwang & Weirauch (2012) y Hypsa et al. (2002), con 61% por el método de máxima parsimonia. Sin embargo, es importante acotar que la filogenia de Hwang & Weirauch (2012) carece de muestras para los géneros *Belminus* y *Microtriatoma* y la de Hypsa et al. (2002), adicionalmente no incluye la tribu Cavernicolini, lo cual necesariamente incide en la topología. Las incongruencias obtenidas para Triatomini entre las diferentes reconstrucciones, simplemente advierte la necesidad de completar el muestreo para la ejecución de las nuevas reconstrucciones filogenéticas de la subfamilia.

Ahora bien, a pesar de la incompatibilidad presentada en la base del clado Triatomini (monofilética vs. parafilética), la topología al interior de Triatomini mostrada en este estudio es consonante con previas filogenias publicadas, por ejemplo, en la divergencia exhibida por los *Triatoma* del norte y los mesoamericanos con los *Triatoma* del Sur y la parafilia de este género respecto a *Dipetalogaster*, *Eratyrus* y *Panstrongylus* (Marcilla et al. 2001, Hypsa et al. 2002). También se destaca el alto valor de bootstrap (92%) para el clado de las especies con presencia en el viejo mundo *T. rubrofasciata* + *Linshcosteus* y su anidamiento dentro de esa tribu (Hypsa et al. 2002, Patterson & Gaunt 2010). No obstante, su posición es inestable como lo mencionan Hypsa et al. (2002), algunas veces se ubica

con los *Triatoma* de grupo *protracta*, y en otras con los *Triatoma* mesoamericanos (Paula et al. 2005), esta última ubicación fue recuperada en nuestro caso.

Finalmente, la reconstrucción filogenética obtenida con el citocromo b en este estudio, es congruente con la publicada para la subfamilia por Patterson & Gaunt (2010) con ese mismo marcador, donde se recupera un Triatominae monofilético, sin embargo, como se mencionó anteriormente, los marcadores mitocondriales no son los más indicados para el análisis de niveles altos (géneros, tribus y subfamilias), debido a su alta tasa de evolución, que tiende a recuperar clados monofiléticos (Mas-Coma & Bargues 2009).

Aún así, la topología obtenida por el citocromo b al interior de Triatominae es congruente con previas filogenias publicadas, donde se recupera un Rhodniini monofilético (Lyman et al. 1999, Monteiro et al. 2000, Hypsa et al. 2002). Respecto a Triatomini, es poco lo que se puede decir por el bajo muestreo que tenemos de géneros y tribus con este marcador, pero es clara la división entre los *Triatoma* del norte y los mesoamericanos con los del sur (Marcilla et al. 2001). La ubicación del clado *Belminus* en esta topología, refuerza la hipótesis de anidamiento dentro de Triatominae, y filogenéticamente más próximos a Triatomini que a Rhodniini como observado con el marcador nuclear 28SD2.

7 Conclusiones

Se consideran estos resultados como preliminares debido a que principalmente se establecen sobre un locus 28SD2 y a una relativamente pequeña cantidad de caracteres, aproximadamente 810 pb. Sin embargo, la congruencia topológica con otras filogenias publicadas, que analizan varios loci de origen nuclear y mitocondrial y el considerable muestreo a nivel tribal, nos permite afirmar que el género *Belminus* no es un grupo externo de Triatominae y en ese mismo sentido, su comportamiento alimentario, no sustenta la hipótesis de un estado temprano en evolución hacia la hematofagia. Por el contrario, las dos reconstrucciones filogenéticas, asumiendo únicamente el criterio topológico (28SD2 y citocromo b) refuerzan la hipótesis en la cual los *Belminus* se habrían adaptado a hospedadores invertebrados (presas artrópodos) en un evento posterior a la evolución de la hematofagia en Triatominae.

Se hace necesario que las próximas reconstrucciones filogenéticas de la subfamilia se respalden sobre una gama más amplia de marcadores moleculares y secuencias en las cuales se represente

también a los géneros *Alberprosenia*, *Bolboderia* y *Parabelminus*, en principio para evaluar con mayor confiabilidad el relacionamiento tribal y porque sin estos taxones las relaciones filogenéticas de la subfamilia aun permanecen sin resolver.

8 Referencias

1. Barata JMS 1998. Macroscopic and exocorial structures of Triatominae eggs (Hemiptera, Reduviidae). In Carcavallo RU, Galindez-Girón I, Jurberg J, Lent H. Atlas of Chagas disease vectors in the Americas, vol. II. Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 409-448.
2. Barges MD, Schofield CJ, Dujardin JP 2010. Classification and phylogeny of the Triatominae. In Telleira J, Tibayrenc M. American Trypanosomiasis Chagas disease. One hundred years of research. En Elsevier, London, p 119-148.
3. Cobben RH 1968. Evolutionary trends in Heteroptera. Part I Eggs, architecture of the shell, gross embryology and eclosion. Agricultural Research Reports 707, Wageningen, 475 pp.
4. De la Riva J, Matias A, Torrez M, Martínez E, Dujardin JP 2001. Adults and nymphs of *Microtriatoma trinidadensis* (Lent, 1951) (Hemiptera: Reduviidae) caught from peridomestic environment in Bolivia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96: 889-894.
5. Felsenstein J 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
6. Galvão C, Angulo VM 2006. *Belminus corredori*, a new species of Bolboderini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from Santander, Colombia. *Zootaxa* 1241: 61-68.
7. Guindon S, Gascuel O 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 53: 696-704.
8. Hasan SA. & Kitching IJ 1993. A cladistic analysis of the tribes of Pentatomidae (Heteroptera). *Jpn J Entomol* 61: 661-669.
9. Hwang WS, Weirauch C 2012. Evolutionary History of Assassin Bugs (Insecta: Hemiptera: Reduviidae): Insights from Divergence Dating and Ancestral State Reconstruction. *PLoS ONE* 7(9): e45523. doi:10.1371/journal.pone.0045523 Epub 2012 Sep 28.
10. Hypsa V, Tietz DF, Zrzavy J, Rego ROM, 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.

11. Lent H, Wygodzinsky P 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. *Bull Am Mus Nat Hist* 163: 123-520.
12. Lyman DE, Monteiro FA, Escalante AA, Cordon-Rosales C, Wesson DM, Dujardin, JP Beard C 1999. Mitochondrial ADN sequence variation among triatomine vectors of Chagas disease. *Am J Trop Med Hyg* 60: 377-386.
13. Marcilla A, Bargues MD, Ramsey J, Magallon-Gastelum E, Salazar-Schettino PM, Abad-Franch F, Dujardin JP, Schofield CJ, Mas-Coma S 2001. The ITS-2 of the nuclear rADN as a molecular marker for populations, species and phylogenetic relationships in Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vectors of Chagas disease. *Mol Phylogenet Evol* 18: 136-142.
14. 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.
15. Matesco VC, Furstenau BRJ, Bernardes JC, Schwertner CF, Grazia J 2009. Morphological features of the eggs of Pentatomidae (Hemiptera: Heteroptera). *Zootaxa* 1984: 1-30.
16. Monteiro F, Marcet P, Dorn P 2010. Population Genetics of Triatomines. En Telleria J, Tibayrenc M, American Tripanosomiasis Chagas Disease. One Hundred Years of Research. En Elsevier, London, p 848.
17. 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.
18. Patterson JS, Gaunt MW 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.
19. Paula AS, Diotaiuti L, Schofield CJ 2005. Testing the sister-group relationship of the Rhodniini and Triatomini (Insecta: Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mol Phylogenet Evol* 35: 712-718.
20. Posada D 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Mol Biol Evol* 25: 1253-1256.
21. Southwood TRE 1956. The structure of the eggs of the terrestrial Heteroptera and its relationship to the classification of the group. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 108: 163-221.
22. Sandoval CM, Duarte R, Gutiérrez R, Rocha Dda S, Angulo VM, Esteban L, Reyes M, Jurberg J, Galvão C 2004. Feeding sources and natural infection of *Belminus herreri*

- (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) from dwellings in Cesar, Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 137-140.
23. Sandoval CM, Joya MI, Gutierrez R, Angulo VM 2000. Cleptohaematophagy of the Triatomine bug *Belminus herreri*. *Med Vet Entomol* 14: 100-101.
24. Sandoval CM, Ortiz N, Jaimes D, Lorosa E, Galvão C, Rodriguez O, Scorza JV, Gutiérrez R 2010. Feeding behaviour of *Belminus ferroae* (Hemiptera: Reduviidae), a predaceous Triatominae colonizing rural houses in Norte de Santander, Colombia. *Med Vet Entomol* 24: 124-131.
25. Usinger R 1944. The Triatominae of North and Central America and the West Indies and their public health significance. *Public health tech monogr US* 288: 1-81.
26. 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.
27. Wheeler WC, Schuh RT, Bang R 1993. Cladistic relationships among higher groups of Heteroptera: congruence between morphological and molecular data sets. *Entomol Scand* 24: 121-137.

www.bdigital.ula.ve

Capítulo VI. Discusión general

En la literatura de Triatominae es posible encontrar a partir de trabajos muy tempranos, como el de Brumpt (1914) y recientes como el de Garrouste (2009), el recurrente señalamiento en las especies de los géneros *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus* de la presencia de algunos comportamientos alimentarios alternativos a la hematofagia. Estos comportamientos que abarcan fenómenos como el canibalismo, la cleptohematofagia y la hemolinfagia (Ryckman 1951, Herrer et al. 1954, Phillips 1960, Miles et al. 1981, Piñero et al. 1988, Lorosa et al. 2000, Garrouste 2009, Noireau & Dujardin 2010), han merecido poca atención o han sido abordados en muchos de los casos, si se quiere, de manera superficial, quizá por suponerse derivados del linaje predador del ancestro reduviido (Noireau et al. 2005). No obstante, es bien sabido que la importancia y las consecuencias biológicas de estas prácticas en Triatominae son desconocidas, y generalmente se atribuye a condiciones ambientales desfavorables (Noireau & Dujardin 2010). Es por ello, que la presencia de estos comportamientos alternativos en la subfamilia, pasan a ser un fenómeno aparentemente accidental y de limitado valor adaptativo.

Sin embargo, son los trabajos publicados por nosotros, Sandoval et al. (2000, 2004, 2010) que empiezan a señalar de una manera consistente la existencia de especies de Triatominae con un comportamiento principalmente predador. Si bien estos trabajos ampliaron el conocimiento del género *Belminus*, aún estaban lejos de definir sin ambigüedad el comportamiento predador en por lo menos alguna de las especies de este género. Lo cual se ha prestado a diversas interpretaciones, algunas de ellas con serias implicaciones para la sistemática de la subfamilia.

En virtud de la problemática taxonómica que plantea el comportamiento alimentario (predador) de especies como *B. peruvianus*, *B. herreri* y *B. ferroae* para la subfamilia Triatominae. La primera aproximación metodológica empleada en el segundo capítulo de esta tesis, persiguió definir en la especie *B. ferroae*, si la alimentación sobre cucaracha era un fenómeno esporádico o podría estar relacionado con un proceso adaptativo. Los resultados de este estudio, demuestran que los artrópodos (cucarachas), pueden ser considerados como los principales hospedadores naturales de *B. ferroae*, basados en un mayor y estadísticamente significativo *fitness* demográfico (r_0) cuando alimentado con ese hospedador, en comparación, con el hospedador vertebrado (roedor). Lo cual confirmó el valor adaptativo que posee esa estrategia de alimentación. Un segundo y no menos importante hallazgo que se desprende del seguimiento de los estadísticos vitales, es la demostración

inequívoca de la existencia de un Triatominae, *B. ferroae*, sin un comportamiento hematofágico obligado.

La segunda aproximación metodológica plasmada en el tercer capítulo, permitió a través del reconocido fenómeno de la plasticidad fenotípica en los Triatominae, evidenciar, la expresión de dos fenotipos de la conformación alar, uno asociado con el hospedador artrópodo y otro al hospedador vertebrado. Sin embargo, más allá de la importancia de demostrar el fenómeno de la plasticidad fenotípica en los Triatominae, en relación con un factor ambiental ecológicamente relevante como lo es el hospedador (Nattero et al. 2003), lo es el hallazgo de una mayor similaridad, la cual fue estadísticamente significativa, entre el fenotipo de laboratorio criado por hemolinfagia (cucaracha) y el fenotipo de los insectos capturados dentro de los domicilios, que con el fenotipo de los insectos criados por hematofagia (roedor). Lo cual refleja varias cosas, la primera que el ciclo de *B. ferroae* en la naturaleza (domicilios) es viable con el hospedador artrópodo. La segunda, es la correspondencia de este hallazgo con el perfil alimentario mostrado por esta especie, donde la mayoría de los contenidos intestinales reaccionaron al antisuero de hemolinfa de *Periplaneta americana*, lo que da respaldo a la hipótesis, que sugiere a las cucarachas como los principales hospedadores de *B. ferroae* dentro de los domicilios por Sandoval et al. (2010). La tercera es la amplitud ecológica que la plasticidad fenotípica le confiere a esta especie, si bien el fenotipo alar asociado al hospedador vertebrado no es común en la naturaleza (domicilios), y probablemente presente un bajo *fitness* como mostrado en el segundo capítulo de esta tesis, puede ser una fuente alternativa de alimentación en aquellas ocasiones, en las cuales el hospedador artrópodo no está disponible. Esta última afirmación se respalda, en la práctica de la hematofagia dentro de los domicilios por *B. ferroae*, tal como lo demuestra el estudio del perfil alimentario, donde se detecta un 7% de los contenidos intestinales con sangre de humano, perro y roedor (Sandoval et al. 2010). Una consecuencia importante desde el punto de vista epidemiológico, que conlleva la práctica de la hematofagia por parte de *B. ferroae* en los domicilios, es que su potencial papel como vector de *T. cruzi* no puede ser desestimado, a pesar de la exigua hematofagia exhibida por esta especie. Un estudio previos realizado por Sandoval (2007) demostró la susceptibilidad de esta especie a la infección por *T. cruzi* con porcentajes de metaciclologénesis entre 18 y 77% y tasas de infección que oscilaron entre 33 y 75%, similar a lo reportado en especies de los géneros *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus* (Perlowagora-Szumlewicz et al. 1994, Carvalho - Moreira et al. 2003).

La tercera aproximación metodológica, básicamente persiguió poner a prueba la hipótesis que explica el comportamiento alimentario de las especies como *B. ferroae* y *B. herreri* como una adaptación temprana a la hematofagia propuesta por Schofield & Galvão (2009). Los resultados de ambas reconstrucciones filogenéticas con los marcadores 28SD2 y citocromo b, coincidieron en recuperar el clado *Belminus*, pero, anidado dentro de los Triatominae. Esto significa, que no encontramos evidencia que sugiera que es un grupo externo a Triatominae. Por lo tanto, el comportamiento alimentario exhibido por algunas especies de *Belminus*, no encaja con la interpretación de una adaptación temprana a la hematofagia, y por consiguiente, este resultado no fortalece la hipótesis propuesta por Schofield & Galvão (2009), que sugiere un origen polifilético para la subfamilia.

Entonces, las hipótesis que podrían sugerirse para explicar el comportamiento predador de los *Belminus*, dentro del contexto que nos proveen los resultados de las reconstrucciones filogenéticas de esta tesis son: i. que las especies de *Belminus* sean un vestigio del proceso evolutivo que dio origen a la subfamilia y estar frente a un grupo basal de Triatominae, es decir, muy cercano al ancestro. ii. que los *Belminus* no sean un grupo basal de Triatominae y su comportamiento probablemente derive de la plasticidad ancestral conservada por las especies de esta subfamilia con relación al hospedador (vertebrado/artrópodo). En todo caso, el anidamiento del clado *Belminus* dentro de Triatominae, indica que el género *Belminus* es un taxón válido de esta subfamilia, a pesar que algunos de sus miembros no exhiban una hematofagia obligada, y fortalece las hipótesis de un origen monofilético para la subfamilia propuesta por Usinger (1944) y Lent & Wygodzinsky (1979) o de un origen parafilético como propuesto por Hwang & Weirauch (2012).

Los resultados del capítulo cuatro son congruentes con los hallazgos de las reconstrucciones filogenéticas de la subfamilia, en relación con la morfología del huevo de las especies del género *Belminus*, más próxima a la mostrada por la especie de la tribu Triatomini que Rhodniini. A su vez, la homología estructural y funcional entre los huevos de las especies de la tribu Rhodniini, Cavernicolini y del Bolboderini *Microtriatoma trinidadensis* soporta bien el clado Rhodniini + (Cavernicolini + *Microtriatoma*), pero por otra parte, cuestiona el ordenamiento tribal de los Bolboderini propuesto por Usinger (1944) y Lent & Wygodzinsky (1979).

Para culminar, los resultados de este estudio ponen de manifiesto la problemática taxonómica que representa la existencia de una especie con un hábito principalmente predador en la subfamilia Triatominae, ya que la principal característica biológica que los define es su obligado

comportamiento hematófago (Lent & Wygodzinsky 1979). Esto sugiere la conveniencia de ajustar o ampliar la definición de la subfamilia, de manera tal, que permita incluir a especies como *B. ferroae*, con un comportamiento principalmente predador.

1. Referencias

1. Brumpt E 1914. Importance du cannibalisme et de la coprophagie chez les Réduvidés hématophages (*Rhodnius*, *Triatoma*) pour la conservation des Trypanosomes pathogènes en dehors de l'hôte vertébré. *Bull Soc Pathol Exot* 7: 702-705.
2. Carvalho- Moreira, Spata MCD, Coura JR, García ES, Azambuja P, González, Mello CB 2003. In vivo and in vitro metaciclogénesis test of two strains of *Trypanosoma cruzi* in the triatominae vectors *Triatoma pseudomaculata* and *Rhodnius neglectus*: short and long term and comparative study. *Exp parasitol* 103: 102-111.
3. Garrouste R 2009. La première observation in natura de l'entomophagie de *Panstrongylus geniculatus* (Latreille 1811) hématophage vecteur de la maladie de Chagas (Hemiptera: Reduviidae). *Ann Soc Entomol Fr* 45: 302-304.
4. Hwang WS, Weirauch C 2012. Evolutionary History of Assassin Bugs (Insecta: Hemiptera: Reduviidae): Insights from Divergence Dating and Ancestral State Reconstruction. *PLoS ONE* 7(9): e45523. doi:10.1371/journal.pone.0045523 Epub 2012 Sep 28.
5. Herrer A, Lent H, Wygodzinsky P 1954. Contribución al conocimiento del género *Belminus* Stal, 1859 (Triatominae, Reduviidae, Hemiptera). *An Inst Med Reg Univ Tucumán* 4: 85-106.
6. Lent H, Wygodzinsky P 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. *Bull Am Mus Nat Hist* 163: 123-520.
7. Lorosa ES, Jurberg J, Souza AL, Vinhaes MC, Nunes IM 2000. Hemolinfa de Dictyoptera na manutenção do ciclo biológico silvestre de *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) e *Triatoma circummaculata* (Stal, 1859) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Entomol Vect* 7: 287-296.
8. Miles MA, de Souza AA, Póvoa M 1981. Chagas' disease in the Amazon basin III. Ecotopes of ten triatomine bug species (Hemiptera: Reduviidae) from the vicinity of Belém, Pará State, Brazil. *J Med Entomol* 18: 266-278.

9. Nattero J, Malerba R, Rodríguez CS, Crocco L 2013. Phenotypic plasticity in response to food source in *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Hemiptera, Reduviidae: Triatominae). *Infection, Genetics and Evolution* 19: 38-44.
10. Noireau F, Carbajal de la Fuente AL, Lopes CM, Diotaiuti L 2005. Some considerations about the ecology of Triatominae. *An Acad Bras Cienc* 77: 431-436.
11. Noireau F, Dujardin JP 2010. Biology of Triatominae. En Telleria J, Tibayrenc M, American Tripanosomiasis Chagas Disease. One Hundred Years of Research. En Elsevier, London, p 848.
12. Perlowagora-Szumlewicz A, Carvalho Moreira S 1994. In vivo differentiation of *Trypanosoma cruzi*. 1. Experimental evidence of the influence of vectors species on metaciclogénesis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89: 603-618.
13. Phillips NR 1960. Experimental studies on the quantitative transmission of *Trypanosoma cruzi*: aspects of the rearing, maintenance and testing of vector material, and of the origin and course of infection in the vector. *Ann Trop Med Parasitol* 54: 397-414.
14. Piñero DF, Carcavallo RU, Fernandez E 1988. Canibalismo y transmisión directa de *Trypanosoma cruzi* entre ninfas de *Rhodnius prolixus*. *Chagas* 5: 18-22.
15. Ryckman RE 1951. Recent observations of cannibalism in *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae). *J Parasitol* 37: 433-434.
16. Sandoval CM, Duarte R, Gutiérrez R, Rocha Dda S, Angulo VM, Esteban L, Reyes M, Jurberg J, Galvão C 2004. Feeding sources and natural infection of *Belminus herreri* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) from dwellings in Cesar, Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 137-140.
17. Sandoval CM 2007. Observaciones sobre aspectos biológicos y morfológicos de *Belminus* sp. de Toledo Norte de Santander, Colombia. Maestría en protozoología. Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela, 62 pp.
18. Sandoval CM, Ortiz N, Jaimes D, Lorosa E, Galvão C, Rodríguez O, Scorza JV, Gutiérrez R 2010. Feeding behaviour of *Belminus ferroae* (Hemiptera: Reduviidae), a predaceous Triatominae colonizing rural houses in Norte de Santander, Colombia. *Med Vet Entomol* 24: 124-131.
19. Usinger R 1944. The Triatominae of North and Central America and the West Indies and their public health significance. *Public health tech monogr US* 288: 1-81.

Description of the cave organ in three species of the genus *Belminus* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) by optical and scanning electron microscopy

Claudia Magaly Sandoval^{1/+}, Elsa Nieves¹, Víctor Manuel Angulo², Elis Aldana³

¹Laboratorio de Parasitología Experimental, Departamento de Biología, Núcleo Pedro Rincón Gutiérrez

²Laboratorio de Entomología Herman Lent, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, La Hechicera, 5101 Mérida, Venezuela

³Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales, Universidad Industrial de Santander, Piedecuesta, Santander, Colombia

The cave organ is a sensory receptor in the antenna pedicel of some Reduviidae. This paper describes this organ for the first time in three species of the genus Belminus, Belminus corredori, Belminus ferroae and Belminus herreri, by optical and scanning electron microscopy. The structures presented a general pattern similar to one reported for other species of Triatominae.

Key words: sensory organs - pedicellar structure - antenna

The cave organ was originally described in the pedicel of the antenna of *Triatoma infestans* by Barth (1952) but under the name of *cova das cerdas* because of the presence of numerous digitiform prolongations covering the internal surface (Catalá et al. 1998). This organ was defined by Barth (1952) as a cuticular invagination formed by a closed ellipsoidal cavity in the pedicel, with a thin connecting channel open at the invagination. Among the Triatominae, descriptions of this structure have been reported for 18 species of the genera *Triatoma* Laporte, 1832, *Rhodnius* Stål, 1859, *Panstrongylus* Berg, 1879, and *Eratyrus* Stål, 1859 (Barth 1952, Catalá 1994, Catalá et al. 1998, Weirauch 2003), but no description has been published for the genus *Dipetalogaster* Usinger, 1939 (Weirauch 2003). In other subfamilies of Reduviidae, such as Peiratinae, Reduviinae and Stenopodainae, the description of the cave organ has been reported by Weirauch (2003) and this structure is becoming a structure of value in the study of phylogenetic systematics of Reduviidae. This organ has not been recorded in the genus *Belminus* Stål, 1859, and here we describe this pedicellar structure in three species: *Belminus herreri* Lent and Wygodzinsky, 1979, *Belminus corredori* Galvão and Angulo 2006 and *Belminus ferroae* Sandoval, Pabón, Jurberg and Galvão 2007.

We used specimens of the three species of *Belminus* from laboratory colonies kept at a temperature of 24°C ± 3°C and a relative humidity of 60% ± 10%. The insects were fed on Dictyoptera of the genus *Blaberus* Serville, 1831. The parental specimens of these colonies were captured in the following localities in Colombia: *B. corredori* in San Gil, department of Santander, in 2003, *B. herreri* in San Martín, department of Cesar, in 2001, and

B. ferroae in Toledo, department of Northern Santander, in 2004 (Sandoval et al. 2004, 2010, Galvão & Angulo 2006). The antennae were removed at the scape for study by optical microscopy (OM), clarified with 10% w/v KOH for 1-2 h at 50°C, washed with plenty of water, dehydrated in ethanol and immersed in phenol for half an hour. Five antennae were examined in each nymphal stage and in adults of both sexes for the three species under study. Drawings of the cave organ were made in under camera lucida at 40X. Even though *T. infestans* Klug, 1834 was not analysed in this paper, we included a drawing of its cave organ for the purpose of comparing it with the *Belminus* species cave organs studied here. For scanning electron microscopy (SEM), antennae of adults of both sexes were removed and directly mounted in a lateral position on a double-sided tape onto a metal support and then metallised with gold for 2 min in a SPI-Module™ operated at 10 mA. The micrographs were taken with a Hitachi S-2500 electron microscope operated at 20 kV.

The species of Triatominae for which the cave organ has been studied are shown in Table I. This sensory structure was observed only in adults of both sexes in the three species of the genus *Belminus*; there was no apparent sexual dimorphism. The cave organ is located in the external lateral region, near the distal trichobothria, as reported for other Reduviidae (Barth 1952, Catalá 1994, Catalá et al. 1998, Weirauch 2003). Under OM, the cave organ shows three clearly differentiated areas: the opening, the tunnel and the main cavity (Fig. 1). In these three species, the opening is clearly sclerotised and is larger in size in *B. ferroae* (Fig. 2A, B). A heavily sclerotised tunnel is also observed, sometimes bent, which narrows down towards the end that connects to the main chamber; this chamber is clearly sub-spherical (Fig. 1). These characteristics contrast with those of species of *Rhodnius*, *Triatoma* and *Panstrongylus* which have a main chamber that is clearly enlarged (Catalá et al. 1998). By SEM, differences in the opening were also observed: *B. corredori* and *B. herreri* were smooth,

Financial support: CDCHT-ULA (C-1604-08-03-A)

+ Corresponding author, magaly6@yahoo.com

Received 3 February 2011

Accepted 14 April 2011

Morphology of the eggs of the genus *Belminus* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) by optical and scanning electron microscopy

CLAUDIA M. SANDOVAL¹, ELSA NIEVES¹, VÍCTOR M. ANGULO²,
JOÃO ARISTEU DA ROSA³ & ELIS ALDANA^{4,5}

¹Laboratorio de Parasitología Experimental (LAPEX), Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida, República Bolivariana de Venezuela. E-mail: magaly6@yahoo.com, nevelsa@ula.ve

²Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales CINTROP UIS, Universidad Industrial de Santander, Piedecuesta, Santander, Colombia. E-mail: cintrop@hotmail.com

³Faculdade de Ciências Farmacêuticas/UNESP/Araraquara, São Paulo, Brazil. E-mail: rosaja@fcfar.unesp.br

⁴Laboratorio de Entomología "Herman Lent", Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida, República Bolivariana de Venezuela. E-mail: aldana@ula.ve.

⁵Corresponding author: Email: aldana@ula.ve

Abstract

The external morphology of eggs of the species *Belminus corredori* Galvão & Angulo, 2006, *Belminus herreri* Lent & Wygodzinsky, 1979 and *Belminus ferroae* Sandoval, Pabón, Jurberg & Galvão, 2007 is described for the first time using scanning electron microscopy (SEM). Females lay one egg at a time; the shape of the egg is oval with lateral flattening, a rounded caudal area and a true and simple convex operculum. The average size of the egg among these species is 0.51–0.58 mm in length and 0.36–0.4 mm in width. As a generic character we highlight the discovery of a chorion rim with one to four grooves always joined to the micropyles. All species present a clear polygonal pattern only in the operculum and in the egg's cephalic region, while the median and caudal regions show a smooth appearance, features that are shared only with the eggs of the genus *Alberprosenia*. A discriminant analysis of the polygonal design of the operculum proved to be useful for the identification of the species.

Key words: chorion sculpturing, polygonal cells, operculum, eggshell, SEM

Introduction

The ultrastructure of the chorion of insect eggs is related to morphological, physiological and taxonomic properties (Hinton 1981; Suludere *et al.* 1999; Candan 1999). In Heteroptera, including the Triatominae Jeannel, 1919, studies of the egg stage have enabled the identification of characters important for determining classification and phylogenetic relationships (Barata 1981; Obara *et al.* 2007a; González *et al.* 2009; Matesco *et al.* 2009). There are 141 species of Triatominae (Schofield & Galvão, 2009; Jurberg *et al.* 2009), some of which are regarded as important vectors of *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909), the etiologic agent of Chagas disease. Pinto (1924) and Galliard (1935) were pioneers in addressing the external morphology of eggs in this subfamily. The former described the external morphology of the egg of *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 and the latter showed that the architecture of the exchorion in Triatominae is useful in distinguishing among species. These studies have led to many documents addressing the description of the macroscopic and microscopic aspects of numerous triatomine species (Abalos & Wygodzinsky 1951; Barth & Muth 1958; Forattini & Barata 1974; Lent & Wygodzinsky 1979). Barata (1981), Costa *et al.* 1991 and Jurberg *et al.* (1993) defined the characteristics for the genera *Rhodnius* Stål, 1859, *Cavernicola* Barber, 1937 and *Dipetalogaster* Usinger, 1939. Barata (1998) extended this analysis by describing and defining egg traits of taxonomic value in the genera *Alberprosenia* Martínez & Carcavallo, 1977, *Cavernicola*, *Dipetalogaster*, *Eratyrus* Stål, 1859, *Microtriatoma* Prosen & Martínez, 1952, *Panstrongylus* Berg, 1879, *Psammolestes* Bergroth, 1911, *Rhodnius* and *Triatoma* Laporte, 1832. More recently, studies have been motivated by the

Demographic fitness of *Belminus ferroae* (Hemiptera: Triatominae) on three different hosts under laboratory conditions

Claudia Magaly Sandoval¹*, Paula Medone², Elsa Evelia Nieves¹,
Diego Alexander Jaimes³, Nelcy Ortiz³, Jorge Eduardo Rabinovich²

¹Laboratorio de Parasitología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela

²Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, La Plata, Argentina

³Laboratorio de Investigación en Ciencias Biomédicas, Universidad de Pamplona, Pamplona, Norte de Santander, Colombia

Triatominae are widely recognised for their role as vectors of *Trypanosoma cruzi*. One of the main biological characteristics of this subfamily is their obligate haematophagous condition. However, previous studies on *Belminus herreri* and *Belminus ferroae* suggested that cockroaches are their principal hosts in domiciles. Due to this peculiar behaviour, the aim of this study was to analyse several demographic and reproductive parameters of *B. ferroae* fed on three different hosts (mice, cockroaches and *Rhodnius prolixus*) and relate *B. ferroae* fitness to these alternative hosts. The cohorts were reared under constant conditions. The egg hatching rate was similar for cohorts fed on cockroaches (69.4%) and *R. prolixus* (63.8%), but was much lower for the cohort fed on mice (16%). The development time from the nymph to adult stage and the average age of first reproduction (α) presented lower values in the cohort fed on cockroaches, which is consistent with the higher population growth rate associated with this host. Demographic parameters [intrinsic rate of natural increase, finite rate of population growth, net reproductive rate and damping ratio] showed statistically significant differences between the cohorts. Analysis of the life history of *B. ferroae* revealed a higher fitness related to the cockroach. The implications of these results for the origin of the subfamily are discussed.

Key words: Triatominae - *Belminus* - population parameters - life-history traits - demography

The Triatominae are a subfamily of the Reduviidae (Hemiptera: Heteroptera) with 143 formally recognised species (Ayala 2009, Jurberg et al. 2009, Schofield & Galvão 2009, Rosa et al. 2012). One of the main biological characteristics of the Triatominae is their obligate haematophagous condition: they depend on vertebrate blood to complete their life cycle (Lent & Wygodzinsky 1979).

The genus *Belminus* belongs to this subfamily and is composed of eight species (*Belminus rugulosus* Stål, 1859, *Belminus costaricensis* Herrero, Lent & Wygodzinsky, 1954, *Belminus peruvianus* Herrero, Lent & Wygodzinsky, 1954, *Belminus herreri* Lent & Wygodzinsky, 1979, *Belminus pittieri* Osuna & Ayala, 1993, *Belminus laportei* Lent, Jurberg & Carcavallo, 1995, *Belminus corredori* Galvão & Angulo, 2006 and *Belminus ferroae* Sandoval, Pabón, Jurberg & Galvão). The geographic range of these species includes the territories of Mexico, Costa Rica, Panama, Colombia, Venezuela, Peru and Brazil (Sandoval et al. 2007).

This genus is considered wild and is mainly found in association with bromeliads, tree bark and hollow trees

as well as opossums and reptiles, whereas its members are only rarely found in human domiciliary or peridomiciliary habitats (Lent & Wygodzinsky 1979, Gaunt & Miles 2000). However, cases of domiciliation in Peru and Colombia have been reported (Herrer 1955, Sandoval et al. 2010).

Laboratory and field observations of *B. peruvianus* and *B. herreri* have indicated a diet based on a wide range of hosts, including arthropods, reptiles, birds and mammals. Furthermore, the feeding behaviour of these species is variable, ranging from cannibalism to cleptohaematophagy, haemolymphagy and haematophagy (Herrer et al. 1954, Gaunt & Miles 2000, Sandoval et al. 2000, 2004).

Although the *Belminus* genus has been recognised since 1859, vital statistics and demographic parameters have not been estimated for this group. A previous study (Sandoval et al. 2000) provided estimates for the development time and mortality of eggs and nymphs of *B. herreri*, but not for demographic parameters. This lack of information can be attributed to the sporadic capture of this species, as well as the low number of specimens collected in the field and the difficulty of rearing colonies fed on vertebrate hosts (Herrer et al. 1954, Schofield & Galvão 2009).

Preliminary observations have indicated the possibility of rearing *B. peruvianus* by feeding it on nymphs of other Triatominae (Herrer et al. 1954). Although *Rhodnius prolixus* is not considered a natural host of *Belminus* species, using this species as a food source allows laboratory colonies of *B. herreri* to be reared, though in low numbers (Sandoval et al. 2000). A study of the intestinal contents of domiciliary-captured individuals of *B. fer-*

doi:

Financial support: Universidad de Pamplona, COLCIENCIAS (1121-04-18236), CDCHT, ULA (C-1605-0803-A), Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica of Argentina (PICT2008-0035), ANR/CNRS/France (ANR-08-MIE-007)

* Corresponding author: magaly6@yahoo.com

Received 18 April 2013

Accepted 6 August 2013