



RENORBIO- Ponto Focal UFPI
Rede Nordeste de Biotecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia- RENORBIO/UFPI

LEONARDO HENRIQUE GUEDES DE MORAIS LIMA

DETERMINAÇÃO DA INTERAÇÃO ALIMENTAR ENTRE *Lutzomyia longipalpis*, VETOR DA LEISHMANIOSE VISCERAL, E A FLORA TROPICAL URBANA POR MEIO DA FERRAMENTA DNA BARCODE

Teresina-PI

2016

LEONARDO HENRIQUE GUEDES DE MORAIS LIMA

DETERMINAÇÃO DA INTERAÇÃO ALIMENTAR ENTRE *Lutzomyia longipalpis*, VETOR DA LEISHMANIOSE VISCERAL, E A FLORA TROPICAL URBANA POR MEIO DA FERRAMENTA DNA BARCODE

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste em Biotecnologia (RENORBIO), com vistas à apreciação pela banca de tese como requisito final para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Dr. Carlos Henrique Nery Costa

Área de concentração: Biotecnologia em Saúde

Teresina-PI

2016

FICHA CATALOGRÁFICA
Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí
Biblioteca José Albano de Macêdo

L732d Lima, Leonardo Henrique Guedes de Moraes.

Determinanação da interação alimentar entre *Lutzomyia longipalpis*, vetor da leishmaniose visceral, e a flora tropical urbana por meio da ferramenta DNA barcorde / Leonardo Henrique Guedes de Moraes Lima. – 2016.
79f.

Tese (Doutorado em Biotecnologia)– Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2016.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Nery Costa

1. Genes *matK* e *rbcl*. 2. Flebotomíneos. 3. Angiosperma. 4. Fabaceae. 5. Saúde pública. 6. Biotecnologia. I. Título.

CDD 660.65

FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNO: LEONARDO HENRIQUE GUEDES DE MORAIS LIMA

TÍTULO DO PROJETO: "Determinação da interação alimentar entre *Lutzomyia longipalpis*, vetor da leishmaniose visceral, e a flora tropical urbana por meio da ferramenta molecular DNA barcode".

PROFESSOR ORIENTADOR: Prof. Dr. Carlos Henrique Nery Costa

BANCA EXAMINADORA:

	CONCEITO	ASSINATURA
Prof. Dr. Carlos Henrique Nery Costa, UFPI (Presidente)	<u>Satisfatório</u>	<u>[Assinatura]</u>
Profa. Dra. Ana Paula Peron, UFPI (Examinadora)	<u>Satisfatório</u>	<u>Ana Paula Peron</u>
Prof. Dr. Felipe Cavalcanti Carneiro da Silva - UFPI (Examinador)	<u>Satisfatório</u>	<u>[Assinatura]</u>
Prof. Dr. Valdir de Queiroz Balbino – UFPE (Examinador)	<u>Satisfatório</u>	<u>[Assinatura]</u>
Prof. Dr. Vladimir Costa Silva - UFPI (Examinador)	<u>Satisfatório</u>	<u>Vladimir Costa Silva</u>

DATA DA AVALIAÇÃO: 04 de março de 2016.

HORÁRIO: 09h

LOCAL: Auditório do Laboratório de Leishmanioses do Instituto de Doenças Tropicais
Natan Portela.

**Dedico este trabalho a toda minha família,
em especial a meus pais Lima e Tânia, meus
irmãos Hallyson e Anna e à minha esposa
Ticiania.**

“A melhor de todas as coisas é aprender. O dinheiro pode ser perdido ou roubado, a saúde e força podem falhar, mas o que você dedicou a sua mente é seu para sempre.”

(Louis L'Amour)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me guiado e dado forças para que mais um objetivo fosse alcançado.

Aos meus pais e irmãos pelo incentivo e carinho durante toda caminhada. Apesar da distância física, sempre senti vocês ao meu lado. Obrigado não só pelo que vocês fizeram, mas pelo que representam em minha vida.

À minha esposa por ser meu porto seguro. Obrigado pelo companheirismo e cumplicidade em todos os momentos. Agradeço pelas várias vezes que mostrou-me a direção certa a seguir. Agradeço simplesmente por tudo e acima de tudo agradeço a Deus por ter você em minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Henrique Nery Costa, não só pela orientação, mas pelo respeito e amizade. Obrigado por me mostrar na prática que “fazer” ciência não é deduzir o óbvio ou testar o difícil, mas transpassar o “impossível”.

Aos amigos do Laboratório de Leishmanioses, Fernando, Danielle Zacarias, Teresinha, Jailton, Vladimir, Marcelo, Adeno, Gabriel, Bruno, Débora, Katia, Rebeca, Eliamara, Valeria, Regiane, Alexandre, Cardoso e Marcos por toda ajuda não só para o andamento dos estudos, como também pelos vários momentos de descontração.

Ao grande amigo Marcelo Mesquita pela enorme parceria durante todo o estudo. Agradeço imensamente por tudo e saiba que estarei sempre à disposição quando precisar.

Aos amigos/irmãos João Marcelo, Bruno, Daniel, Hélio, André, Peron, Felipe, Socorro, entre tantos outros, por me ajudarem quando precisei, mas acima de tudo pelo sentimento de amizade que sempre demonstraram por mim. Vocês se tornaram parte da minha família.

Ao casal de amigos Bruno e Luciana, por terem me adotado e a aberto as portas de sua casa. Obrigado por toda hospitalidade. Saibam que tenho um imenso carinho por vocês meus primos e padrinhos.

Ao prof. Dr. Valdir de Queiroz Balbino por ter me recebido em seu laboratório e por toda atenção, bem como por ter direcionado integrantes de sua equipe de pesquisadores para ajudar-me durante o estudo.

Aos pesquisadores Moisés Thiago de Souza Freitas e Heidi Lacerda por toda ajuda no tratamento das amostras, assim como na análise dos dados. Obrigado por toda atenção e agilidade no atendimento às minhas inúmeras dúvidas e solicitações.

Aos colaboradores Oscar D. Kirstein, Ibrahim Abassi, Alon Warburg e Laura Skrip por todo o auxílio prestado ao longo do trabalho.

Aos membros da minha banca pelo aceite ao convite, bem como pelas inúmeras contribuições para obtenção de um produto final de altíssima qualidade.

Ao programa Renorbio e a todos os docentes por todo conhecimento proporcionado.

À Capes pelo suporte financeiro durante a minha formação.

A todos que contribuíram de maneira direta ou indireta para a realização deste trabalho e minha formação acadêmica.

Afirmo com total convicção que cada um de vocês teve uma enorme e importante participação para que eu chegasse até aqui. Obrigado a todos e contem sempre comigo.

RESUMO

A técnica do DNA barcode consiste na obtenção de curtas sequências de DNA a partir de regiões padronizadas do genoma. Essas sequências, reunidas posteriormente em bibliotecas de referência, podem ser utilizadas em abordagens taxonômicas e filogenéticas, bem como na identificação das relações alimentares entre insetos vetores de doenças e a flora regional. Esta proposição tem foco na área de saúde pública, pois permite a implementação de estratégias de paisagismo urbano visando a eliminação dos vetores e, assim, controlando a disseminação natural da doença. Dessa forma, o estudo objetivou realizar a montagem de uma biblioteca barcode de referência utilizando marcadores moleculares para os segmentos genômicos da maturase K (*matk*) e ribulose bifosfato carboxilase (*rbcL*) em plantas coletadas em Teresina, localizada no nordeste brasileiro. Adicionalmente, foi avaliado o poder de discriminação dos referidos marcadores por meio da utilização de abordagens filogenéticas, bem como buscou-se estabelecer a relação alimentar entre flebotomíneos (*Lutzomyia longipalpis*) e a flora local. Amostras de 65 espécies de angiospermas, cada uma possuindo, no mínimo, 10 espécimes, distribuídas em 28 famílias, compuseram o estudo. A biblioteca de referência foi montada a partir das sequências obtidas pelos marcadores *rbcL*, *rbcL-A* e *matk*, por meio do sequenciamento capilar, os quais apresentaram poderes de amplificação de 93.9%, 89.5% e 81.4%, respectivamente. O *matk* mostrou o melhor poder de discriminação. Entre as árvores filogenéticas construídas, a associação entre *matk* e *rbcL-A* mostrou o melhor suporte dos clados. Entretanto, o *matk* sozinho também gerou uma árvore consistente. A utilização dos três marcadores simultaneamente (*rbcL* + *rbcL-A* + *matk*) não aumentou o poder de discriminação. Quanto à relação alimentar inseto-planta foram coletados 100 flebotomíneos, utilizando armadilha luminosa, em uma região urbana contendo 205 espécimes vegetais, distribuídas em 22 espécies e 14 famílias. O DNA total dos dípteros foi extraído e reações de PCR foram realizadas utilizando o gene *rbcL*. A taxa de amplificação positiva de material vegetal nos insetos foi de 57%. As sequências obtidas foram alinhadas com as contidas na biblioteca de referência anteriormente construída utilizando a ferramenta BLASTN. Além disso, anotou-se o número absoluto de indivíduos para cada espécie encontrada, além da distância de cada uma delas para a armadilha dos flebotomíneos. Obteve-se que 94,7% dos vetores alimentaram-se de plantas da família Fabaceae. Não foi observada correlação significativa entre o conteúdo alimentar vegetal identificado nos insetos e a abundância das plantas de cada família, distância média das plantas para a armadilha ou a expansão média da coroa de cada família vegetal. O estudo mostrou que o DNA barcode é útil na construção de bibliotecas moleculares, que o uso do exclusivo do marcador molecular *matk* constitui uma alternativa adequada para aplicação em estudos taxonômicos e filogenéticos de espécies de angiospermas de áreas tropicais urbanas e que os flebotomíneos mostraram uma preferência alimentar pela família Fabaceae em ambiente urbano.

Palavras-chave: Flebotomíneos; genes *matk* e *rbcL*; angiospermas; discriminação de espécies; preferência alimentar, Fabaceae; saúde pública

ABSTRACT

DNA barcode is based on short sequences generated from standard genome regions. Those sequences can be gathered in reference libraries that can be applied to identification of food relations between insect disease vectors and the surrounding flora. Based on this, landscaping strategies are available to be implemented with a focus on public health looking for eradication of vector and thus controlling vector-borne disease transmission. Thus, it is possible to control the expansion of the disease. This study intended to, by using the molecular markers *matk*, *rbcL* and *rbcL-A*, build a barcode library for plants from the city of Teresina, located on Brazilian northeast. Additionally, it was evaluated the discriminatory power from the markers mentioned above by phylogenetic approaches. Also, the food relation between the phlebotomus (*Lutzomyia longipalpis*) and the local flora was observed. Angiosperms (65 species), with 10 individuals on the region researched, distributed in 28 families, were collected and processed to obtain the *matk* and *rbcL* gene sequences. The reference library assembly from sequences generated by *rbcL*, *rbcL-A* and *matk* that amplified at 93.9%, 89.5% and 81.4% rates, respectively. The best discriminatory power was achieved by *matk* marker. Among the phylogenetic trees, the best clades support occurred when *matk* and *rbcL* were used together. However, *matk* alone also generated a consistent tree. When using the three markers altogether (*rbcL* + *rbcL-A* + *matk*) it did not increased the discriminatory power. As for the food relation plant-insect 100 phlebotomus were collected for 5 days on luminous trap, within an urban region with 205 plants species, distributed in 22 species and 14 families. All sandflies' DNA was extracted and the PCR reactions were made with *rbcL* gene. The positive amplification rate from plant material founded on insects it was 57%. BLAST was used for alignment sequences obtained from the insects and reference library. Additionally, the distance between the plants and phlebotomus trap was measured and the most family founded on insects was Fabaceae (94.7%). No correlation with food content on insects' digestive tract, the abundance of each family, the average plants distance to the traps and the average tree crowns was verified. General conclusions was that *matk* molecular marker is a suitable alternative for angiosperms from tropical urban flora taxonomic and phylogenetic studies. Furthermore, at urban region, phlebotomine sand flies showed a food preference to Fabaceae families' species.

Keywords: Phlebotomine sand flies; *matk* and *rbcL* genes; angiosperms; species discrimination; food preference; Fabaceae; public health

APRESENTAÇÃO

Este trabalho de tese é apresentado ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia, ponto focal Universidade Federal do Piauí. O presente estudo foi dividido em capítulos que objetivaram a elaboração de uma revisão de literatura, a construção de uma biblioteca barcode vegetal de referência para a cidade de Teresina, a avaliação de marcadores barcoding para estudos de taxonomia e filogenética e a identificação da preferência alimentar vegetal de flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longiplapis*.

O primeiro capítulo é referente a uma revisão de literatura abordando aspectos gerais sobre os flebotomíneos, a leishmaniose visceral (LV), a interação alimentar flebotomíneos-plantas e a utilização do DNA barcode na identificação dessa relação. Ao longo do texto foi explorada a associação entre o *Lutzomyia longiplapis* e a leishmaniose visceral no Brasil, visto que esse inseto é considerado o principal vetor do agente etiológico da LV, *Leishmania infantum*, na América Latina, bem como pelo fato de que alguns autores associam a urbanização da LV no Brasil à presença dessa espécie vetora. Também foi tratada nessa revisão a interação que ocorre entre os flebotomíneos e as plantas, as quais podem ocorrer de forma preferencial, assim como podem não ser benéficas para o inseto. Finalmente foi abordada a ferramenta molecular DNA barcode e a sua utilização na identificação das relações alimentares insetos-plantas, além de investigar, com base na literatura, quais plantas favorecem a presença dos vetores nos diferentes ambientes.

O segundo capítulo teve como objetivos a construção de uma biblioteca de DNA barcode de referência da vegetação urbana do município de Teresina – PI, utilizando diferentes marcadores moleculares, *rbcL* e *matK*, assim como a avaliação do poder de discriminação desses marcadores. Essa biblioteca de referência é obtida a partir da utilização da ferramenta molecular denominada DNA barcode, a qual baseia-se na utilização de sequências curtas de DNA, obtidas de regiões do genoma, que possuam universalidade e capacidade de diferenciar indivíduos dentro dos diferentes níveis taxonômicos. A construção dessas bibliotecas torna-se importante, pois a partir delas é possível fazer a identificação correta das espécies vegetais, a partir de qualquer estrutura da planta, além de sua aplicação em estudos de biodiversidade e ecologia. De forma geral, a utilização de ferramentas moleculares, como o DNA barcode, torna mais precisa a taxonomia, além de possibilitar uma determinação confiável das relações filogenéticas existentes entre as espécies.

O terceiro capítulo aborda a construção da primeira biblioteca de DNA barcode vegetal da cidade de Teresina – PI. Esta foi construída a partir das diferentes espécies

vegetais, de porte arbustivo ou arbóreo, encontradas na área urbana do município. Para construção da biblioteca foram utilizados diferentes marcadores barcode para os genes da ribulose bifsosfato carboxilase (*rbcL*) e maturase K (*matK*), encontrados no genoma do cloroplasto. As sequências obtidas foram depositadas no banco de dados público GenBank. Este material consistiu em um produto biotecnológico gerado por esta tese.

O capítulo quatro deste trabalho trata sobre a utilização da ferramenta DNA barcode na identificação da preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* em uma vegetação urbana tropical. Esta identificação foi obtida a partir da comparação entre as sequências de DNA vegetal, obtidas a partir do conteúdo alimentar presente nos insetos, e as sequências contidas em uma biblioteca barcode de referência, previamente construída a partir das espécies vegetais presentes no ambiente de coleta dos insetos. A identificação da relação alimentar preferencial de insetos por determinadas plantas é importante pois, a partir dela, estratégias de paisagismo podem ser desenvolvidas visando o controle de insetos vetores de doenças.

Diante do exposto, o material contido nessa tese visa contribuir com a comunidade científica fornecendo informações sobre a interação alimentar preferencial entre *Lutzomyia longipalpis*, vetor da leishmaniose, e determinadas plantas encontradas em ambiente urbano; assim como a utilização dos marcadores barcoding *rbcL* e *matK* em estudos de taxonomia e filogenia. Em adição, a biblioteca barcode vegetal, construída neste trabalho, contribuiu com a ampliação das informações contidas em bibliotecas de DNA barcode vegetais já disponíveis na literatura.

Lista de Figuras

CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Flebotomíneos fêmea (esquerda) e macho (direita) do gênero *Lutzomyia*. (Fonte: Armed Forces Pest Management Board (2015)). 19
- Figura 2.** Ciclo de vida de espécies do gênero *Leishmania* causadoras da leishmaniose. (Fonte: Harhay *et al.*, (2011)). 25

CAPÍTULO 2

- Figure 1.** Neighbor joining tree obtained with the K2P model, showing results using *matk* gene. 55
- Figure 2.** Neighbor joining tree obtained with the K2P model, showing results using *rbcL-A+matk* genes. 56
- Figure 3.** Neighbor joining tree obtained with the K2P model, showing results using *rbcL + rbcL-A+ matk* genes 57
- Figure S1.** Neighbor joining tree obtained with the K2P model, showing results using *rbcL* 60
- Figure S2.** Neighbor joining tree obtained with the K2P model, showing results using *rbcL-A* 61

CAPÍTULO 4

- Figure 1.** Correlation plot for relationships between the proportion of sandflies testing positive for DNA from a given plant family and plant characteristics. Red represents a negative correlation and blue represents a positive correlation. Larger circles represent stronger correlations. (A) Proportion of sandflies testing positive for DNA from a given plant family. (B) Average distance of plants from a given family to a trap. (C) Average crown expansion of plants from a given family. (D) Local abundance of plants from a given family

Lista de Tabelas

CAPÍTULO 2

Table 1. Universal primers for amplifying rbcL, rbcL-A and matk.45

Table 2. Intra-population genetic diversity measures for each gene.46

Tabela 3. Genetic distances and percentage for clades of phylogenetic trees with support values above 50% achieved through the use of molecular markers of individual and concatenated.47

Tabela S1. List of angiosperm plants found in the city of Teresina, Brazil, and the success of obtaining amplicons from each of their tested barcode markers.58

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Lista de angiospermas encontradas na cidade de Teresina, Brasil, e o sucesso na obtenção de sequências a partir dos diferentes marcadores barcode.63

CAPÍTULO 4

Table 1. Characteristics of plants by family and frequency of sand fly feeding 70

Table 2. Abiotic factors and sampling frequency per day of trapping..... 70

Lista de Abreviaturas/Siglas

rbcL – ribulose bifosfato carboxilase

matK – maturase K

DNA – ácido desoxirribonucleico

LV – leishmaniose visceral

PCR – reação da polimerase em cadeia

BLAST – ferramenta básica de busca de alinhamento local

BLASTN - ferramenta básica de busca de alinhamento local a partir da sequência de bases nucleotídicas

NCBI – Centro Nacional de Informação Biotecnológica dos EUA

GenBank - banco de dados de sequências de DNA e de aminoácidos do Centro Nacional de Informação Biotecnológica dos EUA

Sumário

CAPÍTULO 1	15
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Flebotomíneos	18
2.2 Leishmaniose Visceral (LV).....	20
2.3 <i>Lutzomyia longipalpis</i> e a leishmaniose visceral no Brasil	22
2.3.1 Leishmaniose Visceral no Piauí	23
2.3.2 Ciclo de vida do parasita	24
2.4 Medidas preventivas e de combate ao vetor	25
2.5 Interação Flebotomíneos - Plantas.....	26
2.6 Tecnologia do DNA barcode (código de barras) associada às plantas.....	28
2.6.1 Utilização do DNA barcode na identificação de interações alimentares insetos-plantas.....	31
3 CONCLUSÃO.....	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
CAPÍTULO 2	42
1 INTRODUCTION	43
2 MATERIALS AND METHODS	44
2.1 Field collection of plants	44
2.2 DNA extraction, PCR and sequencing	44
2.3 Population genetics and phylogenetic analysis	45
3 RESULTS.....	46
4 DISCUSSION.....	48
REFERENCE	50
Apêndice A.....	58
Apêndice B	60
Apêndice C	61
CAPÍTULO 3	62
CAPÍTULO 4	65
1 INTRODUCTION	66
2 MATERIALS AND METHODS	67
2.1 Field collection of phlebotomine sandflies and plants.	67
2.2 DNA extraction, PCR and sequencing.	68
2.3 Assembly of DNA barcode library.....	68
2.4 Identification of the plant feeding material in sandflies.....	69
2.5 Statistical Methods	69
3 RESULTS.....	69

4 DISCUSSION.....	71
Apêndice A.....	78

CAPÍTULO 1

Flebotomíneos como vetores da leishmaniose visceral e identificação da interação vetor-planta por meio do DNA barcode

Leonardo Henrique Guedes de Moraes Lima¹ e Carlos Henrique Nery Costa¹

¹ Docente da Universidade Federal do Piauí (UFPI) e Pesquisador do Laboratório de Pesquisas em Leishmanioses do Piauí.

Resumo

Flebotomíneos são dípteros da família Psychodidae, onde algumas espécies são de importância para a saúde pública, pois as fêmeas são capazes de transmitir a leishmaniose visceral (LV) em humanos. Na América latina, a LV é causada pelo protozoário da espécie *Leishmania infantum* e tem como principal vetor o flebotomíneo da espécie *Lutzomyia longipalpis*. A presença dos vetores nos mais diversificados ambientes, assim como sua capacidade vetorial, são influenciadas pela composição da vegetação. Os flebotomíneos utilizam os carboidratos obtidos das plantas, seja diretamente dos tecidos ou através do líquido açucarado excretado por afídeos e coccídeos, como fonte energética. A partir da indicação das espécies ou famílias vegetais que atuam como fonte preferencial alimentar, estratégias de paisagismo podem ser utilizadas no combate a esses vetores de doenças, Nesse sentido, o uso da ferramenta molecular DNA barcode, que baseia-se na amplificação gênica de segmentos específicos de regiões padronizadas do DNA genômico, visando obter uma sequência única para cada espécie, semelhante a um código de barras, torna-se apropriada na identificação da interação alimentar inseto-planta, pois é capaz de identificar ao nível de espécie a planta da qual os insetos têm se alimentado.

1 INTRODUÇÃO

Flebotomíneos são dípteros da família Psychodidae, sub-família Phlebotominae, onde algumas espécies são de importância para a saúde pública, pois as fêmeas são capazes de transmitir a leishmaniose em humanos. Esta doença é considerada negligenciada e afeta milhares de pessoas em todo o mundo. Três manifestações primárias da doença são geralmente descritas em humanos: cutânea, mucocutânea e visceral.

A leishmaniose visceral é uma doença sistêmica que pode levar o indivíduo a óbito se não tratada. Atualmente, milhões de pessoas estão acometidas por esta doença e milhares de novos casos são registrados anualmente. O Brasil responde por uma grande parte dos casos de LV em humanos.

Nas Américas a LV, também conhecida por calazar, é causada pelo protozoário da espécie *Leishmania infantum*. Na América Latina, a espécie de flebotomíneos, *Lutzomyia longipalpis*, é considerada como vetor principal primário da *Leishmania infantum* e, conseqüentemente, o principal vetor da LV. No Brasil, alguns pesquisadores associaram a urbanização desta doença à presença do *Lutzomyia longipalpis*, mesmo esta espécie sendo primariamente silvestre, visto que os insetos facilmente se adaptam às mudanças ambientais e a ambientes peridomiciliares, devido seu comportamento alimentar eclético envolvendo animais e o próprio ser humano.

Além da hematofagia, um comportamento exclusivamente das fêmeas, os flebotomíneos de ambos os sexos possuem em comum a necessidade de obtenção de açúcares de origem vegetal, que servem como fonte de energia para realização das atividades vitais. Estes carboidratos podem ser obtidos diretamente dos tecidos vegetais ou a partir do líquido açucarado liberado por afídeos ou coccídeos.

Diante da necessidade da interação flebotomíneos-plantas visando a alimentação, percebe-se que uma melhor compreensão dessa relação pode ser utilizada como uma medida para o controle dos insetos e, conseqüentemente, da LV. Atualmente, várias espécies vegetais têm sido estudadas quanto aos seus efeitos sobre esses insetos vetores. Outra frente de pesquisas busca identificar espécies ou famílias de plantas que atuam como fonte alimentares preferenciais dos dípteros.

Uma ferramenta que está em crescente utilização na busca por interações específicas entre as plantas e os insetos que as utilizam como fonte de nutrientes, ainda mais quando estes últimos atuam como vetores de doenças em humanos, é a tecnologia do DNA barcode. No caso das plantas, regiões pertencentes ao genoma do cloroplasto, tais como o gene ribulose bifosfato carboxilase (*rbcL*) e o gene da maturase K (*matK*), são amplamente indicados em diversos estudos utilizando o DNA barcode. A partir da obtenção das sequências únicas para cada espécie analisada, estas são depositadas em bancos de dados e vão constituir as bibliotecas de DNA barcode.

Uma vez obtidos os segmentos de DNA vegetal amplificados e sequeuciados a partir do conteúdo alimentar presente no trato digestório dos insetos, estes são comparados com as

sequências de plantas contidas nas bibliotecas de DNA barcode local ou mundial, tornando-se possível identificar as espécies ou famílias vegetais das quais os insetos têm se alimentado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Flebotomíneos

Os registros fósseis dos flebotomíneos mostram sua origem antes do Oligoceno, no período do Cretáceo Inferior (Andrade e Brazil, 2003; Azar e Nel, 2003). Em estudo realizado por Aransay *et al.* (2000) o gênero *Phlebotomus* mostrou-se de origem monofilética.

Flebotomíneos são dípteros da família Psychodidae, sub-família Phlebotominae, conhecidos pelo seu papel na transmissão da leishmaniose em humanos. Estão presentes principalmente nas zonas quentes da Ásia, África, Austrália, sul da Europa e das Américas (Killick-Kendrick, 1999; Maroli *et al.*, 2013). Ao redor do mundo foram descritas em torno de 1.000 espécies, das quais cerca de 530 são encontradas na região Neotropical. Entre estas, um pouco mais de 20 espécies são consideradas vetores de leishmanioses no Novo Mundo (Carvalho *et al.*, 2013; Brazil *et al.*, 2015).

Os flebotomíneos são insetos holometábolos e apresentam quatro fases de desenvolvimento: ovo; larva, pupa e adulto (Ward, 1990). Os estágios imaturos, ao contrário dos mosquitos, não necessitam de água parada para completar o seu desenvolvimento, embora precisem de habitats relativamente úmidos e quentes (Maroli *et al.*, 2013). As fêmeas depositam seus ovos em um habitat rico em teor de matéria orgânica, tais como excrementos de animais, solo, abrigos de animais e lixo doméstico, os quais fornecem às larvas recém-eclodidas abrigo, nutrição e umidade, condições necessárias para o seu desenvolvimento (Sharma e Singh, 2008).

Os flebotomíneos adultos possuem tamanho pequeno, corpo recoberto por cerdas finas (Figura 1) e quando em repouso, mantêm suas asas semi-abertas, na forma de V, acima do abdômen (Killick-Kendrick, 1999). Ambos os sexos alimentam-se de açúcares secretados por afídeos e coccídeos, além de seiva obtida diretamente de vegetais (Anez *et al.*, 1994; Salomón, 2009; Pinheiro *et al.*, 2013). Os açúcares ingeridos também são importantes para a sobrevivência e multiplicação da leishmania no trato digestório do inseto (Jacobson *et al.*, 2001; Pinheiro *et al.*, 2013).

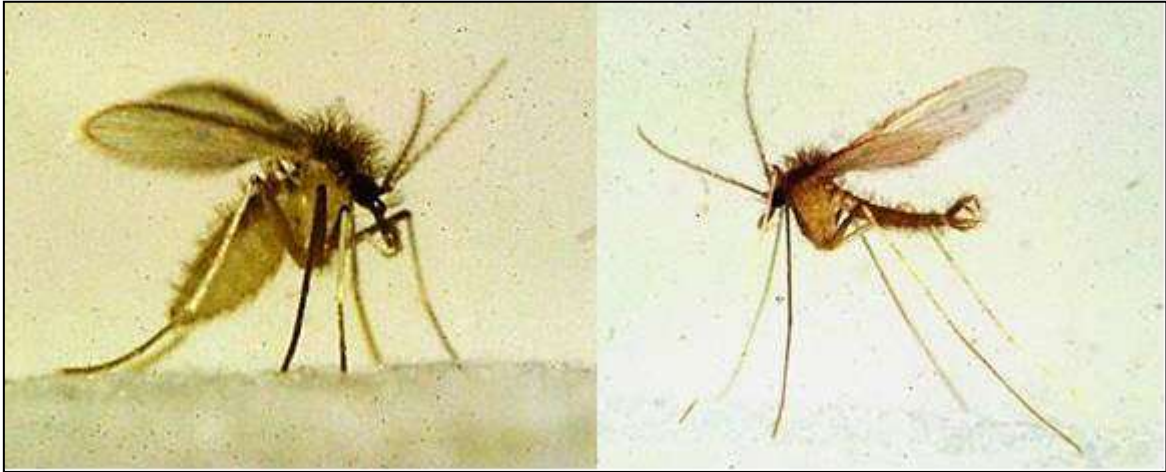


Figura 1. Flebotomíneos fêmea (esquerda) e macho (direita) do gênero *Lutzomyia*. (Fonte: Armed Forces Pest Management Board (2015)).

As fêmeas ingerem sangue para indução da ovogênese (Sales *et al.*, 2015) e, em geral, esse processo ocorre à noite ou no crepúsculo, mas também podem realiza-lo durante o dia em áreas de florestas (Brazil *et al.*, 2015). A absorção do sangue não ocorre diretamente dos vasos sanguíneos, visto que suas peças bucais são curtas. Para isso dilaceram a pele dos hospedeiros e alimentam-se do sangue minado de capilares superficiais (Spiegel *et al.*, 2005). A saliva dos flebotomíneos possui uma variedade de moléculas bioativas que facilita o repasto sanguíneo, pois ajudam a localizar os vasos, além de interromper o processo hemostático do hospedeiro (Coutinho-Abreu e Ramalho-Ortigao, 2011; Rochael *et al.*, 2013).

Insetos percebem e respondem aos estímulos ambientais utilizando sinais visuais e olfativos. A visão é importante para o acasalamento, a dispersão, forragem, oviposição e a busca de locais de descanso (Dos Santos *et al.*, 2003). Insetos, como flebotomíneos, os quais apresentam atividade noturna ou crepuscular, parecem não possuir visão de cores bem desenvolvida, no entanto, a sua capacidade para detectar contraste pode ser bem desenvolvida, o que lhes permite localizar áreas abertas e discernir forma e movimento (Allan *et al.*, 1987).

Flebótomos procuram abrigo em uma variedade de ambientes, como locais secos que apresentam microclima local favorável (buracos, cavernas, fendas), ou relativamente fresco e úmido como troncos de árvores, arbustos, fissuras nas rochas, vegetação densa, canis, estábulos, ninhos do pássaro, tocas de roedores e outros mamíferos e residências (Killick-Kendrick, 1999; Sharma e Singh, 2008; Pinheiro *et al.*, 2013).

A capacidade de dispersão dos flebotomíneos varia de acordo com o gênero, espécie e ambiente. As distâncias de afastamento dos locais de emergência variam de metros a quilômetros. Fatores ambientais tais como chuva, temperatura, velocidade do vento e

disponibilidade de alimento influenciam diretamente na presença destes vetores (Maroli *et al.*, 2013; Pinheiro *et al.*, 2013).

O acasalamento ocorre no hospedeiro ou em locais de *lekking*, tais como as bases de grandes árvores (Alexander, 2000). O comportamento de cópula varia de acordo com a espécie. Algumas espécies de flebotomíneos reconhecem seus companheiros por meio de feromônios e sons produzidos pela vibração das asas dos machos (World Health Organization, 2010).

2.2 Leishmaniose Visceral (LV)

Leishmaniose representa um complexo de doenças com importante diversidade clínica e epidemiológica, e é causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, pertencente à família Trypanosomatidae (ordem Kinetoplastida). As diferentes espécies deste gênero são transmitidas *in natura* para animais e humanos por meio da picada de flebotomos fêmeas dos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo). Outras vias de transmissão envolvem a transmissão venérea, congênita ou por transfusão de sangue infectado (Maroli *et al.*, 2013).

Existem três principais formas clínicas da leishmaniose: visceral, cutânea e mucocutânea, além de outras manifestações mais raras que incluem leishmaniose dérmica pós-calazar, leishmaniose cutânea difusa e a leishmania cutânea disseminada. As variadas formas diferem em sinais, sintomas e grau de morbidade e mortalidade (Desjeux, 2004; Gonzalez *et al.*, 2009; Barrett e Croft, 2012) e o resultado clínico da infecção em humanos é determinado pela espécie de *Leishmania*, fatores de virulência do vetor e a resposta imune do hospedeiro (Ameen, 2010).

A leishmaniose visceral é uma doença sistêmica que é fatal se não tratada e é causada pelo complexo *Leishmania donovani*, constituído pelas espécies *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum* (Lukes *et al.*, 2007). Existem dois tipos de LV, que diferem em suas características de transmissão: 1) zoonótica: transmitida de animal para vetor e deste para o ser humano e 2) antroponótica: transmitida de humano para vetor e novamente para o humano (Chappuis *et al.*, 2007)

Kuhls *et al.* (2011) em seu estudo concluiu que o agente da leishmaniose visceral no Novo Mundo é *L. infantum* e que o parasita foi importado várias vezes para o Novo Mundo a partir do sudoeste europeu. O parasita *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* foi introduzido no

Novo Mundo no século XVI por cães domésticos infectados (*Canis familiaris*) trazidos pelos conquistadores de Portugal e da região do Mediterrâneo (Brazil, 2013).

Cerca de 200 a 400 mil casos de leishmaniose visceral ocorrem por ano no mundo e mais de 90% são relatados na Índia, Bangladesh, Sudão, Etiópia e Brasil (Alvar *et al.*, 2012; Chowdhury *et al.*, 2014). Este último responde por 97% dos casos humanos da doença (Lara-Silva Fde *et al.*, 2015).

A transmissão de leishmaniose visceral tem sido relatada em mais de 1.600 municípios em 19 dos 27 estados brasileiros, estando presente em todas as regiões do país (Rangel e Vilela, 2008). Nos últimos anos, a doença se expandiu para cidades de médio e grande porte, nas quais ações de vigilância e controle foram intensificadas na tentativa de controlar a erradicação desta doença (Lara-Silva Fde *et al.*, 2015).

Fatores como a migração desordenada da população para os centros urbanos, ampliando ambientes com péssimas condições sanitárias, expansões habitacionais para as proximidades de vetores silvestres da leishmaniose visceral, modificações nos ecossistemas, adaptação dos insetos a novos ambientes, decomposição de matéria orgânica nos abrigos de animais peridomiciliares favorecem a periurbanização da leishmaniose e, assim, resultando na ampliação de áreas endêmicas da LV no Brasil (Macedo-Silva *et al.*, 2014; Brazil *et al.*, 2015). Segundo De Abreu *et al.* (2015) a migração de pessoas, juntamente com o seus cães, fugindo da pobreza, desnutrição, más condições de habitação, mudanças ambientais e migração de pessoas susceptíveis para áreas endêmicas contribuíram para o surgimento dessa doença nas regiões Norte, Sudeste e Centro-Oeste nos anos 2000.

Para Sanguinette Cde *et al.* (2015), diante das mudanças significativas nas taxas de distribuição e mortalidade da LV desde 1980, quatro novos padrões têm sido observados: transmissão da doença em áreas totalmente urbanizadas; rápida disseminação em cidades do Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste; aumento no número de casos em meio urbano comparado às áreas rurais e surgimento de epidemias urbanas em ciclos de dez anos. Assim, visando a redução do número de casos da LV, diferentes frentes de controle têm sido propostas. Segundo Romero e Boelaert (2010), medidas de controle contra reservatórios caninos e insetos vetores não têm obtido sucesso. Dessa forma, a detecção e tratamento precoce de casos humanos continuam sendo a estratégia mais importante na redução da letalidade.

Quanto ao tratamento, existem, atualmente, no mercado duas formulações de derivados pentavalentes disponíveis para o tratamento da leishmaniose visceral: stibogluconato de sódio e o antimoniato-N-metil glucamina. No Brasil, a única formulação disponível é o antimoniato N-metil glucamina, a qual é distribuída pelo Ministério da Saúde.

Entretanto, tratamentos alternativos também podem ser utilizados (Brasil, 2014). Outras drogas como a paromomicina (aminosidina, monomicina) e miltefosina também podem ser utilizadas (Barrett e Croft, 2012).

2.3 *Lutzomyia longipalpis* e a leishmaniose visceral no Brasil

A classificação mais aceita entre os entomologistas é que os flebotomíneos estão divididos em seis gêneros pelo mundo: *Lutzomyia*, *Brumptomyia* e *Warileyia* que são encontrados no novo mundo; e os gêneros *Phlebotomus*, *Sergentomyia* e *Chinius*, encontrados no velho mundo (Bastos, 2012; Maroli *et al.*, 2013). Entre os gêneros de flebotomíneos do Novo Mundo, o *Lutzomyia*, além de ter importância epidemiológica, é o mais abundante e o de maior distribuição geográfica, com representantes desde os Estados Unidos até o norte da Argentina (Rangel e Lainson, 2003). Nas Américas, existem aproximadamente 400 espécies de flebotomíneos pertencentes a este gênero que é formado por 15 subgêneros, 11 grupos de espécies e duas espécies com descrição deficiente (Young e Duncan, 1994).

A espécie *Lutzomyia longipalpis* é de grande distribuição geográfica e pode ser encontrada do México até a Argentina (Young e Duncan, 1994). Como todos os flebotomíneos, *Lutzomyia longipalpis* é primordialmente uma espécie silvestre, podendo ser capturada em florestas primárias afastadas de habitações humanas (Lainson e Rangel, 2005; Vale, 2008). Este inseto tem provado estar bem adaptado a diferentes ambientes, alcançando altas densidades populacionais em áreas rurais e periurbanas (Balbino *et al.*, 2006). O *Lutzomyia longipalpis* adapta-se facilmente ao peridomicílio e a variadas temperaturas, podendo ser encontrado no interior dos domicílios e em abrigos de animais domésticos. (Brasil, 2006). A dispersão de populações peridomésticas desses dípteros podem ultrapassar 500 metros do sítio de liberação (Morrison *et al.*, 1993).

Lutzomyia longipalpis está envolvido na transmissão da *Leishmania infantum*, o agente etiológico da LV na América Latina, sendo considerado o principal vetor da doença (Lainson *et al.*, 1977; Santos *et al.*, 2013; Macedo-Silva *et al.*, 2014). Segundo Pinto *et al.* (2010), existe uma associação epidemiológica entre *Leishmania infantum* e o *Lutzomyia longipalpis* embasada em fatores como: a) ocorrência de leishmaniose visceral humana e canina associados à distribuição geográfica e ecológica desta espécie de flebotomíneos; b) constatação de *Lutzomyia longipalpis* naturalmente infectados com *Leishmania infantum*; c) infecção experimental de *Lutzomyia longipalpis* com *Leishmania infantum*; d) atração de

Lutzomyia longipalpis por reservatórios de *Leishmania infantum* (cães e raposas); e) transmissão experimental de *Leishmania infantum* por *Lutzomyia longipalpis* infectado.

No Brasil, *Lutzomyia longipalpis* é um exemplo de um complexo de espécies vetoras incipientes (Bauzer *et al.*, 2007). Para Balbino *et al.* (2006) o aumento considerável da caracterização genética de *Lutzomyia longipalpis* baseada nos cromossomos, morfologia, bioquímica e caracteres moleculares indica a existência de um provável complexo formado por um número desconhecido de espécies. Independente do número de espécies crípticas, *Lutzomyia longipalpis* foi detectado em diversas condições ecológicas, o que pode refletir no seu sucesso na dispersão e adaptação. Além do que, *Lutzomyia longipalpis* pode ter se originado da vegetação aberta do cerrado brasileiro, fato este que seria importante na compreensão da capacidade deste inseto em explorar novos ambientes, mesmo em áreas artificiais (Morrison *et al.*, 1993).

Com relação à disseminação de *Leishmania infantum* no Brasil, Rangel e Vilela (2008) relacionam a urbanização da leishmaniose visceral no país com a presença do vetor *Lutzomyia longipalpis*. Para estes autores, a história epidemiológica da leishmaniose visceral no Brasil tem mostrado um papel constante desse vetor como um elo essencial na cadeia de transmissão. Sua capacidade de alimentação em animais domésticos e sinantrópicos, bem como a sua antropofilia, favorecem o inseto na sua adaptação a ambientes modificados, permitindo, entretanto, a manutenção do ciclo de transmissão da leishmaniose visceral no ambiente rural e sua disseminação para áreas urbanizadas. Por conseguinte, a presença de *Lutzomyia longipalpis* nas proximidades das habitações humanas permite o estabelecimento de um ciclo doméstico de leishmaniose visceral, onde os cães desempenham um papel importante na transmissão (Balbino *et al.*, 2006). Segundo Pinheiro *et al.* (2013), todas as regiões do Brasil apresentam casos de leishmaniose visceral

2.3.1 Leishmaniose Visceral no Piauí

A leishmaniose visceral no Estado do Piauí tem sido relatada desde 1934 (Vexenat *et al.*, 1994). A partir de 1980, observou-se uma epidemia estadual, concentrando-se especialmente na área urbana da capital, Teresina, onde no ano de 1984 atingiu o pico epidêmico respondendo por mais de 60% dos 1.509 casos de leishmaniose em todo o estado (Costa *et al.*, 1990). Segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) do Ministério da Saúde, no ano de 2013 foram confirmados 398 casos de leishmaniose visceral no Piauí, sendo 212 destes, apenas de indivíduos que declararam residir no referido estado. Analisando especificamente o município de Teresina, foram confirmados

357 casos, onde 175 são de indivíduos residentes no estado e 71 que residem no próprio município (SINAN 2015).

A expansão da leishmaniose visceral em cidades como Teresina-PI e São Luís-MA nos anos 1980 motivou a realização de estudos epidemiológicos, os quais incluíam o foco no vetor *Lutzomyia longipalpis* (Costa *et al.*, 1990; Vexenat *et al.*, 1994; Rangel e Vilela, 2008).

Inúmeros estudos realizados na cidade de Teresina verificaram que as variáveis climáticas podem contribuir para a predição não apenas da abundância de flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis*, mas também do seu grau de infecção natural. Além disso, acredita-se que a presença de insetos infectados depende da existência de cães com leishmaniose visceral nas imediações ou de reservatórios sinantrópicos no ambiente (Silva *et al.*, 2007). Para Cerbino Neto *et al.* (2009) a distribuição espacial da leishmaniose visceral na área urbana dessa cidade durante a década de 90 foi heterogênea, estando sua incidência associada aos bairros periféricos com maior cobertura vegetal, submetidos à ocupação rápida e sem infraestrutura sanitária adequada.

Trabalhos como os descritos anteriormente tornam-se de extrema importância visto que a identificação de fatores e áreas de alto risco para LV pode ser uma estratégia útil para aumentar a eficácia de medidas de controle e otimizar os custos operacionais no contexto urbano (De Almeida *et al.*, 2011).

2.3.2 Ciclo de vida do parasita

O ciclo de vida de espécies de *Leishmania* é do tipo heteroxeno, ou seja, envolve duas etapas onde, em hospedeiros mamíferos, os parasitas são observados como amastigotas intracelulares apresentando forma arredondada ou ovalada e imóvel, mas após o repasto sanguíneo e, engatilhado pelas alterações de temperatura e pH entre mamíferos e o intestino dos insetos os protozoários, sofrem modificações dando origem às formas extracelulares móveis que apresentam flagelo na extremidade anterior, os promastigotas procíclicos, os quais possuem capacidade multiplicativa. Posteriormente, os promastigotas procíclicos diferenciam-se na forma infectante, promastigota metacíclico, a qual é transmitida para o hospedeiro mamífero (Bates and Rogers 2004; Kamhawi 2006; Bates 2007) (Figura 2). É importante ressaltar que os promastigotas procíclicos necessitam se fixar ao intestino dos flebotomos para evitar serem excretados junto com as fezes dos insetos (Killick-Kendrick, 1999; Sacks, 2001; Kato *et al.*, 2010).

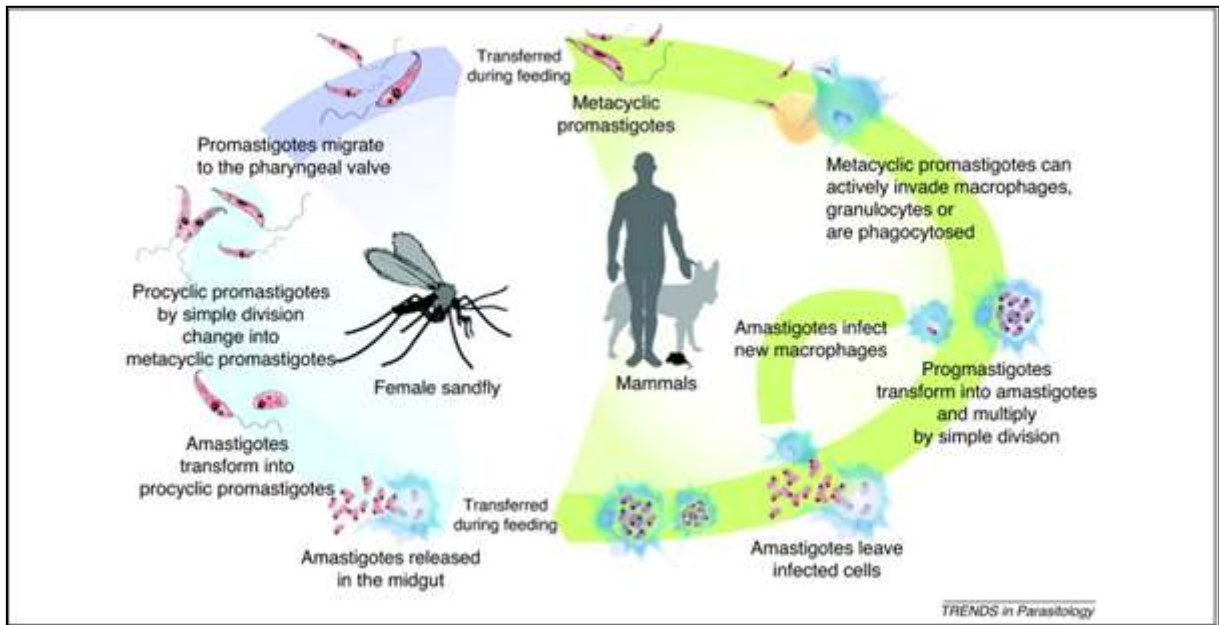


Figura 2. Ciclo de vida de espécies do gênero *Leishmania* causadoras da leishmaniose. (Fonte: Harhay *et al.*, (2011)).

2.4 Medidas preventivas e de combate ao vetor

Objetivando a constante redução do número de casos, algumas medidas podem ser adotadas, tais como de uma consciência permanente na educação em saúde e rigorosa vigilância. Avanços metodológicos, como um poderoso sistema de informação geográfica e sensoriamento remoto também podem contribuir positivamente. Além disso, alguns fatores de risco podem ser reduzidos através da aplicação de estratégias de controle sob medida para cada entidade eco-epidemiológica, ajustando essas estratégias para qualquer nova mudança ambiental e melhorando-as através de pesquisas específicas. A coordenação multidisciplinar eficiente entre a saúde e outros setores governamentais, como a educação, agricultura, água, florestas e outros recursos naturais, é também crucial para a prevenção e controle de fatores de risco importantes (Desjeux, 2001). Como medida ecológica preventiva pode-se acrescentar que o conhecimento local e regional das espécies de flebotômíneos e de seus parâmetros populacionais são importantes, uma vez que são vetores naturais de leishmanioses que acometem animais e seres humanos (Almeida *et al.*, 2010).

Para Alexander e Maroli (2003), as medidas utilizadas para controle de flebotômíneos adultos (*Lutzomyia* e *Phlebotomus*) incluem o uso de colares para cães e proteção individual através da aplicação de repelentes/inseticidas na pele ou tecidos, uso de inseticidas piretróides principalmente para pulverização residual das habitações e abrigos de animais, além de borrifação espacial. Entretanto, as fêmeas da maioria das espécies são predominantemente

exofágicas e exofílicas e, assim, não podem ser controladas pela pulverização da casa com inseticidas, ao contrário das espécies endofílicas (Killick-Kendrick, 1999).

Em trabalhos realizados por Falcao *et al.* (1991) e Costa *et al.* (2007), verificou-se que a pulverização obteve efeito protetor, aumentando o controle vetorial, a nível intradomiciliar, mas foi ineficaz no exterior das casas. Porém Kelly *et al.* (1997) alertam para o cuidado com programas de controle de vetores utilizando borrifação de inseticidas, visto que as possíveis consequências de deixar alguns locais não tratados incluem um controle ineficiente da abundância peridoméstica de flebotomíneos e um aumento da taxa de picadas em cães e seres humanos.

Como uma alternativa de combate ao vetor da leishmaniose, tem-se testado o efeito repelente/inseticida de extratos vegetais e, nesse sentido, algumas plantas como *Ricinus communis* (Euphorbiaceae), *Solanum jasminoides* (Solanaceae), *Bougainvillea glabra* (Nyctaginaceae), *Capparis spinosa* (Capparidaceae), *Acalypha fruticosa* (Euphorbiaceae) e *Tagetes minuta* (Asteraceae) mostraram-se efetivas contra flebotomíneos (Dinesh *et al.*, 2014).

Embora várias alternativas possam ser utilizadas, é importante destacar que áreas peridomiciliares caracterizadas por solos secos e limpos, pátios bem varridos, poucas árvores ornamentais ou frutíferas adjacentes às casas e abrigos de animais bem cuidados, fornecem condições ambientais inadequadas para reprodução ou repouso de flebotomíneos (Teodoro *et al.*, 1997; Dos Santos *et al.*, 2003)

2.5 Interação Flebotomíneos - Plantas

Em trabalho realizado por Rutledge e Ellenwood (1975) em uma floresta do Panamá, verificou-se que a interação entre a vegetação e flebotomíneos determina o padrão de origem de diferentes espécies desses insetos. Estes autores verificaram que a vegetação composta por largas árvores e lianas apresentou efeitos distintos sobre o solo e isto refletiu na composição das espécies de flebotomíneos, onde espécies como *Lutzomyia pessoana* e *Lutzomyia panamensis* tendiam a ser mais abundantes em associação com grandes árvores do gênero *Anacardium*, enquanto que *Lutzomyia trapidoi* e *Lutzomyia rorotaensis* prevaleciam em associação com grandes lianas dos gêneros *Ouroouparia* e *Sabicea*.

Sabendo da interação entre flebotomíneos e plantas, e diante da disseminação da leishmaniose visceral no Brasil, Costa (2008) sugere uma relação entre espécies vegetais específicas que particularmente atraíam *Lutzomyia longipalpis* ou que de alguma forma

forneçam proteção contra predadores, o que resultaria na proliferação do vetor nas áreas onde esta planta é abundante. O referido autor sugere as acácias, plantas exóticas invasoras do Brasil, como sendo uma dessas prováveis plantas.

Segundo Cameron *et al.* (1995) foi verificada uma variação significativa na abundância de flebotomíneos entre diferentes tipos de vegetação, onde *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) foi mais abundante em culturas de feijão e milho do que no matagal aberto e árvore circundante.

Existe uma interação direta ou indireta entre flebotomíneos e plantas visando a obtenção de açúcar, visto que necessitam de carboidratos como fonte energética e para reprodução, e obtêm esse composto diretamente de tecidos vegetais ou indiretamente no material liberado por coccídeos e afídeos (Schlein e Jacobson, 1999; Mascari e Foil, 2010; Warburg e Faiman, 2011). Cameron *et al.* (1995) detectaram relações significativas entre a abundância de flebotomíneos e afídeos, sugerindo o líquido açucarado liberado pelos afídeos como uma fonte de alimento em potencial para os dípteros. Segundo Jacobson *et al.* (2007), os principais carboidratos encontrados no líquido açucarado dos afídeos são frutose, glicose e sacarose, porém outros sacarídeos também são encontrados em flebotomíneos, incluindo maltose, maltotriose, trealose, turanose, rafinose e melibiose.

Inúmeros estudos com diferentes espécies de flebotomíneos verificaram que uma ampla gama de plantas serve como fonte alimentar, tais como *Coffea arabica* e *Bambusa angustifolia* (Alexander e Usma, 1994), *Prosopis farcta* e *Ricinus communis* (Schlein e Muller, 1995), *Ochradenus baccatus*, *Prosopis farcta* e *Tamarix nilótica* mostraram-se mais atrativas em estudo realizado por Muller *et al.* (2011a). Além do que, a alimentação pode ocorrer em áreas arbórea, arbustiva ou gramada (Pinheiro *et al.*, 2013).

Segundo Muller e Schlein (2011), a busca dos flebotomíneos por fontes de carboidratos são primariamente guiadas pela preferência por fatores atrativos. Estes fatores podem ser a composição dos carboidratos presentes em determinadas plantas ou famílias, a alta emissão de CO₂, ocorrendo em ramos com maiores concentrações de açúcares, que pode ser detectada pelos insetos (Schlein e Jacobson, 2008), ou mesmo a liberação de fitoquímicos afetando o sistema olfativo (Foster, 2008; Machado *et al.*, 2015).

Para Muller *et al.* (2011b), que avaliaram o índice de atração de *Phlebotomus papatasi* por diferentes espécies de plantas, os fitoquímicos possuem diferentes potenciais atrativos para os insetos. Magalhaes-Junior *et al.* (2014) verificaram que compostos voláteis de plantas, 1-octen-3-ol, 1-nonanol e 1-heptanol, podem atuar como fatores atrativos para insetos da espécie *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva).

Os flebotomíneos obtêm o açúcar necessário para suas atividades vitais a partir de várias espécies de plantas, porém algumas delas têm efeito negativo sobre os insetos como, por exemplo, *Solanum jasminoides*, *Ricinus communis*, ou *Bougainvillea glabra*, as quais reduzem significativamente o tempo de vida desses dípteros (Schlein *et al.*, 2001). Ainda segundo estes autores *B. glabra* proporciona proteção local contra picadas de flebotomíneos e diminui o risco de leishmaniose.

Nas últimas décadas estudos sobre a interação entre plantas e insetos têm revelado que metabólitos secundários vegetais, ou aleloquímicos, podem ser utilizados no controle de pragas (Pavela, 2004). Como exemplo disto, foi verificado que óleos essenciais de eucalipto mostram eficácia interferindo nas diferentes fases do desenvolvimento de *Lutzomyia longipalpis*, sendo o óleo de *E. staigeriana* o mais eficaz em todas as fases, assim constituindo uma alternativa viável para o controle do vetor de leishmaniose visceral (Maciel *et al.*, 2010). Ainda contra este vetor, isoflavonóides encontrados em vários gêneros de plantas leguminosas tropicais, como Derris (Papilionaceae), Antonia (Loganiaceae) e Lonchocarpus (Fabaceae), mostraram propriedades inseticidas (Dinesh *et al.*, 2014).

Outro aspecto a ser considerado quando se aborda a dieta vegetal dos flebotomíneos é que esta pode influenciar negativamente na sua capacidade de transmitir leishmaniose, reduzindo os índices de infecção do vetor pelo protozoário (Schlein e Jacobson, 1994) ou afetando diretamente o vetor (Junnila *et al.*, 2011). Segundo Coutinho-Abreu e Ramalho-Ortigao (2011), os carboidratos estão envolvidos na definição do perfil da saliva desses dípteros e podem influenciar na sua capacidade vetorial.

2.6 Tecnologia do DNA barcode (código de barras) associada às plantas

Testes laboratoriais como reação com antrona fria, método de coloração de celulose para detecção de tecido de plantas e cromatografia gasosa, são capazes de demonstrar que os insetos ingeriram carboidratos, determinar se este açúcar é de origem vegetal, e mostrar o tipo de açúcar que está presente no intestino do inseto, porém, nenhum deles é capaz de identificar de qual planta o inseto alimentou-se (Junnila *et al.*, 2011). Assim, a utilização de ferramentas moleculares capazes de identificar o conteúdo alimentar vegetal a nível espécie-específico torna-se promissora, e, atualmente, o DNA barcode tem sido amplamente utilizado com este propósito.

O DNA barcode consiste na utilização de sequências curtas de DNA (~ 650 pb) de um segmento padrão do genoma para a identificação de espécies em larga escala (Bafeel *et al.*,

2011). Esse método pode identificar espécies previamente descritas, porém diante de tamanha biodiversidade existente hoje, também deve fornecer meios para resolver questões essenciais que envolvam espécies não descritas e completamente desconhecidas (Rubinoff *et al.*, 2006).

Para Savolainen *et al.* (2005) os benefícios científicos do DNA barcoding incluem a identificação das espécies em qualquer estágio da vida; facilitar a descoberta de espécies com base na análise de agrupamento das sequências gênicas; promover o desenvolvimento da tecnologia portátil de sequenciamento do DNA, a qual pode ser aplicada no campo para inventários de biodiversidade; e proporcionar uma visão sobre a diversidade da vida.

O primeiro registro da utilização da técnica de DNA barcode na identificação de espécies foi feito no estudo realizado por Hebert *et al.* (2003), os quais estavam convencidos de que a capacidade de identificação consistente, reside na construção de sistemas que empregam sequências de DNA como "código de barras" para os táxons. Estes autores estabeleceram que uma sequência padronizada do DNA mitocondrial, no caso o gene da citocromo *c* oxidase I (COI), poderia servir como o núcleo de um sistema de bioidentificação global para animais.

Segundo Cbol Plant Working Group (2009), embora o sistema de identificação de espécies animais baseadas no gene COI seja uma ferramenta bem sucedida, para plantas, a baixa taxa de troca de bases no DNA mitocondrial, levou à busca por regiões alternativas para utilização do barcoding.

Diante do princípio do DNA barcode, que é a identificação de espécies biológicas de forma padronizada e de alto rendimento, Ford *et al.* (2009) propuseram que a região escolhida do DNA da planta deveria ser: 1) rotineiramente amplificável; 2) facilmente sequenciada; 3) suficientemente variável para separar a maioria das espécies irmãs, além de garantir que a variação abaixo do nível de espécie (subespécie, raça) não será confundida com espécies separadas; 4) insensível na amplificação de outros *loci* além da região alvo; e 5) facilmente anotada para a avaliação crítica da qualidade da sequência e detecção de erros.

Pesquisadores de plantas propuseram várias regiões diferentes para o barcode, com foco em regiões codificantes, tais como os genes *rpoB*, *rpoC1*, *rbcL* e *matK*, e não codificantes, espaçadores intergênicos *trnH-psbA*, *atpF-atpH* and *psbK-psbI*, localizados, no genoma plastidial (Fazekas *et al.*, 2008; Bruni *et al.*, 2010). Nesse sentido, vários estudos foram realizados utilizando diferentes regiões de DNA barcode em plantas (Presting, 2006; Chase *et al.*, 2007; Kress e Erickson, 2007; Taberlet *et al.*, 2007; Hollingsworth *et al.*, 2009; De Groot *et al.*, 2011; Khan *et al.*, 2013);

No estudo realizado por Cbol Plant Working Group (2009), comparando o desempenho de sete regiões do DNA plastidial candidato ao barcode, a combinação entre os loci *rbcL* e *matK* mostrou-se a mais promissora para plantas. Outros trabalhos envolvendo diferentes espécies vegetais têm sido reportados na literatura utilizando a combinação entre *matK* e *rbcL* (Harrington *et al.*, 2005; Bafeel *et al.*, 2011; Burgess *et al.*, 2011; Khew e Chia, 2011; Li *et al.*, 2011; Saarela *et al.*, 2013)

O gene plastidial da maturase K (*matK*) apresenta características que tornam apropriada sua utilização na proposta do DNA barcode: 1) é altamente conservado (Selvaraj *et al.*, 2008), 2) evolui mais rapidamente que o *rbcL* (Johnson e Soltis, 1994; Hilu *et al.*, 2003; Penjor *et al.*, 2013); 3) possui comprimento adequado e óbvia divergência interespecífica, bem como uma baixa taxa de transição/transversão (Li *et al.*, 2015); e 4) possui alta taxa de substituição (Hilu e Liang, 1997). Entretanto o *matK* exibe baixa taxa de amplificação e sequenciamento devido à baixa universalidade dos iniciadores atualmente disponíveis e repetições mononucleotídicas (Yu *et al.*, 2011).

O gene da subunidade maior da ribulose-1,5-bifosfato carboxilase (*rbcL*) é amplamente utilizado em investigações filogenéticas, existindo milhares de sequências depositadas em bases de dados públicas, além de protocolos de rotina para geração de sequências. A sua utilização no DNA barcode é justificada por fatores como: 1) sua facilidade de amplificar, sequenciar e alinhar na maioria das plantas terrestres (Li *et al.*, 2015); 2) é o gene melhor caracterizado e um componente frequente na realização de combinações de multi-locus para discriminação de espécies (Cbol Plant Working Group, 2009); e 3) geralmente usado para determinar as relações evolutivas no nível de gênero e acima deste (Kress *et al.*, 2005).

Para Dong *et al.* (2015) embora várias regiões do genoma plastidial tenham sido propostas, a maior parte dos barcode plastidiais apresentam falta de resolução a nível de espécie. Ainda segundo estes autores, a identificação de DNA barcode de alta resolução ao nível de espécie é crítico para o sucesso do DNA barcode em plantas.

Em termos de utilização do DNA barcode para identificação de plantas, é importante levar em consideração o poder discriminatório da técnica. Embora existam situações onde a abordagem atual da técnica resulte apenas na identificação de um grupo de espécies em vez da identificação individual, vale destacar que, para algumas aplicações, mesmo um DNA barcode com poder relativamente modesto de discriminação pode ser útil (Hollingsworth *et al.*, 2011).

2.6.1 Utilização do DNA barcode na identificação de interações alimentares inseto-plantas

As informações obtidas a partir do DNA barcode podem ser utilizadas para diversos fins incluindo a avaliação da biodiversidade e rápida análise da cadeia alimentar, monitorização de espécies protegidas, identificação precoce de espécies invasoras (pragas), identificação de patógenos de importância médica e seus vetores e identificação de compostos ativos (Pecnikar e Buzan, 2014).

Para Gravendeel *et al.* (2009) muitas interações inseto-planta ainda são desconhecidas e observações de campo são muitas vezes escassas e incompletas. Para aumentar o conhecimento sobre a ecologia de insetos e plantas, mais dados sobre esta relação são urgentemente necessários.

Nesse sentido, o rápido aumento de informações contidas em bibliotecas de DNA barcode vegetal, a partir dos vários *loci* propostos para esta metodologia, tem melhorado a precisão e a velocidade na identificação de plantas hospedeiras (Jurado-Rivera *et al.*, 2009). Além disso, essas informações podem ser utilizadas também na identificação das espécies vegetais presentes no trato digestório dos insetos, visto que, as bibliotecas são utilizadas para comparar e identificar sequências de DNA barcode recuperadas de amostras desconhecidas (Kress *et al.*, 2015).

Atualmente, inúmeros trabalhos que realizaram a identificação de conteúdo alimentar vegetal em invertebrados utilizaram, para isso, regiões conservadas do genoma do cloroplasto (Gravendeel *et al.*, 2009; Jurado-Rivera *et al.*, 2009; Pumarino *et al.*, 2011; Staudacher *et al.*, 2011; Garcia-Robledo *et al.*, 2013; Wallinger *et al.*, 2013).

Em relação aos flebotomíneos, Junnila *et al.* (2011) identificaram a fonte alimentar vegetal de *Phlebotomus papatasi* a partir de sequências de DNA geradas pela utilização de iniciadores para o gene *rbcL*, presente no genoma do cloroplasto.

3 CONCLUSÃO

Diante da influência vegetal sobre a presença e capacidade vetorial dos flebotomíneos, responsáveis na grande maioria dos casos pela disseminação das diferentes formas de leishmaniose, dentre as quais a leishmaniose visceral que pode causar mortes, percebe-se a importância do uso de metodologias que possam identificar as plantas que atuam positiva e negativamente na biologia tanto do vetor quanto do parasita. Assim, a utilização do DNA barcode torna-se promissora, pois a partir dos resultados obtidos, estratégias de paisagismo

podem ser propostas nas localidades de incidência de leishmanioses, visando o controle da disseminação desse conjunto de doenças, na forma de erradicação do vetor ou mesmo na impossibilidade deste em abrigar e transmitir o agente etiológico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, B. Sampling methods for phlebotomine sandflies. **Med Vet Entomol**, v. 14, n. 2, p. 109-122, Jun 2000.
- ALEXANDER, B.; MAROLI, M. Control of phlebotomine sandflies. **Med Vet Entomol**, v. 17, n. 1, p. 1-18, 2003.
- ALEXANDER, B.; USMA, M. C. Potential Sources of Sugar for the Phlebotomine Sandfly *Lutzomyia-Youngi* (Diptera, Psychodidae) in a Colombian Coffee Plantation. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 88, n. 5, p. 543-549, Oct 1994.
- ALLAN, S. A.; DAY, J. F.; EDMAN, J. D. Visual Ecology of Biting Flies. **Annual Review of Entomology**, v. 32, p. 297-316, 1987.
- ALMEIDA, P. S. D. et al. Aspectos ecológicos de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área urbana do município de Ponta Porã, Estado de Mato Grosso do Sul. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 43, p. 723-727, 2010.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.
- AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 35, n. 7, p. 699-705, Oct 2010.
- ANDRADE, A. R. O. D. et al. Epidemiological study on leishmaniasis in an area of environmental tourism and ecotourism, State of Mato Grosso do Sul, 2006-2007. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 42, p. 488-493, 2009.
- ANDRADE, J. D.; BRAZIL, R. P. Relationships of New World phlebotomine sand flies (Diptera : Psychodidae) based on fossil evidence. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 145-149, 2003.
- ANEZ, N. et al. Sugars in the alimentary canal of *Lutzomyia youngi* (Diptera: phlebotominae). **Med Vet Entomol**, v. 8, n. 1, p. 38-42, Jan 1994.
- ANNANG, F. et al. High-Throughput Screening Platform for Natural Product-Based Drug Discovery Against 3 Neglected Tropical Diseases: Human African Trypanosomiasis, Leishmaniasis, and Chagas Disease. **J Biomol Screen**, v. 20, n. 1, p. 82-91, Jan 2015.
- ARANSAY, A. M. et al. Phylogenetic relationships of phlebotomine sandflies inferred from small subunit nuclear ribosomal DNA. **Insect Mol Biol**, v. 9, n. 2, p. 157-168, Apr 2000.

ARMED FORCES PEST MANAGEMENT BOARD. **Sand Flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): significance, surveillance, and control in contingency operations.** . Armed Forces Pest Management Board, Technical Guide No. 49 2015.

AZAR, D.; NEL, A. Fossil psychodoid flies and their relation to parasitic diseases. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 35-37, 2003.

BAFEEL, S. O. et al. Comparative evaluation of PCR success with universal primers of maturase K (matK) and ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase oxygenase large subunit (rbcL) for barcoding of some arid plants. **Plant Omics**, v. 4, n. 4, p. 195-198, Jul 2011.

BALBINO, V. D. et al. Genetic structure of natural populations of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera : Psychodidae) from the Brazilian northeastern region. **Acta Trop**, v. 98, n. 1, p. 15-24, Apr 2006.

BARRETT, M. P.; CROFT, S. L. Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. **British Medical Bulletin**, v. 104, n. 1, p. 175-196, Dec 2012.

BASTOS, T. S. A. **Estudos introdutórios sobre flebotomíneos.** Universidade Federal de Goiás. 2012. (Dissertação de mestrado)

BAUZER, L. G. et al. *Lutzomyia longipalpis* in Brazil: a complex or a single species? A mini-review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 1-12, 2007.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral.** Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL, M. D. S. **Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde.** 2 ed. atual Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010.

_____. **Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica.** 1. ed., 5. reimpr. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRAZIL, R. P. The dispersion of *Lutzomyia longipalpis* in urban areas. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 46, p. 263-264, 2013.

BRAZIL, R. P.; RODRIGUES, A. A. F.; FILHO, J. D. A. Sand Fly Vectors of Leishmania in the Americas - A Mini Review. **Entomology, Ornithology & Herpetology**, v. 4, n. 2, 2015.

BRUNI, I. et al. Identification of poisonous plants by DNA barcoding approach. **International Journal of Legal Medicine**, v. 124, n. 6, p. 595-603, Nov 2010.

BURGESS, K. S. et al. Discriminating plant species in a local temperate flora using the rbcL plus matK DNA barcode. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 2, n. 4, p. 333-340, Aug 2011.

- CAMERON, M. M. et al. Sugar meal sources for the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Ceará State, Brazil. **Med Vet Entomol**, v. 9, n. 3, p. 263-272, 1995.
- CARVALHO, B. M. et al. Leishmaniasis transmission in an ecotourism area: potential vectors in Ilha Grande, Rio de Janeiro State, Brazil. **Parasit Vectors**, v. 6, n. 1, p. 325, 2013.
- CASARIL, A. E. et al. Spatiotemporal analysis of sandfly fauna (Diptera: Psychodidae) in an endemic area of visceral leishmaniasis at Pantanal, central South America. **Parasit Vectors**, v. 7, p. 364, 2014.
- CBOL PLANT WORKING GROUP. A DNA barcode for land plants. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 31, p. 12794-7, Aug 4 2009.
- CERBINO NETO, J.; WERNECK, G. L.; COSTA, C. H. Factors associated with the incidence of urban visceral leishmaniasis: an ecological study in Teresina, Piauí State, Brazil. **Cad Saude Publica**, v. 25, n. 7, p. 1543-51, Jul 2009.
- CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat Rev Micro**, 2007.
- CHASE, M. W. et al. A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants. **Taxon**, v. 56, n. 2, p. 295-299, May 2007.
- CHOWDHURY, R. et al. How Far Are We from Visceral Leishmaniasis Elimination in Bangladesh? An Assessment of Epidemiological Surveillance Data. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 8, p. e3020, 2014.
- CLABORN, D. M. The Biology and Control of Leishmaniasis Vectors. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 127-134, May-Aug 2010.
- CONLEY, A. K.; WATLING, J. I.; ORROCK, J. L. Invasive plant alters ability to predict disease vector distribution. **Ecol Appl**, v. 21, n. 2, p. 329-34, Mar 2011.
- COSTA, C. H. N. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cad Saude Publica**, v. 24, p. 2959-2963, 2008.
- COSTA, C. H. N.; PEREIRA, H. F.; ARAÚJO, M. A. Epidemia de leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. **Rev Saúde Pública** v. 24, p. 361-72, 1990.
- COSTA, C. H. N.; TAPETY, C. M. M.; WERNECK, G. L. Controle da leishmaniose visceral em meio urbano: estudo de intervenção randomizado fatorial. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 40, p. 415-419, 2007.
- COUTINHO-ABREU, I. V.; RAMALHO-ORTIGAO, M. Ecological genomics of sand fly salivary gland genes: an overview. **Journal of Vector Ecology**, v. 36 Suppl 1, p. S58-63, Mar 2011.

DE ABREU, C. R. et al. Description of six autochthonous cases of canine visceral leishmaniasis diagnosed in Pedregulho (Sao Paulo, Brazil). **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 24, n. 2, p. 216-9, Apr-Jun 2015.

DE ALMEIDA, A. S.; MEDRONHO R DE, A.; WERNECK, G. L. Identification of risk areas for visceral leishmaniasis in Teresina, Piaui State, Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, v. 84, n. 5, p. 681-7, May 2011.

DE ANDRADE, A. R. O. et al. Phlebotomine fauna in the Ponta Porã city: epidemiological importance in border line between Brazil and Paraguay. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 2, n. 5, p. 362-366, 2012.

DE CARVALHO, M. R. et al. Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (Franca, 1920) (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. **Acta Trop**, v. 116, n. 1, p. 108-110, Oct 2010.

DE GROOT, G. A. et al. Use of rbcL and trnL-F as a Two-Locus DNA Barcode for Identification of NW-European Ferns: An Ecological Perspective. **PLoS One**, v. 6, n. 1, Jan 26 2011.

DEBNATH, D. **Characterization of Transplasma Membrane Electron Transport Chain In Wild and Drug Resistant Leishmania Donovanii Promastigote And Amastigote.** Jadavpur University. 2013. (Dissertação de mestrado)

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 95, n. 3, p. 239-43, May-Jun 2001.

_____. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v. 27, n. 5, p. 305-18, Sep 2004a.

_____. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305-318, Sep 2004b.

DINESH, D. S. et al. The potentiality of botanicals and their products as an alternative to chemical insecticides to sandflies (Diptera: Psychodidae): a review. **J Vector Borne Dis**, v. 51, n. 1, p. 1-7, Mar 2014.

DONG, W. P. et al. ycf1, the most promising plastid DNA barcode of land plants. **Scientific Reports**, v. 5, Feb 12 2015.

DOS SANTOS, S. O. et al. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. **Med Vet Entomol**, v. 12, n. 3, p. 315-317, Jul 1998.

DOS SANTOS, T. G.; GAIA, M. C. D.; BRAZIL, R. P. Attraction of sand flies (Diptera : Psychodidae) to light traps in rural areas of Minas Gerais State, Brazil. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 19, n. 1, p. 74-78, Mar 2003.

FALCAO, A. L. et al. Effect of Deltamethrin Spraying on the Sandfly Populations in a Focus of American Cutaneous Leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 4, p. 399-404, Oct-Dec 1991.

- FAZEKAS, A. J. et al. Multiple Multilocus DNA Barcodes from the Plastid Genome Discriminate Plant Species Equally Well. **PLoS One**, v. 3, n. 7, Jul 30 2008.
- FORD, C. S. et al. Selection of candidate coding DNA barcoding regions for use on land plants. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 159, n. 1, p. 1-11, Jan 2009.
- FRAGA, J. et al. Phylogeny of Leishmania species based on the heat-shock protein 70 gene. **Infection Genetics and Evolution**, v. 10, n. 2, p. 238-245, Mar 2010.
- GARCIA-ROBLEDO, C. et al. Tropical Plant-Herbivore Networks: Reconstructing Species Interactions Using DNA Barcodes. **PLoS One**, v. 8, n. 1, Jan 8 2013.
- GARDNER, A. M. et al. Asymmetric effects of native and exotic invasive shrubs on ecology of the West Nile virus vector Culex pipiens (Diptera: Culicidae). **Parasit Vectors**, v. 8, p. 329, 2015.
- GONZALEZ, U. et al. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 2, 2009.
- GRAVENDEEL, B.; EURLINGS, M.; HEIJERMAN, T. Use of DNA barcoding for host plant identification. **Entomologische Berichten**, v. 69, n. 2, p. 30-35, 2009.
- HARHAY, M. O. et al. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 9, p. 403-9, Sep 2011.
- HARRINGTON, M. G. et al. Phylogenetic inference in Sapindaceae sensu lato using plastid matK and rbcL DNA sequences. **Systematic Botany**, v. 30, n. 2, p. 366-382, Apr-Jun 2005.
- HEBERT, P. D. N. et al. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences**, v. 270, n. 1512, p. 313-321, Feb 7 2003.
- HILU, K.; LIANG, H. The matK gene: sequence variation and application in plant systematics. **American Journal of Botany**, v. 84, n. 6, p. 830, Jun 1997.
- HILU, K. W. et al. Angiosperm phylogeny based on matK sequence information. **American Journal of Botany**, v. 90, n. 12, p. 1758-1776, Dec 2003.
- HOLLINGSWORTH, M. L. et al. Selecting barcoding loci for plants: evaluation of seven candidate loci with species-level sampling in three divergent groups of land plants. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, n. 2, p. 439-457, Mar 2009.
- HOLLINGSWORTH, P. M.; GRAHAM, S. W.; LITTLE, D. P. Choosing and Using a Plant DNA Barcode. **PLoS One**, v. 6, n. 5, May 26 2011.
- JACOBSON, R. L.; SCHLEIN, Y.; EISENBERGER, C. L. The biological function of sand fly and Leishmania glycosidases. **Med Microbiol Immunol**, v. 190, n. 1-2, p. 51-5, Nov 2001.

- JOHNSON, L. A.; SOLTIS, D. E. Matk DNA-Sequences and Phylogenetic Reconstruction in Saxifragaceae S-Str. **Systematic Botany**, v. 19, n. 1, p. 143-156, Jan-Mar 1994.
- JUNNILA, A.; MULLER, G. C.; SCHLEIN, Y. Identification of plant tissues from the gut of *Phlebotomus papatasi* by DNA analysis. **Acta Trop**, v. 117, n. 1, p. 14-18, Jan 2011.
- JURADO-RIVERA, J. A. et al. **DNA barcoding insect–host plant associations**. 2009. 639-648 Disponível em: <
<http://rspsb.royalsocietypublishing.org/royprsb/276/1657/639.full.pdf> >.
- KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes? **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 9, p. 439-445, Sep 2006.
- KAMHAWI, S.; ASLAN, H.; VALENZUELA, J. G. Vector saliva in vaccines for visceral leishmaniasis: a brief encounter of high consequence? **Front Public Health**, v. 2, p. 99, 2014.
- KATO, H. et al. Molecular Epidemiology for Vector Research on Leishmaniasis. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 3, p. 814-826, Mar 2010.
- KELLY, D. W.; MUSTAFA, Z.; DYE, C. Differential application of lambda-cyhalothrin to control the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Med Vet Entomol**, v. 11, n. 1, p. 13-24, Jan 1997.
- KHAN, S. et al. Selection of Chloroplast DNA Markers for the Development of DNA Barcode and Reconstruction of Phylogeny of Senecio Asirensis Boulos and Jri Wood. **Pakistan Journal of Botany**, v. 45, n. 2, p. 703-710, Apr 2013.
- KHEW, G. S. W.; CHIA, T. F. Parentage determination of Vanda Miss Joaquim (Orchidaceae) through two chloroplast genes rbcL and matK. **Aob Plants**, 2011.
- KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of phlebotomine sand flies. **Clinics in Dermatology**, v. 17, n. 3, p. 279-289, May-Jun 1999.
- KRESS, W. J.; ERICKSON, D. L. A Two-Locus Global DNA Barcode for Land Plants: The Coding rbcL Gene Complements the Non-Coding trnH-psbA Spacer Region. **PLoS One**, v. 2, n. 6, Jun 6 2007.
- KRESS, W. J. et al. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 23, p. 8369-8374, Jun 7 2005.
- KUHLS, K. et al. Comparative Microsatellite Typing of New World Leishmania infantum Reveals Low Heterogeneity among Populations and Its Recent Old World Origin. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 6, Jun 2011.
- LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811-27, Dec 2005.

LAINSON, R.; WARD, R. D.; SHAW, J. J. Experimental transmission of *Leishmania chagasi*, causative agent of neotropical visceral leishmaniasis, by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Nature**, v. 266, n. 5603, p. 628-30, Apr 14 1977.

LARA-SILVA FDE, O. et al. Epidemiological aspects of vector, parasite, and domestic reservoir in areas of recent transmission and no reported human cases of visceral leishmaniasis in Brazil. **Acta Trop**, v. 148, p. 128-36, Aug 2015.

LI, F. W. et al. rbcL and matK Earn Two Thumbs Up as the Core DNA Barcode for Ferns. **PLoS One**, v. 6, n. 10, Oct 20 2011.

LI, X. W. et al. Plant DNA barcoding: from gene to genome. **Biological Reviews**, v. 90, n. 1, p. 157-166, Feb 2015.

LIMA, A. C. V. M. D. R. **Estudo da Variabilidade Genética de *Leishmania (Viannia) braziliensis* Vianna, 1911 de Diferentes Regiões do Brasil**. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte - MG. 2010. (Tese de Doutorado)

LUKES, J. et al. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 22, p. 9375-80, May 29 2007.

MACEDO-SILVA, V. P. et al. Feeding Preferences of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), the Sand Fly Vector, for *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). **J Med Entomol**, v. 51, n. 1, p. 237-244, Jan 2014.

MACIEL, M. V. et al. Chemical composition of *Eucalyptus* spp. essential oils and their insecticidal effects on *Lutzomyia longipalpis*. **Vet Parasitol**, v. 167, n. 1, p. 1-7, 2010.

MAROLI, M. et al. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniases and other diseases of public health concern. **Med Vet Entomol**, v. 27, n. 2, p. 123-47, Jun 2013.

MASCARI, T. M.; FOIL, L. D. Laboratory Evaluation of the Efficacy of Fluorescent Biomarkers for Sugar-Feeding Sand Flies (Diptera: Psychodidae). **J Med Entomol**, v. 47, n. 4, p. 664-669, Jul 2010.

MAURICIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitol Today**, v. 16, n. 5, p. 188-9, May 2000.

MORRISON, A. C. et al. Dispersal of the Sand Fly *Lutzomyia-Longipalpis* (Diptera, Psychodidae) at an Endemic Focus of Visceral Leishmaniasis in Colombia. **J Med Entomol**, v. 30, n. 2, p. 427-435, Mar 1993.

MULLER, G. C.; REVAY, E. E.; SCHLEIN, Y. Relative attraction of the sand fly *Phlebotomus papatasi* to local flowering plants in the Dead Sea region. **Journal of Vector Ecology**, v. 36, p. S187-S194, Mar 2011.

PAVELA, R. Insecticidal activity of certain medicinal plants. **Fitoterapia**, v. 75, n. 7-8, p. 745-749, Dec 2004.

- PECNIKAR, Z. F.; BUZAN, E. V. 20 years since the introduction of DNA barcoding: from theory to application. **Journal of Applied Genetics**, v. 55, n. 1, p. 43-52, Feb 2014.
- PENJOR, T. et al. Phylogenetic Relationships of *Citrus* and Its Relatives Based on *matK* Gene Sequences. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e62574, 2013.
- PINHEIRO, M. P. G. et al. Ecological interactions among phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in an agroforestry environment of northeast Brazil. **Journal of Vector Ecology**, v. 38, n. 2, p. 307-316, Dec 2013.
- PINTO, I. D. S. et al. American visceral leishmaniasis dissociated from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae) in the State of Espírito Santo, Brazil. **Cad Saude Publica**, v. 26, p. 365-372, 2010.
- PRESTING, G. G. Identification of conserved regions in the plastid genome: implications for DNA barcoding and biological function. **Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique**, v. 84, n. 9, p. 1434-1443, Sep 2006.
- PUMARINO, L.; ALOMAR, O.; AGUSTI, N. Development of specific ITS markers for plant DNA identification within herbivorous insects. **Bull Entomol Res**, v. 101, n. 3, p. 271-276, Jun 2011.
- RANGEL, E. F.; VILELA, M. L. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cad Saude Publica**, v. 24, p. 2948-2952, 2008.
- REISKIND, M. H.; ZARRABI, A. A. The importance of an invasive tree fruit as a resource for mosquito larvae. **Journal of Vector Ecology**, v. 36, n. 1, p. 197-203, Jun 2011.
- ROCHAEL, N. C. et al. *Leishmania amazonensis* exhibits phosphatidylserine-dependent procoagulant activity, a process that is counteracted by sandfly saliva. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 6, p. 679-85, Sep 2013.
- ROMERO, G. A. S.; BOELAERT, M. Control of Visceral Leishmaniasis in Latin America—A Systematic Review. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 1, p. e584, 2010.
- RUBINOFF, D.; CAMERON, S.; WILL, K. Are plant DNA barcodes a search for the Holy Grail? **Trends in Ecology & Evolution**, v. 21, n. 1, p. 1-2, Jan 2006.
- RUTLEDGE, L. C.; ELLENWOOD, D. A. Production of Phlebotomine sand flies on the open forest floor in Panama: phytologic and edaphic relations. **Environ Entomol** v. 4, p. 83-89, 1975.
- SAARELA, J. M. et al. DNA Barcoding the Canadian Arctic Flora: Core Plastid Barcodes (rbcL plus matK) for 490 Vascular Plant Species. **PLoS One**, v. 8, n. 10, Oct 22 2013.
- SACKS, D. L. *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. **Cell Microbiol**, v. 3, n. 4, p. 189-96, Apr 2001.

- SALOMÓN, O. D. Vectores de leishmaniasis en las Américas. **Gaz. méd. Bahia**, v. 79 n. (Supl.3), p. 3-15, 2009.
- SANGUINETTE CDE, C. et al. Comparison of the phlebotomine (Diptera: Psychodidae) fauna of urban, transitional, and wild areas in northern Minas Gerais, Brazil. **Parasit Vectors**, v. 8, p. 428, 2015.
- SANTOS, M. F. C. et al. Genetic Structure of *Lutzomyia longipalpis* Populations in Mato Grosso Do Sul, Brazil, Based on Microsatellite Markers. **PLoS One**, v. 8, n. 9, Sep 16 2013.
- SAVOLAINEN, V. et al. Towards writing the encyclopaedia of life: an introduction to DNA barcoding. **Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences**, v. 360, n. 1462, p. 1805-1811, Oct 29 2005.
- SCHLEIN, Y.; JACOBSON, R. L. Mortality of Leishmania-Major in Phlebotomus-Papatasi Caused by Plant-Feeding of the Sand Flies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 50, n. 1, p. 20-27, Jan 1994.
- _____. Sugar meals and longevity of the sandfly *Phlebotomus papatasi* in an arid focus of Leishmania major in the Jordan Valley. **Med Vet Entomol**, v. 13, n. 1, p. 65-71, Feb 1999.
- _____. High nocturnal CO2 emanation guides the sand fly *Phlebotomus papatasi* to sugar-rich plants. **Physiological Entomology**, v. 33, n. 4, p. 353-359, Dec 2008.
- SCHLEIN, Y.; JACOBSON, R. L.; MULLER, G. C. Sand fly feeding on noxious plants: A potential method for the control of leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 4, p. 300-303, Oct 2001.
- SCHLEIN, Y.; MULLER, G. Assessment of Plant-Tissue Feeding by Sand Flies (Diptera, Psychodidae) and Mosquitos (Diptera, Culicidae). **J Med Entomol**, v. 32, n. 6, p. 882-887, Nov 1995.
- SELVARAJ, D.; SARMA, R. K.; SATHISHKUMAR, R. Phylogenetic analysis of chloroplast matK gene from Zingiberaceae for plant DNA barcoding. **Bioinformatics**, v. 3, n. 1, p. 24-27, 2008.
- SHARMA, U.; SINGH, S. Insect vectors of Leishmania: distribution, physiology and their control. **J Vector Borne Dis**, v. 45, n. 4, p. 255-72, Dec 2008.
- SILVA, J. G. D. E. et al. Infecção natural de *Lutzomyia longipalpis* por Leishmania sp. em Teresina, Piauí, Brasil. **Cad Saude Publica**, v. 23, p. 1715-1720, 2007.
- SOARES, R. P.; TURCO, S. J. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. **An Acad Bras Cienc**, v. 75, n. 3, p. 301-30, Sep 2003.
- SPIEGEL, C. N. et al. Structure and distribution of sensilla on maxillary palps and labella of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) sand flies. **Microsc Res Tech**, v. 66, n. 6, p. 321-30, Apr 15 2005.

STAUDACHER, K. et al. Detecting ingested plant DNA in soil-living insect larvae. **Soil Biol Biochem**, v. 43, n. 2, p. 346-350, Feb 2011.

TABERLET, P. et al. Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 3, Feb 2007.

TEODORO, U. et al. Influence of peri-domiciliar environmental conditions in the dispersion and proliferation of phlebotomine sandflies in Parana State, southern Brazil. **Arquivos De Biologia E Tecnologia**, v. 40, n. 3, p. 747-751, 1997.

VALE, V. F. D. **Estudo sobre a anatomia, pH e digestão de proteínas no intestino de larvas de *Lutzomyia longipalpis* (diptera: Psychodidae)**. Universidade Federal de Minas Gerias, Belo Horizonte. 2008. (Dissertação de mestrado)

VEXENAT, J. A. et al. Visceral leishmaniasis in Teresina, state of Piauí, Brazil: preliminary observations on the detection and transmissibility of canine and sandfly infections. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 89, p. 131-135, 1994.

WALLINGER, C. et al. The effect of plant identity and the level of plant decay on molecular gut content analysis in a herbivorous soil insect. **Molecular Ecology Resources**, v. 13, n. 1, p. 75-83, Jan 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the leishmaniasis. **Report of a Meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, 22–26 March 2010, WHO Technical Report Series**. WHO, Geneva, 2010.

_____. Leishmaniasis. 2015. Disponível em: <
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>.

YOUNG, D. G.; DUNCAN, M. A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera, Psychodidae). **Memories of the American Entomological Institute.**, v. n.54, p. 871-881, 1994.

YU, J.; XUE, J. H.; ZHOU, S. L. New universal matK primers for DNA barcoding angiosperms. **Journal of Systematics and Evolution**, v. 49, n. 3, p. 176-181, May 2011.

CAPÍTULO 2

Chloroplast *matk* gene: an effective sequence for DNA barcoding for taxonomic and phylogenetic approaches in a tropical urban flora

Leonardo H. G. de M. Lima^{1,4}; Marcelo R. Mesquita^{2,4}; Moisés T. de S. Freitas³; Vladimir C. Silva⁴; João M. de C. e Souza¹; Felipe C. C. da Silva¹; Valdir de Q. Balbino^{3,5}; Carlos H. N. Costa^{1,4}

¹ Federal University of Piauí, Picos, Brazil

² Federal Institute of Piauí, Parnaíba, Brazil

³ Laboratory of Bioinformatics and Evolutionary Biology, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

⁴ Laboratory of Leishmaniasis, Teresina, Brazil

⁵ Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

Abstract

Despite its more recent evolutionary origin and the identification of phylogenetic relationships intra group has been difficult. Angiosperms are a diversified group of plants. Since DNA barcode has been widely used in molecular identification and evolutionary inference for different groups, including Angiosperms, this study was conceived to assemble a reference library of plants in a tropical city. The molecular markers ribulose diphosphate carboxylase (*rbcL*) and maturase K (*matk*) were used in angiosperm species collected in Teresina, located in northeast Brazil. Additionally, the discriminatory power of *rbcL* and *matk* genes by using phylogenetic approaches was evaluated. Samples of angiosperms were collected and processed to obtain sequences of the *rbcL* and *matk*. The amplification power of the *rbcL*, *rbcL-A* and *matk* markers were 93.9%, 89.5% and 81.4%, respectively. Among the phylogenetic trees constructed, association between the markers *matk* and *rbcL-A* were the best support for clades. The use of the two markers *rbcL* and *rbcL-A* associated with *matk* do not increased the power of discrimination. However the use of *matk* solely, proved also to be very robust and this marker showed the best discriminatory power. Therefore the *matk* molecular marker proved to be an appropriate alternative for implementation in taxonomic and phylogenetic studies of angiosperm species of a tropical urban area.

Keywords: Angiosperms; DNA barcode library; Species discrimination.

1 INTRODUCTION

Traditional taxonomy based on morphology has several limitations such as misidentification caused by phenotypic plasticity of evaluated structures, lack of taxonomic keys to identify immature forms of various species (Pires e Marinoni, 2010), poor discrimination between cryptic species (Ko *et al.*, 2013) and the necessity of experts (Chase e Fay, 2009). Thus, molecular tools such as DNA barcoding, became an option for quick and accurate identification and classification of species.

The technique of DNA barcoding use short highly conserved universal DNA sequences, easily amplified and sequenced. Typically, the analyzed sequences are found in standard genome regions that contains sufficient genetic diversity for species differentiation (Hebert *et al.*, 2003; Bafeel *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2011; Phong *et al.*, 2014) . Moreover, the technology provides conditions for accurate classification, in addition of allowing the identification of unknown species (Jian *et al.*, 2014; Kress *et al.*, 2015).

The development of DNA barcoding libraries has favored the determination of the actual biodiversity existing in many geographical areas and the detection of novel species, even in groups of well investigated species (Mutanen *et al.*, 2013). Furthermore, it makes possible the identification of species from any part of the plant (Mahadani e Ghosh Sankar, 2013) such as roots (Kesanakurti *et al.*, 2011; De Boer *et al.*, 2014) and seeds (Nevill *et al.*, 2013; González-Varo *et al.*, 2014).

Numerous regions of the chloroplast genome have been suggested for plant barcoding (Ajmal Ali *et al.*, 2014), however, the Plant Working Group, CBOL, has proposed the use of the large subunit of the ribulose-bisphosphate carboxylase (*rbcL*) + maturase K (*matK*) genes as standard DNA barcoding for plants. When necessary, additional genomic regions could complement the analysis (CBOL, 2009; Hollingsworth *et al.*, 2011).

Several factors have justified the use of *matK* gene in the technique of DNA barcoding, such having a highly conserved region (Selvaraj *et al.*, 2008), faster evolution than *rbcL* (Penjor *et al.*, 2013), besides having adequate length and interspecific divergence (Li *et al.*, 2015). Conversely, the *rbcL* gene has the advantage of easy amplification, sequencing and alignment in most land plants (Li *et al.*, 2015), besides being the best characterized gene and frequently used in multi-locus analysis for species discrimination (CBOL, 2009).

In general, the success of the DNA barcoding depends on the choice of a DNA region with high "universality" and with the ability to differentiate conspecifics from congenics (Vinitha *et al.*, 2014). Moreover, the success of this technique is of significant importance for researches related to biodiversity and ecology (Pei *et al.*, 2015), as well as in determining the existing phylogenetic relationship among species (Erickson e Driskell, 2012). Additionally, barcode libraries allow to identify the feeding relationships among plants and insects (Junnila *et al.*, 2011), specially those transmitting diseases in tropical countries, allowing landscaping strategies aiming the control the vectors and diseases.

In this sense, the study aimed to build a reference library using molecular markers *rbcL* and *matk* in plant obtained in a tropical urban area of Brazil for phylogenetic studies.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Field collection of plants

Field collections were performed in the city of Teresina (2°05'21''S/42°48'07''W) municipality, Piauí State capital, northeast Brazil. Botanical material (leaves and/or flowers) was collected from shrubby and arboreal vegetation throughout the city (Table S1). Only plant species with more than 10 specimens were included in this study. For each species, a specimen was deposited at the Herbarium Graziela Barroso of the Federal University of Piauí. The botanical material was properly identified, labeled, and stored at -80 °C until DNA extraction.

2.2 DNA extraction, PCR and sequencing

Genomic DNA extraction was carried out using the kit BIOPUR Extração Mini Spin Planta (Biometrix, Brazil). Subsequently, DNA was quantified by using the spectrophotometer NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific, USA) and the fluorometer Qubit® 2.0 (Invitrogen, USA).

For each DNA sample isolated, a segment of chloroplast genes *rbcL*, *rbcL-A* and *matk* was amplified by PCR using the PCR Master Mix (Promega, USA), according to the manufacturer's instructions for a 50 µL final volume, containing 1 µL of respective primers (Table 1), and 5 µL DNA template. Thermocycling was carried out in Thermocycler T100 (Bio-Rad, USA) and conditions were: according to (95°C for 1 min (1 cycle), followed by 95°C for 30 s, 51 °C for 30 s and 68°C for 1 min (35 cycles),

followed by 68°C for 5 min (1 cycle) for *rbcL-A* (Bafeel *et al.*, 2011); 94°C for 4 mins (1 cycle); 94°C for 30 secs, 52°C for 30 secs, 72°C for 1 min (10 cycles); 88°C for 30 secs, 48°C for 30 secs, 72°C for 1 min (25 cycles) and 72°C for 10 mins (1 cycle) for *matK* (Royal Botanic Garden Edinburgh, 2012); and 95 °C for 1 min (1 cycle), 95 °C for 30 secs, 60 °C for 30 secs, 72 °C for 1 min (35 cycles) and 72 °C for 10 mins (1 cycle) for *rbcL*. PCR products were visualized in 1% agarose gel under UV light, and were purified by using the PureLink PCR Purification Kit (Invitrogen, USA). Sequencing was carried out in an ABI 3500 automatic sequencer (Applied Biosystems, Cleveland, Ohio, USA).

Only sequences with a Phred score above 30 were used in the analysis. Contig assembly was carried out using CodonCode Aligner (CodonCode Corporation). Local alignments were performed using BLAST (Altschul *et al.*, 1990). All new sequences generated in this study were deposited in GenBank under accession numbers: *rbcL-A* (KU559194 - KU55925), *rbcL* (KU559252 - KU559312) e *matK* (KU587456 - KU587504) (Table S1).

DNA sequences obtained from each primer (Table 1) were deposited in Genbank database linked to the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Table S1). All sequences were used to built a reference library of plant species from tropical urban area, particularly from the city of Teresina, Brazil.

Table 1. Universal primers for amplifying *rbcL*, *rbcL-A* and *matK*.

Locus	Name	Sequence (5'–3')	Tm (°C)	Matrix size (bp)	References
<i>rbcL</i>	rbcL direct F	CAGTAGCTGCCGAATCTTCTACTGGTAC	60	472	-----
	rbcL reverse R	GTAGACCATTATCTCGGCAATAATGAGCCAAG			
<i>rbcL-A</i>	rbcLaF	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC	55	460	(Bafeel <i>et al.</i> , 2011)
	rbcLaR	GTAAAATCAAGTCCACCRGC			
<i>matK</i>	Xf	TAATTTACGATCAATTCATTC	52	465	(Royal, 2012)
	MALPR1	ACAAGAAAGTCGAAGTAT			

2.3 Population genetics and phylogenetic analysis

Nucleotide sequences were aligned using the software Muscle (Edgar, 2004), incorporated with MEGA v. 5.0 (Tamura *et al.*, 2011). Distance and tree-building methods were used to assess the phylogeny of the plant groups (families and species). The Kimura 2-parameter (K2P) distances were calculated using MEGA v. 5.0 (Tamura *et al.*, 2011). We considered discrimination to be successful if the minimum uncorrected

interspecific K2P distance of focal species was greater than their maximum intraspecific distance. When using the tree-building method, Neighbor Joining (NJ), dendrograms based on K2P distances were constructed by using MEGA v. 5.0 (Tamura *et al.*, 2011). Phylogenetic trees were constructed using chloroplast genes individually and concatenated (*rbcL*, *rbcL-A* and *matk*). Intra-population genetic diversity was assessed in terms of haplotype number, nucleotide diversity, average number of nucleotide difference, number of polymorphic sites, and number of segregating sites; diversity was measured using DnaSP v. 4.0 (Rozas *et al.*, 2003) and Arlequin v. 3.5 (Excoffier e Lischer, 2010).

3 RESULTS

Altogether, 65 species of angiosperms, distributed in 28 families, were analyzed. No primers pairs evaluated were 100% effective in PCR reactions to all samples (Table S1). The *rbcL* direct F/*rbcL* reverse R primer pair amplified the expected fragments in 61 of 65 species (93.9%). Using the *rbcLaF/rbcLaR* primer pairs amplified 58 of 65 species (89.2%), while Xf/MALPR1 primer pairs amplified 53 of 65 species (81.5%). The sequences obtained for each of the molecular markers were used to construct a reference library of tropical urban vegetation. Subsequently, a database consisting of 39 sequences (species) of each primer pairs was created for the accomplishment of the evolutionary analysis. These sequences correspond to those samples that were successfully amplified for all the used markers (Table S1).

Intrapopulation analysis of *matk* gene revealed a higher level of nucleotide diversity (π) that in the *rbcL* and *rbcL-A* genes (Table 2). The number of polymorphic sites and parsimony informative sites was also observed in *matk* gene when compared to the *rbcL* and *rbcL-A* genes (Table 2).

Table 2. Intra-population genetic diversity measures for each gene.

Locus	Family	Numbers of samples	π	K	S	Parsimony informative sites	NS	H
<i>rbcL</i>	21	39	0.07299	32.480	143	101	143	38
<i>matk</i>	21	39	0.17589	64.024	249	188	249	38
<i>rbcL-A</i>	21	39	0.07597	32.362	142	103	142	38
<i>matk + rbcL</i>	21	39	0.11919	96.426	392	325	392	38
<i>matk + rbcL-A</i>	21	39	0.12201	96.386	391	291	391	39
<i>rbcL + rbcL-A</i>	21	39	0.07436	64.764	285	202	285	39
<i>matk + rbcL + rbcL-A</i>	21	39	0.10428	128.788	534	390	534	39

NS: Number of polymorphic sites; Hd: Haplotypic diversity; π : Nucleotide diversity; h: number of haplotype; K, average number of nucleotide difference

The Neighbor Joining analysis indicated the presence of 21 families of angiosperms for the chloroplast genes (*rbcL*, *rbcL-A* and *matK*). However, a single clade formed by the families Fabaceae, Mimosaceae and Caesalpiniaceae was observed in the phylogenetic analysis (Fig. 1, 2 and 3; Fig. S1 and S2). This result suggests an ancestral relationship among Fabaceae, Mimosaceae and Caesalpiniaceae families.

The tree-building methods suggest that *matK* gene has a greater discriminatory power when compared to the *rbcL* and *rbcL-A* genes. The clades (families and species) were well supported for *matK* gene, where 79.4% of them presented support values above 50% (Fig. 1). Conversely, the *rbcL* and *rbcL-A* genes yielded 55,6% (Supporting information, Fig. S1) and 67,6% (Supporting information, Fig. S2) for the groupings of plant, respectively. When different combinations of genes (*rbcL*, *rbcL-A* and *matK*) were performed, at least 80% of clades demonstrated support values above 50% (Table 3). The best combination was between *matK* + *rbcL-A* genes with 88.6% (Fig. 2) and, when the three concatenated genes were used, the proportion obtained was 80.6% with support value greater than 50% (Fig. 3).

Using the distance methods, *matK* exhibited the highest discriminatory power among the three markers in twenty-one plant groups. The average genetic distance between plant groups was 0.23 for the *matK* (Table 3). The markers *rbcL* and *rbcL-A* exhibited an average genetic distance of 0.09 between plants groups demonstrating discriminatory power lower than the *matK* gene (Table 3). Combinations of *matK*, *rbcL* and *rbcL-A* gene did not increase the discriminatory rates compared to *matK* alone, where *matK* + *rbcL*, and *matK* + *rbcL-A* were most well-supported, showing values of 0,15 (Table 3).

Tabela 3. Genetic distances and percentage for clades of phylogenetic trees with support values above 50% achieved through the use of molecular markers of individual and concatenated.

Locus	Genetic distance	Clades with support values above 50% (%)
<i>rbcL</i>	0.09	55.6
<i>matK</i>	0.24	79.4
<i>rbcL-A</i>	0.09	67.6
<i>matK</i> + <i>rbcL</i>	0.15	80.6
<i>matK</i> + <i>rbcL-A</i>	0.15	88.6
<i>rbcL</i> + <i>rbcL-A</i>	0.09	86.1
<i>matK</i> + <i>rbcL</i> + <i>rbcL-A</i>	0.13	80.6

4 DISCUSSION

The construction of barcode libraries containing a large high-quality database is promising for the correct identification of species, thus being useful for a more accurate taxonomy (Ekrem *et al.*, 2007). Moreover, they contain sequences that will match samples not yet identified (Elliott e Jonathan Davies, 2014), or even incorrectly identified due to taxonomic uncertainty or operational deficiencies (Costa *et al.*, 2012).

Although a small number of amplicons for the different markers have failed during PCR and sequencing in this study, all molecular sequences obtained were important, since a DNA barcode reference library for the urban angiosperms at the tropical city Teresina, which can be used by other researchers with different goals. According to Dewaard *et al.* (2011) the sequences contained in such library can be used in biodiversity monitoring programs and / or detection of invasive species.

The genetic sequences found in plant DNA barcode libraries are obtained by amplification of specific segments and standardized chloroplast genome (Bruni *et al.*, 2010) or nuclear DNA regions (Selvaraj *et al.*, 2012). Although various regions have been proposed, The Plant Working Group, CBOL recommends a combination of *matk* and *rbcL* genes from the chloroplast as the gold standard method for plant DNA barcoding (Liu *et al.*, 2014).

In our study, the *rbcL* direct F/*rbcL* reverse R primer pair amplified the expected fragments of most species, followed by *rbcLaF/rbcLaR* and *Xf/MALPR1* primer pairs. These results are similar to those found in other studies, which demonstrates that the success rate of *rbcL* was indeed superior to *matk* (Bafeel *et al.*, 2011; Schori *et al.*, 2013; Combik e Mirek, 2015). According to Kress e Erickson (2007) the *rbcL* gene has advantages such as high capacity amplification and sequencing the largest number of land plants species. However, the obtation of *matk* sequences is problematic for some species due to changes during the evolutionary process of the chloroplast genome (De Groot *et al.*, 2011; Bafeel *et al.*, 2012).

In this study, the *matk* marker presented a better discriminative power when compared to the *rbcL* for angiosperms was observed, in agreement with other studies (Jeanson *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2014). However, in contrast with these studies, the combination of the molecular markers *rbcL/matk* has not achieved the highest discriminatory power when compared to the *matk* marker alone, even when the three markers were combined (*rbcL + rbcL-A + matk*). This result indicates that the saturation of the analysis with data obtained through correlated genes may not increase

the discriminatory power. According to Vivas *et al.* (2014), in some cases a few other genomic regions other than *rbcL* and *matk* should be used instead.

The phylogenetic tree obtained from the *matk* sequences were well-supported with high values of clades. However, clade grouping of clades was more reliable when different markers were used, particularly when the *matk* and *rbcL-A* markers were combined.

Our study shows that the exclusive use of *matk* sequences can generate robust phylogenies, as much as resolve phylogenetic relationships at different taxonomic levels (Barthet e Hilu, 2007). *rbcL* sequences may also be used to correctly classify species within their respective families and genera (Amarasinghe *et al.*, 2015). These observations reinforce that the best way to consistently establish the evolutionary relationships among plant species begins by determining quality barcode markers (universality and resolution) to be used.

The species of Fabaceae, Mimosaceae and Caesalpinaceae indicated the presence of a single clade, reflecting the ancestral relationship among them. Analysis based on stomata characteristics (Tripathi e Mondal, 2012) or seed protein (Mondal e Mondal (Parui), 2011) have also reported the common ancestry relationship between these families. Moreover, some authors describe these three groups as subfamilies, Faboideae, Caesalpinioideae and Mimosoideae, belonging to Fabaceae family (Bentham, 1865; Polhill *et al.*, 1981). Studies related to evaluation of the phylogenetic relationships of the Fabaceae, Mimosaceae and Caesalpinaceae families is essential for the knowledge of the origin and diversification of these ecological and economically important angiosperms (Wojciechowski *et al.*, 2004). In this regard, the use of *rbcL* and *matk* sequences have been successfully shown to be appropriated for phylogenies in these families, as demonstrated in previous studies (Kass e Wink, 1997; Wojciechowski *et al.*, 2004; Patel e Pancha, 2014; Patel e Shah, 2014).

This study showed that the *rbcL* e *matk* markers is very useful for the construction of a representative angiosperm barcode library of tropical urban areas. Additionally, the *matk* molecular marker alone proved to be an appropriate alternative for taxonomic and phylogenetic studies of tropical angiosperm species. Finally, our study showed that the grouping of clades were more reliable when different markers were used (*rbcL-A*+ *matk*).

REFERENCE

- AJMAL ALI, M. et al. The changing epitome of species identification – DNA barcoding. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, n. 3, p. 204-231, 2014.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol**, v. 215, n. 3, p. 403-10, Oct 5 1990.
- AMARASINGHE, A. P. P. R. et al. Development of DNA Barcodes and Optimization of DNA Isolation and PCR Protocols for a Medicinal Plant *Plectranthus hadiensis*. **International Journal of Science and research**, v. 4, n. 6, p. 2852-2856, 2015.
- BAFEEL, S. O. et al. DNA barcoding of arid wild plants using rbcL gene sequences. **Genet Mol Res**, v. 11, n. 3, p. 1934-41, 2012.
- BAFEEL, S. O. et al. Comparative evaluation of PCR success with universal primers of maturase K (matK) and ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase oxygenase large subunit (rbcL) for barcoding of some arid plants. **Plant Omics**, v. 4, n. 4, p. 195-198, Jul 2011.
- BARTHET, M. M.; HILU, K. W. Expression of matK: functional and evolutionary implications. **American Journal of Botany**, v. 94, n. 8, p. 1402-12, Aug 2007.
- BENTHAM, G. **Leguminosae**. London: Lovell Reeve & Co.: BENTHAM, G.; HOOKER, J.D., 1865.
- BRUNI, I. et al. Identification of poisonous plants by DNA barcoding approach. **International Journal of Legal Medicine**, v. 124, n. 6, p. 595-603, Nov 2010.
- CBOL PLANT WORKING GROUP. A DNA barcode for land plants. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 31, p. 12794-7, Aug 4 2009.
- CHASE, M. W.; FAY, M. F. Ecology. Barcoding of plants and fungi. **Science**, v. 325, n. 5941, p. 682-3, Aug 7 2009.
- COMBIK, M.; MIREK, Z. **Estimating the effectiveness of species identification by sequencing of two chloroplast DNA loci (matK and rbcL) in selected groups of Polish flora**. DNA Barcodes. 3 2015.
- COSTA, F. O. et al. A ranking system for reference libraries of DNA barcodes: application to marine fish species from Portugal. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e35858, 2012.
- DE BOER, H. J. et al. DNA Barcoding Reveals Limited Accuracy of Identifications Based on Folk Taxonomy. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e84291, 2014.
- DE GROOT, G. A. et al. Use of rbcL and trnL-F as a Two-Locus DNA Barcode for Identification of NW-European Ferns: An Ecological Perspective. **PLoS One**, v. 6, n. 1, Jan 26 2011.

DEWAARD, J. R.; HEBERT, P. D.; HUMBLE, L. M. A comprehensive DNA barcode library for the looper moths (Lepidoptera: Geometridae) of British Columbia, Canada. **PLoS One**, v. 6, n. 3, p. e18290, 2011.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p. 1792-7, 2004.

EKREM, T.; WILLASSEN, E.; STUR, E. A comprehensive DNA sequence library is essential for identification with DNA barcodes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 43, n. 2, p. 530-542, 2007.

ELLIOTT, T. L.; JONATHAN DAVIES, T. Challenges to barcoding an entire flora. **Molecular Ecology Resources**, v. 14, n. 5, p. 883-91, Sep 2014.

ERICKSON, D.; DRISKELL, A. Construction and Analysis of Phylogenetic Trees Using DNA Barcode Data. In: KRESS, W. J. e ERICKSON, D. L. (Ed.). **DNA Barcodes**: Humana Press, v.858, 2012. cap. 19, p.395-408. (Methods in Molecular Biology). ISBN 978-1-61779-590-9.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 3, p. 564-567, 2010.

GONZÁLEZ-VARO, J. P.; ARROYO, J. M.; JORDANO, P. Who dispersed the seeds? The use of DNA barcoding in frugivory and seed dispersal studies. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 5, n. 8, p. 806-814, 2014.

HEBERT, P. D. N. et al. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences**, v. 270, n. 1512, p. 313-321, Feb 7 2003.

HOLLINGSWORTH, P. M.; GRAHAM, S. W.; LITTLE, D. P. Choosing and Using a Plant DNA Barcode. **PLoS One**, v. 6, n. 5, p. e19254, 2011.

JEANSON, M. L.; LABAT, J. N.; LITTLE, D. P. DNA barcoding: a new tool for palm taxonomists? **Ann Bot**, v. 108, n. 8, p. 1445-51, Dec 2011.

JIAN, C. et al. A successful case of DNA barcoding used in an international trade dispute. **DNA Barcodes**. 2 2014.

JIANG, Y. et al. Identification of the genus *Epimedium* with DNA barcodes. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 28, p. 6413-6417, 2011.

JUNNILA, A.; MULLER, G. C.; SCHLEIN, Y. Identification of plant tissues from the gut of *Phlebotomus papatasi* by DNA analysis. **Acta Trop**, v. 117, n. 1, p. 14-18, Jan 2011.

KASS, E.; WINK, M. Phylogenetic relationships in the Papilionoideae (family Leguminosae) based on nucleotide sequences of cpDNA (rbcL) and ncDNA (ITS 1 and 2). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 8, n. 1, p. 65-88, Aug 1997.

- KESANAKURTI, P. R. et al. Spatial patterns of plant diversity below-ground as revealed by DNA barcoding. **Mol Ecol**, v. 20, n. 6, p. 1289-302, Mar 2011.
- KO, H. L. et al. Evaluating the Accuracy of Morphological Identification of Larval Fishes by Applying DNA Barcoding. **PLoS One**, v. 8, n. 1, 2013.
- KRESS, W. J.; ERICKSON, D. L. A Two-Locus Global DNA Barcode for Land Plants: The Coding *rbcL* Gene Complements the Non-Coding *trnH-psbA* Spacer Region. **PLoS One**, v. 2, n. 6, p. e508, 2007.
- KRESS, W. J. et al. DNA barcodes for ecology, evolution, and conservation. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 30, n. 1, p. 25-35, Jan 2015.
- LI, X. W. et al. Plant DNA barcoding: from gene to genome. **Biological Reviews**, v. 90, n. 1, p. 157-166, Feb 2015.
- LIU, J. et al. Identification of species in the angiosperm family Apiaceae using DNA barcodes. **Molecular Ecology Resources**, v. 14, n. 6, p. 1231-8, Nov 2014.
- MAHADANI, P.; GHOSH SANKAR, K. **DNA Barcoding: A tool for species identification from herbal juices**. DNA Barcodes. 1: 35 p. 2013.
- MONDAL, A. K.; MONDAL (PARUI), S. Circumscription of the families within Leguminales as determined by cladistic analysis based on seed protein. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 15, p. 2850-2856, 2011.
- MUTANEN, M.; KAILA, L.; TABELL, J. Wide-ranging barcoding aids discovery of one-third increase of species richness in presumably well-investigated moths. **Scientific Reports**, v. 3, p. 2901, 2013.
- NEVILL, P. G. et al. DNA barcoding for conservation, seed banking and ecological restoration of *Acacia* in the Midwest of Western Australia. **Molecular Ecology Resources**, v. 13, n. 6, p. 1033-1042, 2013.
- PATEL, S.; PANCHA, H. Evolutionary studies of few species belonging to Leguminosae family based on RBCL gene. **Discovery**, v. 9, n. 22, p. 38-50, 2014.
- PATEL, S. S.; SHAH, D. B. Phylogenetics Analysis of Some Leguminosae Family Species Based On RBCL Sequence Data **International Journal of Advanced Biotechnology and Research**, v. 5, n. 3, p. 331-336, 2014.
- PEI, N. et al. Closely-related taxa influence woody species discrimination via DNA barcoding: evidence from global forest dynamics plots. **Sci Rep**, v. 5, p. 15127, 2015.
- PENJOR, T. et al. Phylogenetic Relationships of *Citrus* and Its Relatives Based on *matK* Gene Sequences. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e62574, 2013.

PHONG, D. T. et al. Nucleotide diversity of a nuclear and four chloroplast DNA regions in rare tropical wood species of *Dalbergia* in Vietnam: a DNA barcode identifying utility. **Asian Journal of Applied Sciences**, v. 02, n. 02, p. 116-125, 2014.

PIRES, A. C.; MARINONI, L. DNA barcoding and traditional taxonomy unified through Integrative Taxonomy: a view that challenges the debate questioning both methodologies. **Biota Neotropica**, v. 10, p. 339-346, 2010.

POLHILL, R. M.; RAVEN, P. H.; STIRTON, C. H. **Evolution and systematics of the Leguminosae**. Royal Botanic Gardens, 1981.

ROYAL BOTANIC GARDEN EDINBURGH. **DNA Barcoding of Plants: *matK* primers for angiosperms**. 20a Inverleith Row. Edinburgh 2012.

ROZAS, J. et al. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. **Bioinformatics**, v. 19, n. 18, p. 2496-7, Dec 12 2003.

SCHORI, M. et al. Engineered DNA Polymerase Improves PCR Results for Plastid DNA. **Applications in Plant Sciences**, v. 1, n. 2, p. 1200519, 2013/02/01 2013.

SELVARAJ, D.; SARMA, R. K.; SATHISHKUMAR, R. Phylogenetic analysis of chloroplast *matK* gene from Zingiberaceae for plant DNA barcoding. **Bioinformation**, v. 3, n. 1, p. 24-27, 2008.

SELVARAJ, D. et al. DNA Barcode ITS Effectively Distinguishes the Medicinal Plant *Boerhavia diffusa* from Its Adulterants. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, v. 10, n. 6, p. 364-367, 2012.

TAMURA, K. et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

TRIPATHI, S.; MONDAL, A. K. Taxonomic diversity in epidermal cells (stomata) of some selected anthophyta under the order Leguminales (Caesalpniaceae, Mimosaceae & Fabaceae) based on numerical analysis: a systematic approach. **International Journal of Science & Nature**, v. 3, n. 4, p. 788-798, 2012.

VINITHA, M. R. et al. Prospects for discriminating Zingiberaceae species in India using DNA barcodes. **J Integr Plant Biol**, v. 56, n. 8, p. 760-73, Aug 2014.

VIVAS, C. V. et al. DNA barcoding in Atlantic Forest plants: What is the best marker for Sapotaceae species identification? **Genet Mol Biol**, v. 37, n. 4, p. 662-70, Oct 2014.

WOJCIECHOWSKI, M. F.; LAVIN, M.; SANDERSON, M. J. A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid *matK* gene resolves many well-supported subclades within the family. **American Journal of Botany**, v. 91, n. 11, p. 1846-62, Nov 2004.

YANG, H.-Q. et al. A Preliminary Assessment of matK, rbcL and trnH—psbA as DNA Barcodes for Calamus (Arecaceae) Species in China with a Note on ITS. **Annales Botanici Fennici**, v. 49, n. 5-6, p. 319-330, 2012/11/01 2012.

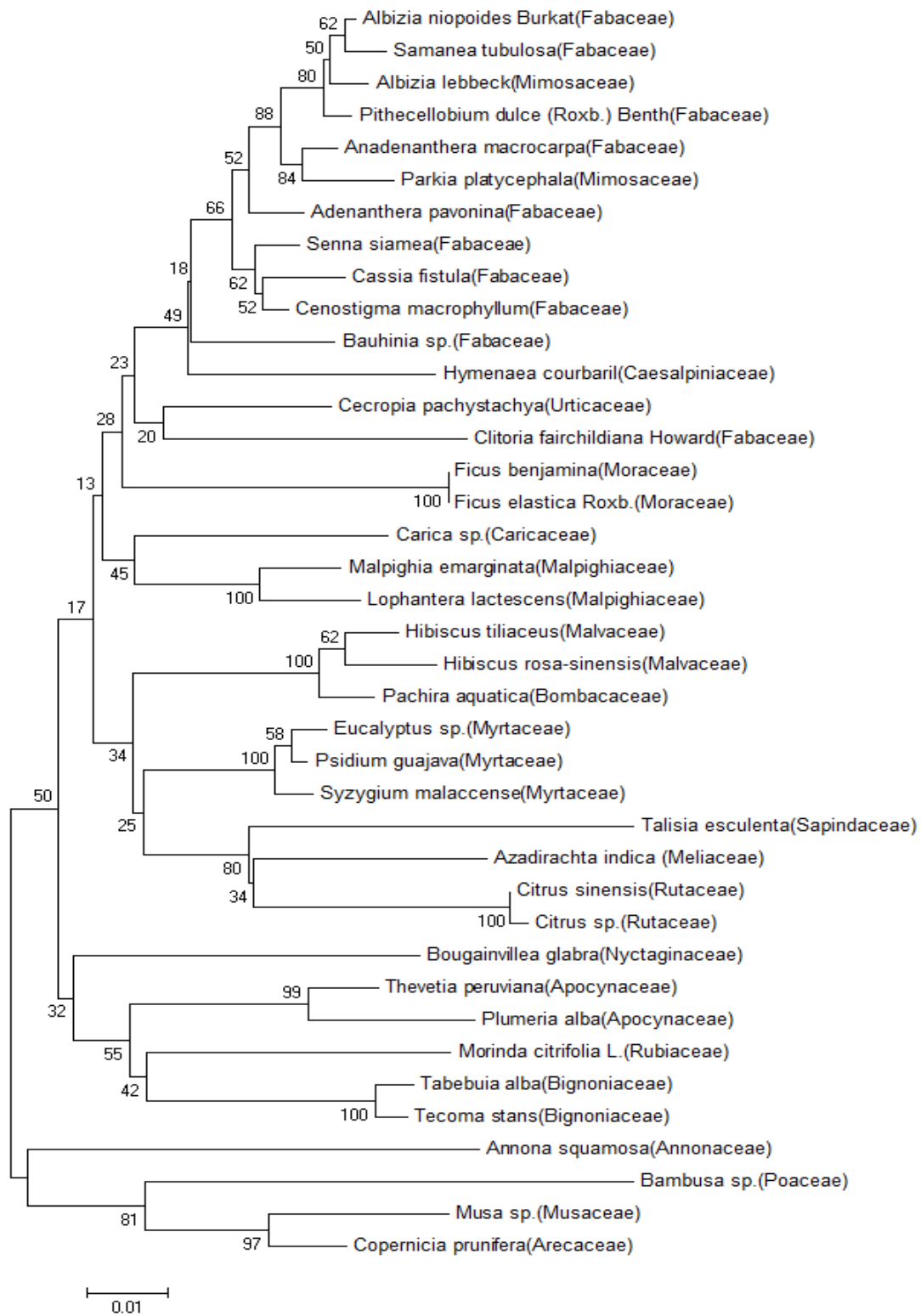


Figure 1. Neighbor joining tree obtained with the K2P model, showing results using *matK* gene.

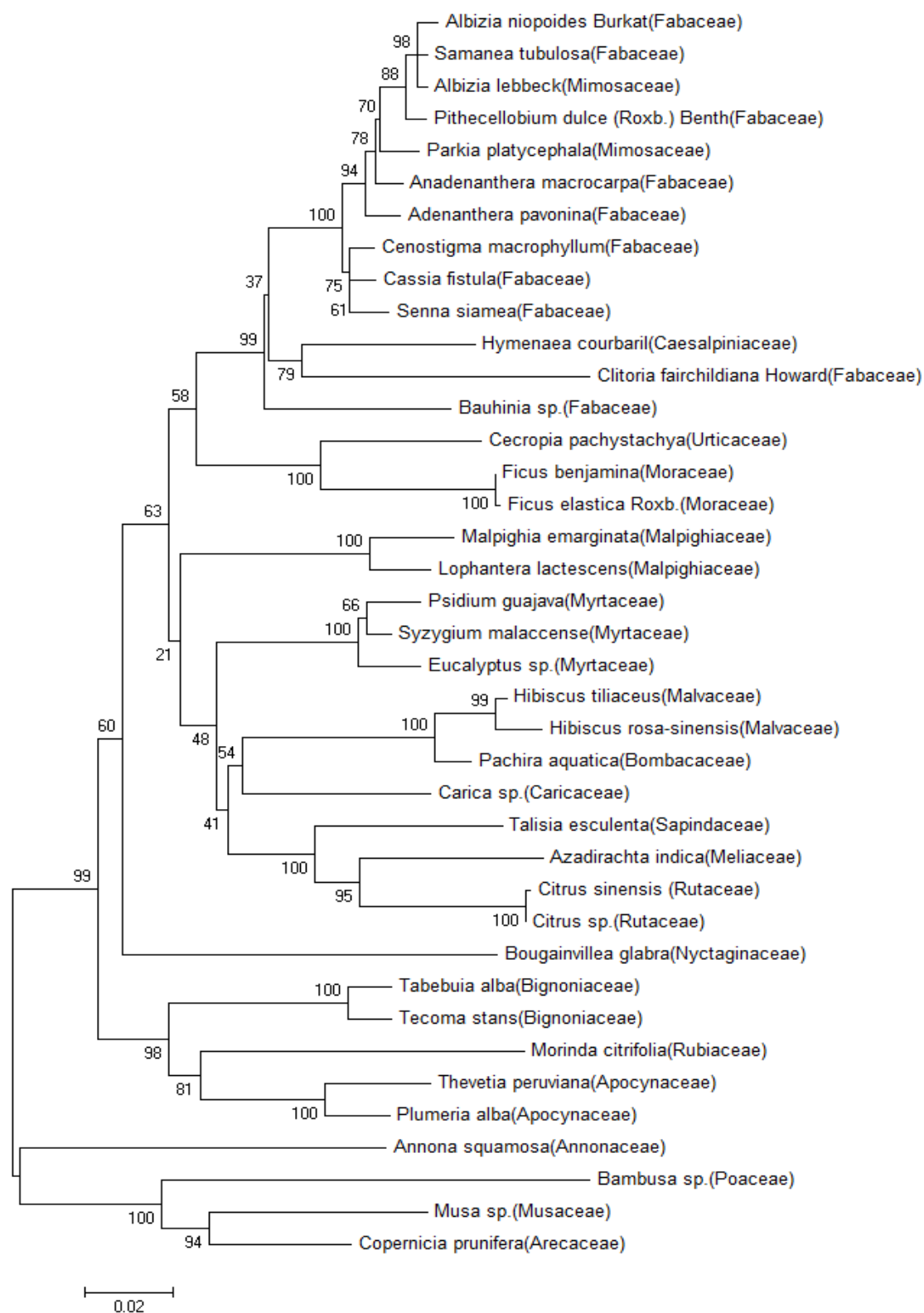


Figure 2. Neighbor joining tree obtained with the K2P model, showing results using *rbcL-A+ matk* genes.

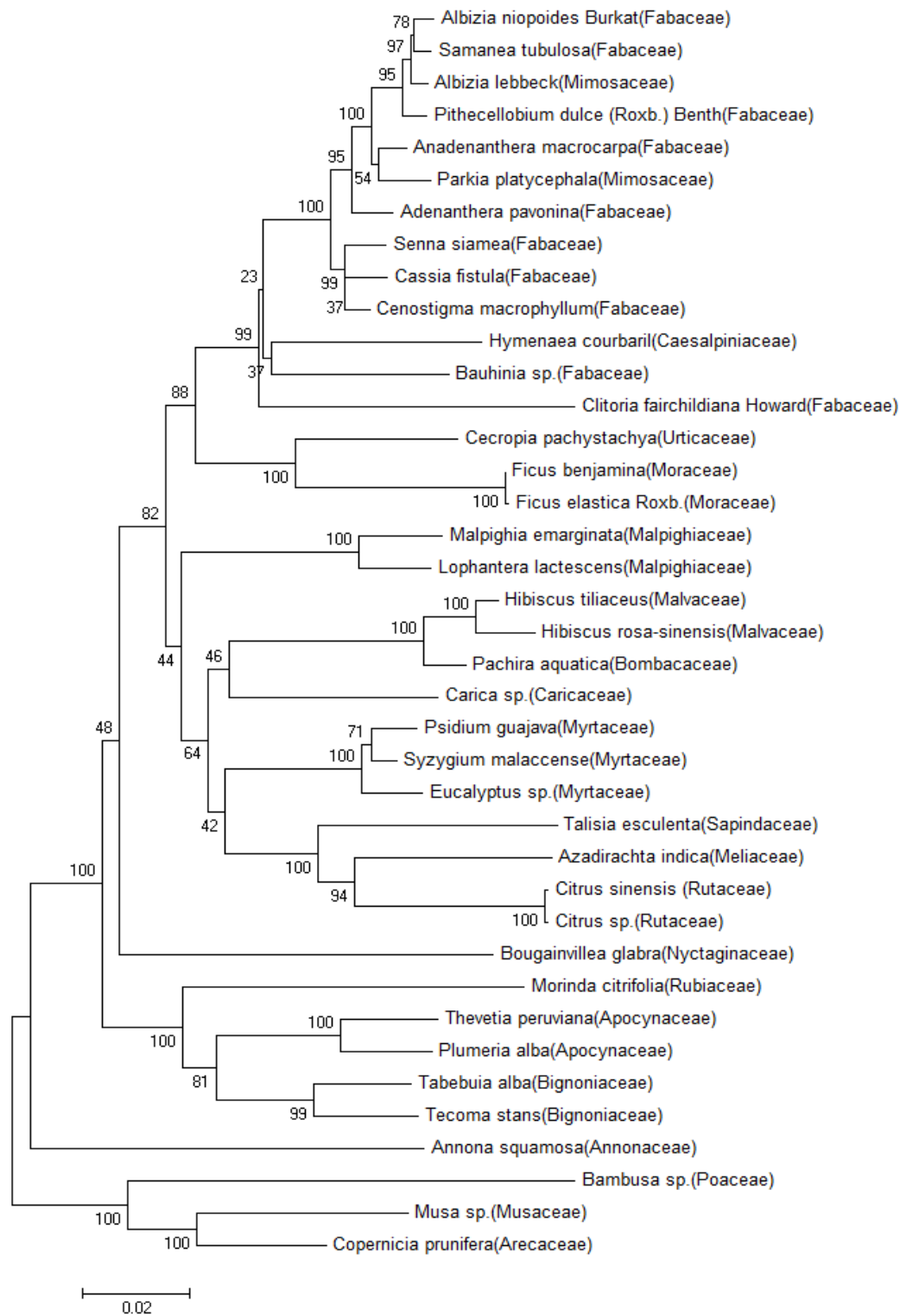


Figure 3. Neighbor joining tree obtained with the K2P model, showing results using *rbcL* + *rbcL-A+* matk genes.

Apêndice A

Tabela S1. List of angiosperm plants found in the city of Teresina, Brazil, and the success of obtaining amplicons from each of their tested barcode markers.

Specie	Family	Herbarium accession number	<i>rbcL</i> – Genbank access number	<i>rbcL-A</i> – Genbank access number	<i>matK</i> – Genbank access number
<i>Spondias mombin</i> L.	Anacardiaceae	30.560	----	KU559208	KU587468
<i>Mangifera indica</i>	Anacardiaceae	30.728	KU559298	KU559238	----
<i>Spondias purpurea</i> L.	Anacardiaceae	30.742	KU559308	KU559247	KU587500
<i>Anacardium occidentale</i>	Anacardiaceae	30.555	KU559267	KU559209	----
<i>Annona squamosa</i> *	Annonaceae	30.532	KU559258	KU559199	KU587461
<i>Thevetia peruviana</i> *	Apocynaceae	30.531	KU559274	KU559216	KU587474
<i>Plumeria alba</i> *	Apocynaceae	30.721	KU559291	KU559232	KU587487
<i>Plumeria pudica</i>	Apocynaceae	30.720	KU559285	KU559226	KU587481
<i>Copernicia prunifera</i> *	Arecaceae	30.770	KU559271	KU559213	KU587471
<i>Cocos nucifera</i>	Arecaceae	30.736	KU559275	----	----
<i>Roystonea oleracea</i>	Arecaceae	30.741	KU559303	----	----
<i>Crescentia cujete</i>	Bignoniaceae	30.771	KU559276	KU559217	----
<i>Tabebuia alba</i> *	Bignoniaceae	30.738	KU559288	KU559229	KU587484
<i>Tecoma stans</i> *	Bignoniaceae	30.530	KU559289	KU559230	KU587485
<i>Pachira aquatica</i> *	Bombacaceae	30.552	KU559266	KU559207	KU587467
<i>Caesalpinia pulcherrima</i>	Caesalpiniaceae	30.553	KU559284	KU559225	----
<i>Hymenaea courbaril</i> *	Caesalpiniaceae	30.726	KU559292	KU559233	KU587488
<i>Caesalpinia echinata</i>	Caesalpiniaceae	30.775	KU559305	KU559244	----
<i>Carica sp</i> *	Caricaceae	30.732	KU559297	KU559237	KU587492
<i>Licania tomentosa</i>	Chrisobalanaceae	30.729	KU559302	----	----
<i>Platonia insignis</i>	Clusiaceae	30.735	KU559259	KU559200	----
<i>Terminalia catappa</i>	Combretaceae	30.554	KU559255	----	----
<i>Codiaeum variegatum</i>	Euphorbiaceae	30.718	KU559312	KU559251	KU587504
<i>Ricinus communis</i> L.	Euphorbiaceae	30.544	KU559286	KU559227	KU587482
<i>Jatropha gossypifolia</i> L.	Euphorbiaceae	30.528	KU559306	KU559245	KU587498
<i>Albizia niopoides</i> Burkat*	Fabaceae	30.725	KU559256	KU559197	KU587459
<i>Anadenanthera macrocarpa</i> *	Fabaceae	30.767	KU559257	KU559198	KU587460
<i>Samanea tubulosa</i> (Benth)*	Fabaceae	30.769	KU559263	KU559204	KU587464
<i>Erythrina variegata</i>	Fabaceae	30.714	KU559265	KU559206	KU587466
<i>Cassia fistula</i> *	Fabaceae	30.558	KU559268	KU559210	KU587469
<i>Cenostigma macrophyllum</i> *	Fabaceae	30.548	KU559269	KU559211	----
<i>Adenanthera pavonina</i> *	Fabaceae	30.546	KU559272	KU559214	KU587472
<i>Delonix regia</i>	Fabaceae	30.561	KU559283	KU559224	----
<i>Pithecellobium dulce</i> (Roxb.) Benth*	Fabaceae	30.549	KU559299	KU559239	KU587493
<i>Bauhinia sp</i> *	Fabaceae	30.551	KU559304	KU559243	KU587497
<i>Caesalpinia ferrea</i>	Fabaceae	30.550	KU559293	----	----
<i>Senna siamea</i> *	Fabaceae	30.776	KU559273	KU559215	KU587473
<i>Clitoria fairchildiana</i> Howard*	Fabaceae	30.547	KU559309	KU559248	KU587501
<i>Tamarindus indica</i> L.	Fabaceae	30.716	KU559310	KU559249	KU587502
<i>Couroupita guianensis</i>	Lecytidaceae	30.740	----	----	----

Aubl.					
<i>Malpighia glabra</i> *	Malpighiaceae	30.529	KU559252	KU559194	KU587456
<i>Lophantera lactescens</i> *	Malpighiaceae	30.773	KU559294	KU559234	KU587489
<i>Hibiscus tiliaceus</i> *	Malvaceae	30.559	KU559254	KU559196	KU587457
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> *	Malvaceae	30.774	KU559277	KU559218	KU587475
<i>Azadirachta indica</i> *	Meliaceae	30.556	KU559300	KU559241	KU587495
<i>Albizia lebeck</i> *	Mimosaceae	30.766	KU559253	KU559195	KU587458
<i>Parkia platycephala</i> *	Mimosaceae	30.772	KU559280	KU559221	KU587478
<i>Ficus benjamina</i> *	Moraceae	30.722	KU559281	KU559222	KU587479
<i>Ficus elastica</i> Roxb*	Moraceae	30.743	KU559282	KU559223	KU587480
<i>Musa sp.</i> *	Musaceae	30.737	KU559261	KU559202	KU587463
<i>Eucalyptus sp.</i> *	Myrtaceae	30.724	KU559279	KU559220	KU587477
<i>Psidium guajava</i> *	Myrtaceae	30.723	KU559287	KU559228	KU587483
<i>Syzygium malaccense</i> *	Myrtaceae	30.739	KU559290	KU559231	KU587486
<i>Syzygium cumini</i> Lamarck	Myrtaceae	30.734	----	----	----
<i>Bougainvillea glabra</i> *	Nyctaginaceae	30.545	KU559264	KU559205	KU587465
<i>Averrhoa carambola</i> L.	Oxalidaceae	30.557	KU559270	KU559212	KU587470
<i>Bambusa sp.</i> *	Poaceae	30.768	KU559260	KU559201	KU587462
<i>Zea mays</i>	Poaceae	30.733	----	KU559240	KU587494
<i>Ixora chinensis</i>	Rubiaceae	30.730	KU559262	KU559203	----
<i>Morinda citrifolia</i> L.*	Rubiaceae	30.731	KU559301	KU559242	KU587496
<i>Citrus sinensis</i> *	Rutaceae	30.715	KU559295	KU559235	KU587490
<i>Citrus sp.</i> *	Rutaceae	30.727	KU559296	KU559236	KU587491
<i>Talisia esculenta</i> *	Sapindaceae	30.719	KU559307	KU559246	KU587499
<i>Magonia pubescens</i>	Sapindaceae	30.777	KU559311	KU559250	KU587503
<i>Cecropia pachystachya</i> *	Urticaceae	30.717	KU559278	KU559219	KU587476

*Species used in evolution analysis

Apêndice B

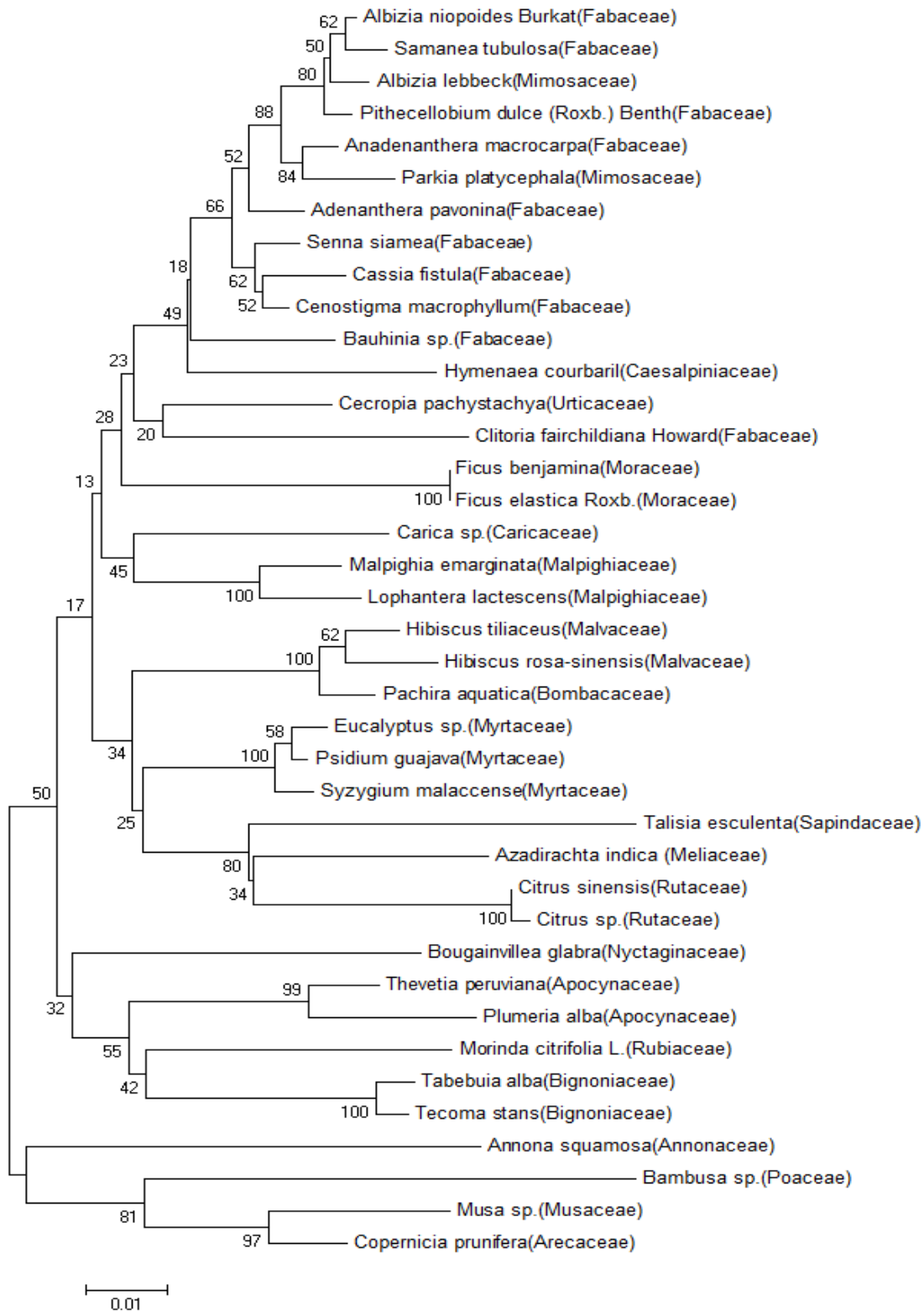


Figure S1. Neighbor joining tree obtained with the K2P model, showing results using *rbcl*

Apêndice C

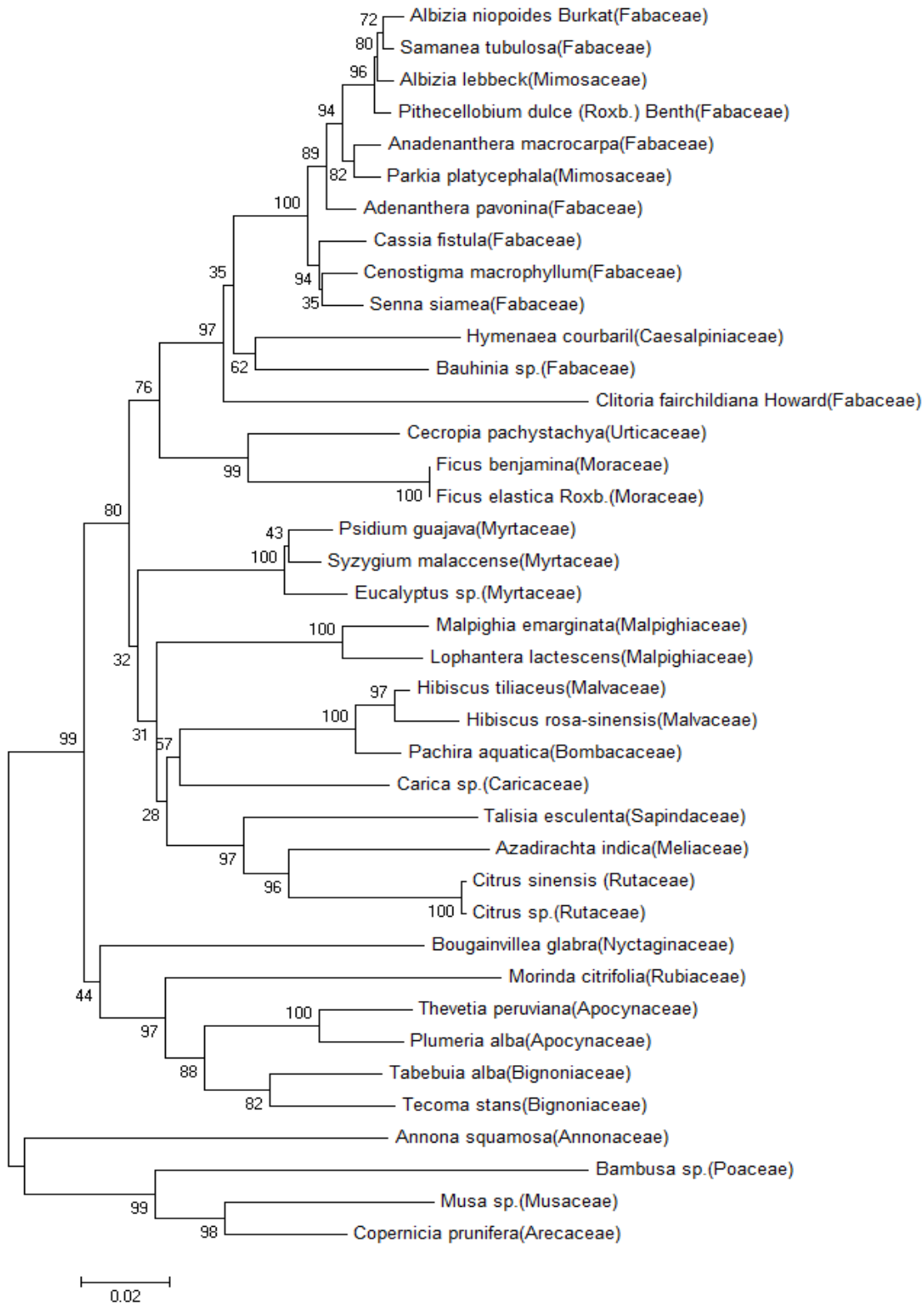


Figure S2. Neighbor joining tree obtained with the K2P model, showing results using *rbcl-A*

CAPÍTULO 3

Produto Biotecnológico da Tese: Biblioteca de DNA barcode da flora urbana de Teresina

O Produto biotecnológico gerado por esse trabalho de tese foi a primeira biblioteca molecular vegetal de referência da cidade de Teresina.

Na construção desta biblioteca foram incluídas as espécies vegetais, arbustiva ou arbórea, que contivessem mais de 10 espécimes encontradas no município de estudo. Para cada espécie foi coletado material biológico de uma espécime, tanto para depósito no Herbário Graziela Barroso da Universidade Federal do Piauí como para posterior extração de DNA. Este foi levado para o laboratório e devidamente identificado e armazenado a 80 °C até o momento da extração.

A extração de DNA foi realizada utilizando o kit BIOPUR Extração Mini Spin Planta (Biometrix, Brasil). Posteriormente, o DNA foi quantificado usando o espectrofotômetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific, USA) e o fluorômetro Qubit® 2.0 (Invitrogen, USA).

Para cada amostra de DNA vegetal, dois genes do genoma do cloroplasto, *rbcL* e *matK*, foram amplificados por PCR utilizando diferentes iniciadores *rbcL*, *rbcl-A* e *matK*. Todas as sequências obtidas foram depositadas no banco de dados mundial GenBank (Tabela 2) associado ao Centro Nacional de Informação Biotecnológica dos EUA (NCBI).

No total foram inseridas no estudo 65 espécies vegetais, distribuídas em 28 famílias e 59 gêneros, e a partir destas foram geradas ao total 172 sequências distribuídas da seguinte forma: 61 de *rbcL*, 58 de *rbcl-A* e 53 de *matK* (Tabela 1).

A obtenção da biblioteca molecular de referência torna-se importante visto que suas informações podem ser utilizadas com diversos focos, tais como identificação precisa e rápida de novas amostras coletadas, levantamento da biodiversidade, identificação de espécies invasoras e a identificação da relação alimentar entre insetos vetores de doenças e a vegetação urbana. Este último foi realizado neste trabalho de tese.

Tabela 1. Lista de angiospermas encontradas na cidade de Teresina, Brasil, e o sucesso na obtenção de sequências a partir dos diferentes marcadores barcode.

Espécie	Família	Número de acesso no Herbário	<i>rbcL</i> – número de acesso no Genbank	<i>rbcL-A</i> – número de acesso no Genbank	<i>matK</i> – número de acesso no Genbank
<i>Spondias mombin</i> L.	Anacardiaceae	30.560	----	KU559208	KU587468
<i>Mangifera indica</i>	Anacardiaceae	30.728	KU559298	KU559238	----
<i>Spondias purpurea</i> L.	Anacardiaceae	30.742	KU559308	KU559247	KU587500
<i>Anacardium occidentale</i>	Anacardiaceae	30.555	KU559267	KU559209	----
<i>Annona squamosa</i>	Annonaceae	30.532	KU559258	KU559199	KU587461
<i>Thevetia peruviana</i>	Apocynaceae	30.531	KU559274	KU559216	KU587474
<i>Plumeria alba</i>	Apocynaceae	30.721	KU559291	KU559232	KU587487
<i>Plumeria pudica</i>	Apocynaceae	30.720	KU559285	KU559226	KU587481
<i>Copernicia prunifera</i>	Arecaceae	30.770	KU559271	KU559213	KU587471
<i>Cocos nucifera</i>	Arecaceae	30.736	KU559275	----	----
<i>Roystonea oleracea</i>	Arecaceae	30.741	KU559303	----	----
<i>Crescentia cujete</i>	Bignoniaceae	30.771	KU559276	KU559217	----
<i>Tabebuia alba</i>	Bignoniaceae	30.738	KU559288	KU559229	KU587484
<i>Tecoma stans</i>	Bignoniaceae	30.530	KU559289	KU559230	KU587485
<i>Pachira aquática</i>	Bombacaceae	30.552	KU559266	KU559207	KU587467
<i>Caesalpinia pulcherrima</i>	Caesalpinaceae	30.553	KU559284	KU559225	----
<i>Hymenaea courbaril</i>	Caesalpinaceae	30.726	KU559292	KU559233	KU587488
<i>Caesalpinia echinata</i>	Caesalpinaceae	30.775	KU559305	KU559244	----
<i>Carica sp</i>	Caricaceae	30.732	KU559297	KU559237	KU587492
<i>Licania tomentosa</i>	Chrisobalanaceae	30.729	KU559302	----	----
<i>Platonia insignis</i>	Clusiaceae	30.735	KU559259	KU559200	----
<i>Terminalia catappa</i>	Combretaceae	30.554	KU559255	----	----
<i>Codiaeum variegatum</i>	Euphorbiaceae	30.718	KU559312	KU559251	KU587504
<i>Ricinus communis</i> L	Euphorbiaceae	30.544	KU559286	KU559227	KU587482
<i>Jatropha gossypifolia</i> L	Euphorbiaceae	30.528	KU559306	KU559245	KU587498
<i>Albizia niopoides</i> Burkat	Fabaceae	30.725	KU559256	KU559197	KU587459
<i>Anadenanthera macrocarpa</i>	Fabaceae	30.767	KU559257	KU559198	KU587460
<i>Samanea tubulosa</i> (Benth)	Fabaceae	30.769	KU559263	KU559204	KU587464
<i>Erythrina variegata</i>	Fabaceae	30.714	KU559265	KU559206	KU587466
<i>Cassia fistula</i>	Fabaceae	30.558	KU559268	KU559210	KU587469
<i>Cenostigma macrophyllum</i>	Fabaceae	30.548	KU559269	KU559211	----
<i>Adenanthera pavonina</i>	Fabaceae	30.546	KU559272	KU559214	KU587472
<i>Delonix regia</i>	Fabaceae	30.561	KU559283	KU559224	----
<i>Pithecellobium dulce</i> (Roxb.) Benth	Fabaceae	30.549	KU559299	KU559239	KU587493
<i>Bauhinia sp</i>	Fabaceae	30.551	KU559304	KU559243	KU587497
<i>Caesalpinia ferrea</i>	Fabaceae	30.550	KU559293	----	----
<i>Senna siamea</i>	Fabaceae	30.776	KU559273	KU559215	KU587473
<i>Clitoria fairchildiana</i> Howard	Fabaceae	30.547	KU559309	KU559248	KU587501
<i>Tamarindus indica</i> L.	Fabaceae	30.716	KU559310	KU559249	KU587502
<i>Couroupita guianensis</i> Aubl.	Lecytidaceae	30.740	----	----	----
<i>Malpighia glabra</i>	Malpighiaceae	30.529	KU559252	KU559194	KU587456

<i>Lophantera lactescens</i>	Malpighiaceae	30.773	KU559294	KU559234	KU587489
<i>Hibiscus tiliaceus</i>	Malvaceae	30.559	KU559254	KU559196	KU587457
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	Malvaceae	30.774	KU559277	KU559218	KU587475
<i>Azadirachta indica</i>	Meliaceae	30.556	KU559300	KU559241	KU587495
<i>Albizia lebbek</i>	Mimosaceae	30.766	KU559253	KU559195	KU587458
<i>Parkia platycephala</i>	Mimosaceae	30.772	KU559280	KU559221	KU587478
<i>Ficus benjamina</i>	Moraceae	30.722	KU559281	KU559222	KU587479
<i>Ficus elastica</i> Roxb	Moraceae	30.743	KU559282	KU559223	KU587480
<i>Musa sp.</i>	Musaceae	30.737	KU559261	KU559202	KU587463
<i>Eucalyptus sp.</i>	Myrtaceae	30.724	KU559279	KU559220	KU587477
<i>Psidium guajava</i>	Myrtaceae	30.723	KU559287	KU559228	KU587483
<i>Syzygium malaccense</i>	Myrtaceae	30.739	KU559290	KU559231	KU587486
<i>Syzygium cumini</i> Lamarck	Myrtaceae	30.734	----	----	----
<i>Bougainvillea glabra</i>	Nyctaginaceae	30.545	KU559264	KU559205	KU587465
<i>Averrhoa carambola</i> L.	Oxalidaceae	30.557	KU559270	KU559212	KU587470
<i>Bambusa sp.</i>	Poaceae	30.768	KU559260	KU559201	KU587462
<i>Zea mays</i>	Poaceae	30.733	----	KU559240	KU587494
<i>Ixora chinensis</i>	Rubiaceae	30.730	KU559262	KU559203	----
<i>Morinda citrifolia</i> L.	Rubiaceae	30.731	KU559301	KU559242	KU587496
<i>Citrus sinensis</i> *	Rutaceae	30.715	KU559295	KU559235	KU587490
<i>Citrus sp.</i>	Rutaceae	30.727	KU559296	KU559236	KU587491
<i>Talisia esculenta</i>	Sapindaceae	30.719	KU559307	KU559246	KU587499
<i>Magonia pubescens</i>	Sapindaceae	30.777	KU559311	KU559250	KU587503
<i>Cecropia pachystachya</i>	Urticaceae	30.717	KU559278	KU559219	KU587476

CAPÍTULO 4

DNA barcode for the identification of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* plant feeding preference at a tropical urban environment

Leonardo H. G. de M. Lima^{1,4*}; Marcelo R. Mesquita^{2,4}; Laura Skrip³; Moisés T. de S. Freitas⁴; Vladimir C. Silva⁵; Oscar D. Kirstein⁶; Ibrahim Abassi⁶; Alon Warburg⁶; Valdir de Q. Balbino^{4,7}; Carlos H. N. Costa^{1,4}

¹ Federal University of Piauí, Picos, Brazil

² Federal Institute of Piauí, Parnaíba, Brazil

³ Center for Infectious Disease Modeling and Analysis, Yale School of Public Health.

⁴ Laboratory of Bioinformatics and Evolutionary Biology, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

⁵ Laboratory of Leishmaniasis, Teresina, Brazil

⁶ The Hebrew University of Jerusalem, Israel. The Kuvim Centre for the Study of Infectious and Tropical Diseases, Hadassah Medical School.

⁷ Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

Abstract

Little is known about the relationships of hematophagous insects and plants. The plant feeding selection of *Lutzomyia longipalpis* at a tropical city with high incidence of the protozoosis visceral leishmaniasis, transmitted by these sand flies, was studied. *L. longipalpis* were collected using CDC traps at a single location. DNA barcode was searched for plant families using specific primers for a locus from the chloroplast genome, ribulose diphosphate carboxylase (*rbcL*). Also, DNA from all trees or shrubs within a 100-meter radius from the trap was collected to build a barcode reference library for the *rbcL* gene. The distance from the trees to the trap and the average expansion of the tree crowns were assessed. The results pointed that from the 14 plant families at the harvest site five were not found in the insects' digestive tract. While Anacardiaceae and Meliaceae were the most abundant, they were found only in few insects, while Fabaceae, despite the low abundance (2.9%), was detected in 94.7% of the sandflies. Since there was no correlation between the fed plant families and tree number, distance or crown expansion we concluded that there was a strong feeding selection by *L. longipalpis*, with preference for the Fabaceae family.

Keywords: DNA barcode library; Fabaceae; sandflies; *rbcL* gene

1 INTRODUCTION

Plants positively influence the insect fauna, once they increase the quality and availability of resources (Costa *et al.*, 2010); they supply the insects with food, protection against predators and adequate shelter to lay their eggs (Mello e Silva-Filho, 2002; Gawande *et al.*, 2014). Environmental changes caused by certain plants can modify the behavior of disease vectors (Conley *et al.*, 2011).

Visceral leishmaniasis is a lethal disease caused by protozoa from the *Leishmania* genus, and became an urban plague in Brazil during the 1980s after an outbreak in the city of Teresina (Costa *et al.*, 1990). Since the first outbreak took place after a massive planting of acacias in this city, the hypothesis that the two events could be connected was brought to light.

In fact, the interactions between sandflies and vegetation were verified, showing influences both in the composition of the species (Rutledge e Ellenwood, 1975) and abundance (Cameron *et al.*, 1995) of these insects. Costa (2008) suggested a relation between specific plant species that, specifically, attract *L. longipalpis* or offer protection against predators, what would lead to a vector proliferation in those areas where these plants are abundant.

Sandflies require vegetal sugars as energy source and for reproduction (Jacobson *et al.*, 2007; Mascari e Foil, 2010; Muller e Schlein, 2011) Although this feeding relation is important, there is little information about specific sources for these sugars and about how sandflies are attracted to plants, especially under natural conditions (Cameron *et al.*, 1995; Muller *et al.*, 2011).

In order to increase the knowledge about the ecology of insects and plants, more information about insect-plant interaction is necessary (Gravendeel *et al.*, 2009). The direct analysis of the plant content in the insect's digestive tract is a precise approach to identify the feeding behavior (Matheson *et al.*, 2008).

The use of the DNA barcode tool, a technique that is able to identify the food content in invertebrates, using short sequences obtained in conserved regions of the chloroplast and further compared to databases, has been widely reported in the literature (Jurado-Rivera *et al.*, 2009; Pumarino *et al.*, 2011; Staudacher *et al.*, 2011; Wallinger *et al.*, 2013). The use, specifically, of the ribulose diphosphate carboxylase (*rbcL*) gene searching for this feeding link has also been successfully described (Gravendeel *et al.*, 2009; Garcia-

Robledo *et al.*, 2013; Kajtoch, 2014). This same locus was used by Junnila *et al.* (2011b) to identify vegetal food content in sandflies of the *Phlebotomus papatasi* species.

The use of DNA barcode in urban environments allows, once precisely identifying the plants acting positively either in the sand fly's presence or vector capability, would help to implement urban landscaping strategies aiming to eliminate the vectors and, thus, controlling leishmaniasis or other vector borne diseases.

In face of this, this study aimed to identify the feeding relations between sandflies and the urban tropical vegetation in a city in the Brazilian Northeast with high rates of visceral leishmaniasis by using the DNA barcode technology.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Field collection of phlebotomine sandflies and plants.

Insect and plant collection were conducted in a region of the city of Teresina (05°07'700''S/42°46'426''W), capital of Piauí State, in Brazil's Northeast. The sandflies were captured using a CDC light trap, positioned in an animal shelter in a household. The trap remained in site for five consecutive nights working 12 hours per day (6 P.M. to 6 A.M.) in January, 2015. The captured sandflies were taken into the laboratory, in the same city. For every collection day, 20 insects of the *L. longipalpis* species were randomly separated (n=100). In order to avoid the contamination of the samples during the DNA extraction process, every plant fragment was removed from the insect's body as proposed by Matheson *et al.* (2008). After this procedure, the insects were stored at -80°C for further DNA extraction.

The botanical material (leaves and flowers) was collected under the inclusion criteria that plants should be, at the most, 100 meters apart from the sand fly trap. For every species (n=22), one specimen was placed in the Graziela Barroso Herbarium at the Federal University of Piauí. The botanical material for each specimen was properly identified, labeled and stored at -80°C until DNA extraction. Information about all species enrolled in the present study is provided in Supplementary Table S1.

For each specimen included in the study, variables as distance from the trap using a Garmin Dakota 10 GPS device (Garmin, USA) and the average expansion of the crown. For every collection day, values of temperature, relative humidity and wind speed were obtained along with the National Meteorology Institute (INMET).

2.2 DNA extraction, PCR and sequencing.

When extracting genomic DNA from the sandflies, they were put in 1.5mL test tubes and added 300 μ L of CTAB lysis buffer (50 mL 2x CTAB + 50mL ddH²O + 200mL mercaptoethanol (0.2%)). The samples were macerated with an Argos Pellet Mixer (Argos, USA) and, added 10 μ L K proteinase (Invitrogen, USA) per tube (concentration 10 mg/mL). Immediately after, the samples were incubated for two hours in a 60°C hot bath. From this moment on, the extraction continued using PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, USA) according to the manufacturer's instructions. The plant genomic DNA extraction was carried out using the kit BIOPUR Extração Mini Spin Planta (Biometrix, Brazil). The DNA was extracted and analyzed in 1% agarose gel under UV light and subsequently was quantified by using the spectrophotometer NanoDrop™ 2000 (ThermoScientific, USA) and the fluorometer Qubit® 2.0 (Invitrogen, USA).

For each separated DNA sample, a segment of chloroplast gene *rbcL* was amplified by PCR using the PCR Master Mix (Promega, USA) according to the manufacturer's instructions for a 50 μ L final volume, containing 1 μ L of each primer (Forward – ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC and Reverse – GTAAAATCAAGTCCACCRCG), and 5 μ L DNA template. The reactions took place in a T100 (Bio-Rad, USA) thermal cycler. The thermal cycle conditions were described by (Bafeel *et al.*, 2011). PCR products were visualized in 1% agarose gel under UV light and purified using ExoSap-IT (Affymetrix, USA) for the sand-fly samples and PureLink PCR Purification Kit (Invitrogen, USA) for the plants. Further, this material was quantified by using the spectrophotometer NanoDrop™ 2000 (ThermoScientific, USA) and the fluorometer Qubit® 2.0 (Invitrogen, USA). Sequencing was carried out in an ABI 3500 automatic sequencer (Applied Biosystems, USA).

Only sequences with a PHRED score above 30 were used in the analysis. Contig assembly was carried out using CodonCode Aligner (CodonCode Corporation). Local alignments were done using BLAST (Altschul *et al.*, 1990).

2.3 Assembly of DNA barcode library.

DNA sequences obtained from each primer were deposited in Genbank database linked to the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Supplementary Table

S1). The deposited sequences aimed towards building a reference library of plant species from tropical urban areas, particularly from the city of Teresina, Brazil.

2.4 Identification of the plant feeding material in sandflies

Each sequence of plant material found in the insects was compared to a local plant library using the BLASTIN tool. Only matches with e-value 0.0 and, at least, 90% identity were considered for the sandflies' plant feeding preference.

2.5 Statistical Methods

Descriptive statistics were summarized for individual plant characteristics and abiotic factors across the five trap days. Correlations between the average distance of the plant family from the trap, the average crown expansion of plants from a given family, the proportion of plants in the area from a given family, and the proportion of sandflies testing positive for DNA from a given plant family were investigated for the entire sample of sandflies.

All analyses were performed using R version 3.2.1 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

3 RESULTS

Across five days of trapping, 100 sandflies from the *L. longipalpis* species were randomly separated and had their guts analyzed for plant DNA, where the rate of positive identification was 57%. Plants from 14 families, hosting 205 specimens from 22 species, were found in the surrounding area (Supplementary Table S1). DNA from five plant families (Annonaceae, Musaceae, Poaceae, Rutaceae, Sapindaceae) was not found in any sand fly guts (Table 1). DNA from the Fabaceae family was most prevalent and was detected in 94.7% (54/57) of sandflies. The proportion of sandflies testing positive for DNA from a given plant family was not significantly correlated with local abundance of plants from that family, average distance of plants from the trap, or average crown expansion of plants in the family (Figure 1). A statistically significant, negative correlation was found between the average distance between plants from a family and the trap and their average crown expansion (Pearson $r = -0.77$; $p = 0.002$).

On average, each sand fly was positive for the DNA of 2.1 plant families (SD: 1.41). On a given sampling day, the DNA from four to eight of the plant families was detected in the

flies captured and analyzed (Table 2). Humidity was highest on the two days with lower temperatures (Day 1 and Day 4). On average, DNA from 7.5 plant families was detected in sandflies captured on the cooler, more humid days, while DNA from 5 plant families was detected in sandflies capture don the warmer, less humid days.

Table 1. Characteristics of plants by family and frequency of sand fly feeding

Plant Family	Abundance (% of local plant population)	Average Distance from Trap	Average Crown Expansion	N (%) Flies with DNA
Anacardiaceae	52 (25.4)	62.3	8.41	2 (3.5)
Bignoniaceae	2 (1.0)	50	9.27	2 (3.5)
Caricaceae	13 (6.3)	72.5	1.68	8 (14.0)
Fabaceae	6 (2.9)	62	8.43	54 (94.7)
Malpighiaceae	17 (8.3)	69.4	3.54	21 (36.8)
Meliaceae	26 (12.7)	62	4.14	1 (1.8)
Myrtaceae	5 (2.4)	60.8	3.97	7 (12.3)
Oxalidaceae	3 (1.5)	60	3.5	22 (38.6)
Rubiaceae	4 (2.0)	73.3	2.52	1 (1.8)
Annonaceae	18 (8.8)	53.4	2.58	0 (0.0)
Musaceae	13 (6.3)	73.1	2.9	0 (0.0)
Rutaceae	25 (12.2)	63.8	3.88	0 (0.0)
Sapindaceae	1 (0.5)	25	12.2	0 (0.0)
Poaceae	20 (9,8)	14.4	1.09*	0 (0.0)

*Average leaf area expansion

Table 2. Abiotic factors and sampling frequency per day of trapping

Trap day	Temperature (°C)	Air velocity (m/s)	Relative humidity	Number of sand flies caught and analyzed	Total number of plant families detected in the sand fly guts
1	23	0	92	12	7
2	26	1	78	12	6
3	26	0	83	12	5
4	24	1	92	12	8
5	26	0	81	9	4

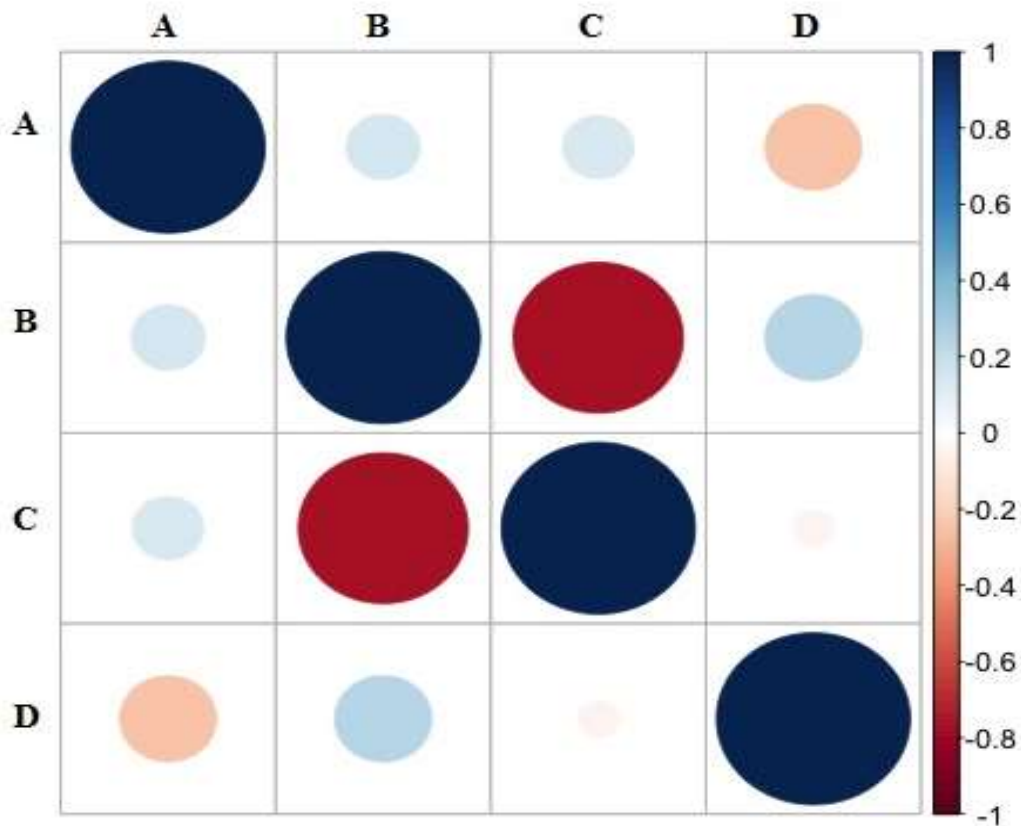


Figure 1. Correlation plot for relationships between the proportion of sandflies testing positive for DNA from a given plant family and plant characteristics. Red represents a negative correlation and blue represents a positive correlation. Larger circles represent stronger correlations. (A) Proportion of sandflies testing positive for DNA from a given plant family. (B) Average distance of plants from a given family to a trap. (C) Average crown expansion of plants from a given family. (D) Local abundance of plants from a given family

4 DISCUSSION

This study verified the detection of plant DNA in sand fly's digestive tract. This result was expected based in prior studies with *P. papatasi* (Junnila *et al.*, 2011b) and emphasizes that these insects feed directly from the plant's tissue (Warburg e Faiman, 2011; Stone e Foster, 2013), aiming to obtain sugars that will be used as energy sources (Cavalcante *et al.*, 2006).

In almost half the insects plant DNA was not detected, which may be explained by factors such as DNA degradation by enzymes in the digestive tract, as what happens with blood DNA absorbed by females during blood repast (Sant'anna *et al.*, 2008; Valinsky *et al.*,

2014), or due to sugar acquisition from sugared liquids excreted by aphids and coccidian (Souza *et al.*, 1995; Schlein e Jacobson, 1999).

At the sand fly capture site, vegetal species belonging to 14 families were collected, however, the Fabaceae family, despite its low abundance (2.9%) (Table 1), represented by only six specimens (Supplementary Table S1), and high average distance from the trap, was the most used food source by *L. longipalpis* (Table 1). Additionally, the DNA from the most abundant families and with representatives closer to the trap was found in fewer insects, Anacardiaceae and Meliaceae, or even none, Rutaceae, Annonaceae (Table 1 and Table S1). This evidences the fact that insects have a feeding preference regarding certain plants or plant families.

The Fabaceae, Anacardiaceae, Meliciaceae, Rutaceae and Annonaceae families have pantropical distribution, and the first is held as the third largest angiospermae family (Andrade *et al.*, 2009). The species composing the Fabaceae family have carbohydrate heterogeneity, varying from simple sugar to complex heteropolysaccharides (Aguilera e Stanley, 1985). The Anacardiaceae family is known for having many fruit trees of high economic value, due to their wood or for producing substances used in industry or medicine (Nadia *et al.*, 2007). The Meliaceae family has in common among its representatives the meliacin, known for their insecticide properties (Pereira Júnior *et al.*, 1993). The Rutaceae family has a large variety of secondary metabolites, as alkaloid derived from amino acids, besides coumarin, lignana, limonoid, flavonoids and terpenoids (Waterman e Grundon, 1983). Species belonging to the Annonaceae family draw interest for the production of bio compounds extracted from several parts of the plants for their medicinal, allelopathic or pesticide properties (Lemos, 2014).

The sand fly attraction to certain plants has been reported in different studies (Schlein e Warburg, 1986; Schlein e Yuval, 1987; Junnila *et al.*, 2011a), as well as for certain honey odors (Wasserberg *et al.*, 2014). According to Muller e Schlein (2011), sand flies seeking for carbohydrates are primarily guided by the preference of attractive factors. These factors can be the carbohydrates from the composition of certain plants or plant families, high CO₂ emission, taking place in branches with higher sugar concentrations, which can be detected by the insect (Schlein e Jacobson, 2008), or even the release of a phytochemical affecting the olfactory system (Foster, 2008; Machado *et al.*, 2015).

For Muller *et al.* (Muller *et al.*, 2011), who evaluated the *P. papatasi* attraction index for different plant species, the phytochemicals present different potential attractions for the insects. Magalhaes-Junior *et al.* (Magalhaes-Junior *et al.*, 2014) verified that volatile plant compounds, 1-octen-3-ol, 1-nonanol and 1-heptanol, can act as attractive factors for insects from the *L. longipalpis* species.

Assessing the results of a crosscheck between abiotic factors and the maximum amount of vegetal families detected in the insects/collection day, it was evidenced that in those days with lower temperatures and higher relative humidity, more plant families were used as a feeding sources. However, no reports were found in the literature about how these factors influence the sugar acquisition dynamics in these insects. Currently, it is known that abiotic factors such as temperature and relative humidity influence the population dynamics in the different sand fly species (Marcondes *et al.*, 2001; Barata *et al.*, 2011; Prudhomme *et al.*, 2015) including *L. longipalpis* (Ximenes *et al.*, 2006).

This way, the study proved there is indeed a feeding preference by *L. longipalpis* for the Fabaceae family, which includes the *Acacia* genus, represented in this study, by the *Albizia niopoides*, *Anadenanthera macrocarpa*, *Cenostigma macrophyllum* and *Tamarindus indica*. At the same time, the data points that *L. longipalpis* does not have affinity with the Anacardiaceae, Meliaceae, Rutaceae and Annonaceae families.

Once verified the clear positive and negative feeding associations of *L. longipalpis* and plant families, it is necessary to observe whether this association is reflected in the abundance of sandflies. If so, it may have been a large step towards ecologic and clean control of urban plagues transmitted by vectors, in a specially important moment when the Zika virus pandemic, transmitted by the *Aedes aegypti*, is declared an emergency (World Health Organization, 2016).

It is also recommended that new studies relating the feeding interaction between sandflies and plants focus not only in the identification of plant species or plant families serving as a carbohydrate source, but also in the identification of the chemical components that lead to the insect preference for certain food source. Additionally, it is necessary to understand the role of each abiotic factor in this feeding process, and this way, sand fly population control measures may be applied.

REFERENCES

- AGUILERA, J. M.; STANLEY, D. W. A review of textural defects in cooked reconstituted legumes– the influence of storage and processing. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 9, n. 3, p. 145-169, 1985.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol**, v. 215, n. 3, p. 403-10, Oct 5 1990.
- ANDRADE, A. L. P.; MIOTTO, S. T. S.; SANTOS, É. P. D. A subfamília Faboideae (Fabaceae Lindl.) no Parque Estadual do Guartelá, Paraná, Brasil. **Hoehnea**, v. 36, p. 737-768, 2009.
- BAFEEL, S. O. et al. Comparative evaluation of PCR success with universal primers of maturase K (matK) and ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase oxygenase large subunit (rbcL) for barcoding of some arid plants. **Plant Omics**, v. 4, n. 4, p. 195-198, Jul 2011.
- BARATA, R. A. et al. Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in Governador Valadares, a transmission area for American tegumentary leishmaniasis in State of Minas Gerais, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 44, n. 2, p. 136-9, Mar-Apr 2011.
- CAMERON, M. M. et al. Sugar meal sources for the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Ceará State, Brazil. **Med Vet Entomol**, v. 9, n. 3, p. 263-272, 1995.
- CAVALCANTE, R. R. et al. Ingestion of saliva during carbohydrate feeding by *Lutzomyia longipalpis* (Diptera; Psychodidae). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 1, p. 85-7, Feb 2006.
- CONLEY, A. K.; WATLING, J. I.; ORROCK, J. L. Invasive plant alters ability to predict disease vector distribution. **Ecol Appl**, v. 21, n. 2, p. 329-34, Mar 2011.
- COSTA, C. H. N. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cad Saude Publica**, v. 24, p. 2959-2963, 2008.
- COSTA, C. H. N.; PEREIRA, H. F.; ARAÚJO, M. A. Epidemia de leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. **Rev Saude Publica**, v. 24, p. 361-72, 1990.
- COSTA, F. V. et al. Relationship between plant development, tannin concentration and insects associated with *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae). **Arthropod-Plant Interactions**, v. 5, n. 1, p. 9-18, 2010.
- FOSTER, W. A. Phytochemicals as population sampling lures. **J Am Mosq Control Assoc**, v. 24, n. 1, p. 138-46, Mar 2008.
- GARCIA-ROBLEDO, C. et al. Tropical Plant-Herbivore Networks: Reconstructing Species Interactions Using DNA Barcodes. **PLoS One**, v. 8, n. 1, Jan 8 2013.
- GAWANDE, N. D. et al. Molecular screening of insecticides with sigma glutathione S-transferases (GST) in cotton aphid *Aphis gossypii* using docking. **Bioinformation**, v. 10, n. 11, p. 679-83, 2014.

- GRAVENDEEL, B.; EURLINGS, M.; HEIJERMAN, T. Use of DNA barcoding for host plant identification. **Entomologische Berichten**, v. 69, n. 2, p. 30-35, 2009.
- JACOBSON, R. L.; STUDENTSKY, L.; SCHLEIN, Y. Glycolytic and chitinolytic activities of *Phlebotomus papatasi* (Diptera : Psychodidae) from diverse ecological habitats. **Folia Parasitol (Praha)**, v. 54, n. 4, p. 301-309, Nov 2007.
- JUNNILA, A.; MULLER, G. C.; SCHLEIN, Y. Attraction of *Phlebotomus papatasi* to common fruit in the field. **Journal of Vector Ecology**, v. 36 Suppl 1, p. S206-11, Mar 2011a.
- _____. Identification of plant tissues from the gut of *Phlebotomus papatasi* by DNA analysis. **Acta Trop**, v. 117, n. 1, p. 14-18, Jan 2011b.
- JURADO-RIVERA, J. A. et al. **DNA barcoding insect–host plant associations**. 2009. 639-648 Disponível em: <
<http://rspb.royalsocietypublishing.org/royprsb/276/1657/639.full.pdf> >.
- KAJTOCH, L. A DNA metabarcoding study of a polyphagous beetle dietary diversity: the utility of barcodes and sequencing techniques. **Folia Biol (Krakow)**, v. 62, n. 3, p. 223-34, 2014.
- LEMOS, E. E. P. D. A produção de anonáceas no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 77-85, 2014.
- MACHADO, V. E. et al. Attraction of the sand fly *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) to chemical compounds in a wind tunnel. **Parasit Vectors**, v. 8, n. 1, p. 1-4, 2015.
- MAGALHAES-JUNIOR, J. et al. A laboratory evaluation of alcohols as attractants for the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae). **Parasit Vectors**, v. 7, 2014.
- MARCONDES, C. B.; SANTOS-NETO, L. G.; LOZOVEI, A. L. Ecology of phlebotomine sandflies (Diptera, Psychodidae) in Brazilian Atlantic Forest. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 34, n. 3, p. 255-60, May-Jun 2001.
- MASCARI, T. M.; FOIL, L. D. Laboratory Evaluation of the Efficacy of Fluorescent Biomarkers for Sugar-Feeding Sand Flies (Diptera: Psychodidae). **J Med Entomol**, v. 47, n. 4, p. 664-669, Jul 2010.
- MATHESON, C. D. et al. A PCR method for detection of plant meals from the guts of insects. **Organisms Diversity & Evolution**, v. 7, n. 4, p. 294-303, 2008.
- MELLO, M. O.; SILVA-FILHO, M. C. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 14, p. 71-81, 2002.

- MULLER, G. C.; REVAY, E. E.; SCHLEIN, Y. Relative attraction of the sand fly *Phlebotomus papatasi* to local flowering plants in the Dead Sea region. **Journal of Vector Ecology**, v. 36 Suppl 1, p. S187-94, Mar 2011.
- MULLER, G. C.; SCHLEIN, Y. Different methods of using attractive sugar baits (ATSB) for the control of *Phlebotomus papatasi*. **Journal of Vector Ecology**, v. 36 Suppl 1, p. S64-70, Mar 2011.
- NADIA, T. D. L.; MACHADO, I. C.; LOPES, A. V. Polinização de *Spondias tuberosa* Arruda (Anacardiaceae) e análise da partilha de polinizadores com *Ziziphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae), espécies frutíferas e endêmicas da caatinga. **Brazilian Journal of Botany**, v. 30, p. 89-100, 2007.
- PEREIRA JÚNIOR, O. L. et al. ATIVIDADE BIOLÓGICA DE UM NOVO TRITERPENÓ ISOLADO DE *Guarea cannata* (MELIACEAE). **Acta Amazonica**, v. 23, p. 173-176, 1993.
- PRUDHOMME, J. et al. Ecology and spatiotemporal dynamics of sandflies in the Mediterranean Languedoc region (Roquedur area, Gard, France). **Parasit Vectors**, v. 8, n. 1, p. 642, 2015.
- PUMARINO, L.; ALOMAR, O.; AGUSTI, N. Development of specific ITS markers for plant DNA identification within herbivorous insects. **Bull Entomol Res**, v. 101, n. 3, p. 271-276, Jun 2011.
- RUTLEDGE, L. C.; ELLENWOOD, D. A. Production of *Phlebotomine* sand flies on the open forest floor in Panama: phytologic and edaphic relations. **Environ Entomol**, v. 4, p. 83-89, 1975.
- SANT'ANNA, M. R. et al. Blood meal identification and parasite detection in laboratory-fed and field-captured *Lutzomyia longipalpis* by PCR using FTA databasing paper. **Acta Trop**, v. 107, n. 3, p. 230-7, Sep 2008.
- SCHLEIN, Y.; JACOBSON, R. L. Sugar meals and longevity of the sandfly *Phlebotomus papatasi* in an arid focus of *Leishmania major* in the Jordan Valley. **Med Vet Entomol**, v. 13, n. 1, p. 65-71, Feb 1999.
- _____. High nocturnal CO₂ emanation guides the sand fly *Phlebotomus papatasi* to sugar-rich plants. **Physiological Entomology**, v. 33, n. 4, p. 353-359, Dec 2008.
- SCHLEIN, Y.; WARBURG, A. Phytophagy and the feeding cycle of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) under experimental conditions. **J Med Entomol**, v. 23, n. 1, p. 11-5, Jan 24 1986.
- SCHLEIN, Y.; YUVAL, B. Leishmaniasis in the Jordan Valley IV. Attraction of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) to plants in the field. **J Med Entomol**, v. 24, n. 1, p. 87-90, 1987-01-01 00:00:00 1987.

- SOUZA, N. A. et al. The influence of sugars and amino acids on the blood-feeding behaviour, oviposition and longevity of laboratory colony of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 90, n. 6, p. 751-7, Nov-Dec 1995.
- STAUDACHER, K. et al. Detecting ingested plant DNA in soil-living insect larvae. **Soil Biol Biochem**, v. 43, n. 2, p. 346-350, Feb 2011.
- STONE, C. M.; FOSTER, W. A. Plant-sugar feeding and vectorial capacity. In: (Ed.). **Ecology of parasite-vector interactions**. Wageningen: Wageningen Academic Publishers, 2013. p.35-79. ISBN 978-90-8686-744-8.
- VALINSKY, L. et al. Molecular identification of bloodmeals from sand flies and mosquitoes collected in Israel. **J Med Entomol**, v. 51, n. 3, p. 678-85, May 2014.
- WALLINGER, C. et al. The effect of plant identity and the level of plant decay on molecular gut content analysis in a herbivorous soil insect. **Molecular Ecology Resources**, v. 13, n. 1, p. 75-83, Jan 2013.
- WARBURG, A.; FAIMAN, R. Research priorities for the control of phlebotomine sand flies. **Journal of Vector Ecology**, v. 36 Suppl 1, p. S10-6, Mar 2011.
- WASSERBERG, G.; KIRSCH, P.; ROWTON, E. D. Orientation of colonized sand flies *Phlebotomus papatasi*, *P. duboscqi*, and *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) to diverse honeys using a 3-chamber in-line olfactometer. **Journal of Vector Ecology**, v. 39, n. 1, p. 94-102, Jun 2014.
- WATERMAN, P. G.; GRUNDON, M. F. Chemistry and Chemical Taxonomy on the Rutales. **London, Academic Press**, p. 308-309, 1983.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Zika virus disease. 2016. Disponível em: < <http://www.who.int/csr/disease/zika/en/> >. Acesso em: 11th February 2016.
- XIMENES, M. D. F. F. D. M. et al. Effect of Abiotic Factors on Seasonal Population Dynamics of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in Northeastern Brazil. **J Med Entomol**, v. 43, n. 5, p. 990-995, 2006-09-01 00:00:00 2006.

Apêndice A

Tabela S1: General information on the studied plant species.

Species	Family	Access number herbarium	Access number Genbank	Number of trees (%)	Mean distance to the trap (meters)	Distance from the trap of the closest tree (meters)	Mean crown expansion (meters)
<i>Spondias mombin L.</i>	Anacardiaceae	30.560	KU559208	4 (2.0)	52.0	45	11.43
<i>Mangifera indica</i>	Anacardiaceae	30.728	KU559238	33 (16.1)	60.5	12	7.75
<i>Spondias purpurea L.</i>	Anacardiaceae	30.742	KU559247	3 (1.5)	58.0	47	8.36
<i>Anacardium occidentale</i>	Anacardiaceae	30.555	KU559209	12 (5.9)	71.9	20	9.20
<i>Annona squamosa</i>	Annonaceae	30.532	KU559199	18 (8.8)	53.4	2	2.58
<i>Tabebuia alba</i>	Bignoniaceae	30.738	KU559229	2 (1.0)	50.0	40	9.27
<i>Carica sp.</i>	Caricaceae	30.732	KU559237	13 (6.3)	72.5	50	1.68
<i>Albizia niopoides Burkat</i>	Fabaceae	30.725	KU559197	2 (1.0)	62.0	56	10.13
<i>Anadenanthera macrocarpa</i>	Fabaceae	30.767	KU559198	1 (0.5)	40.0	40	8.00
<i>Cenostigma macrophyllum</i>	Fabaceae	30.548	KU559211	2 (1.0)	69.5	67	9.18
<i>Tamarindus indica L.</i>	Fabaceae	30.716	KU559249	1 (0.5)	69.0	69	4.00
<i>Malpighia glabra</i>	Malpighiaceae	30.529	KU559194	17 (8.3)	69.4	20	3.54
<i>Azadirachta indica</i>	Meliaceae	30.556	KU559241	26 (12.7)	62.0	24	4.14
<i>Musa sp.</i>	Musaceae	30.737	KU559202	13 (6.3)	73.1	52	2.90
<i>Psidium guajava</i>	Myrtaceae	30.723	KU559228	4 (2.0)	71.5	57	3.58
<i>Syzygium malaccense</i>	Myrtaceae	30.739	KU559231	1 (0.5)	18.0	18	5.55
<i>Averrhoa carambola</i>	Oxalidaceae	30.557	KU559212	3 (1.5)	60.0	35	3.50
<i>Zea mays</i>	Poaceae	30.733	KU559240	20 (9.8)	14.4	7	1.09
<i>Morinda citrifolia L.</i>	Rubiaceae	30.731	KU559242	4 (2.0)	73.3	46	2.52
<i>Citrus sinensis</i>	Rutaceae	30.715	KU559235	14 (6.8)	66.1	19	4.09
<i>Citrus sp.</i>	Rutaceae	30.727	KU559236	11 (5.4)	60.8	40	3.61
<i>Talisia esculenta</i>	Sapindaceae	30.719	KU559246	1 (0.5)	25.0	25	12.20