MARA MARIA IZAR DE MAIO GODOI

***PHYTOMONAS* E OUTROS TRIPANOSSOMATÍDEOS
EM INSETOS NO ESTADO DE RONDÔNIA
- Amazônia Ocidental -**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

SÃO PAULO
2000

MARA MARIA IZAR DE MAIO GODOI

***PHYTOMONAS* E OUTROS TRIPANOSSOMATÍDEOS
EM INSETOS NO ESTADO DE RONDÔNIA
- Amazônia Ocidental -**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração:
Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro.

Orientador:
Prof. Dr. Erney F. Plessmann de Camargo.

SÃO PAULO
2000

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Godoi, Mara Maria Izar de Maio.
Phytomonas e outros Tripanossomatídeos em insetos no estado de Rondônia –
Amazônia ocidental / Mara Maria Izar de Maio Godoi. -- São Paulo, 2000.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São
Paulo. Departamento de Parasitologia.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro.

Linha de pesquisa: Parasitologia.

Orientador: Camargo, Erney Felício Plessman de.

Versão do título para o inglês: *Phytomonas* and others Trypanosomatids of Insects in
Rondônia States. -Occidental Amazon-

Descritores: 1. Tripanossomatídeos em insetos 2. Diagnóstico 3. SL-PCR 4.
Hibridação 5. "Spliced leader" 6. Amazônia Ocidental

ICB/SBIB155/2000

Candidata: Mara Maria Izar de Maio Godoi.

Título da Dissertação: *Phytomonas* e outros Tripanossomatídeos em insetos no estado de Rondônia – Amazônia Ocidental.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da
Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a/...../.....,
considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovada** () **Reprovada**

1) **Examinador(a)** _____

2) **Examinador(a)** _____

3) **Presidente** _____

Este trabalho contou com apoio financeiro
do PRONEX e com bolsa de estudos da
CAPES/CNPq.

Ao meu marido

Sem seu carinho, dedicação, amor e respeito,
com seu apoio ilimitado, sempre meu porto seguro
...nada seria construído.

Aos meus filhos
Jose Roberto,
Guilherme e
Rafael,

Que souberam valorizar e estimular as conquistas realizadas.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr Erney F. Plessmann de Camargo pela valiosa orientação, pela oportunidade que me foi concedida e pela confiança em mim depositada.

Ao professor Dr Luis Hildebrando Pereira da Silva por ter me trazido de volta à pesquisa e pelo muito que me auxiliou na fase inicial da execução do projeto.

Aos professores do Departamento de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Rondônia que com seu trabalho sustentaram minha ausência.

A professora Dr^a Marta M. G. Teixeira pelas sugestões apresentadas durante a realização deste trabalho.

Ao Professor Dr Osvaldo Marinoti pela oportunidade de realizar parte deste trabalho em seu laboratório.

A Ms Marta Campaner pela amizade e pela grande colaboração desde o início deste trabalho.

A Dr^a Rosa Amélia Maldonado pela amizade e sugestões precisas no momento certo.

Ao Professor Dr Gehrard Wunderlich pelo incentivo e colaboração em todos os momentos.

Aos professores do Departamento de Parasitologia do ICB/USP e do CEPEN que contribuíram para minha formação.

A amiga Maria José Menezes pela insubstituível amizade e colaboração em todos os momentos.

Ao Wolfgang Fisher pela amizade e pela manutenção técnica do laboratório.

A Dr^a Mirna Serrano pelo auxílio e sugestões na realização deste trabalho.

Aos amigos e colegas de trabalho do CEPEM, Centro de Pesquisa de Malaria do estado de Rondônia pelo agradável convívio.

A Wilma, Yladir e Cidinha, secretárias da pós-graduação do Departamento de Parasitologia pela amizade e pelo auxílio nos assuntos burocráticos.

Ao Cassiano pela ajuda na parte de informática.

Aos meus familiares que sempre tiveram palavras de incentivo e várias atitudes de apoio.

A todos os amigos do Departamento de Parasitologia, Lis, Fabiana, Renata, Renata Kelly, Flávia, Fernando, Erica, Claudia, Leila, Cris, Andréia, Enios e outros pelo ambiente agradável de convívio ajudando a segurar a saudades.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho

Sumário

Lista de figuras.....	I
Lista de tabelas.....	ii
Abreviaturas.....	iv
1. Introdução.....	1
1.1. A Família Trypanosomatidae.....	2
1.2. O Gênero Phytomonas.....	4
1.2.1. Morfologia.....	5
1.3. Tripanossomatídeos de insetos.....	7
1.3.1 Tripanossomatídeos de emípteros.....	7
1.4. Transmissão.....	8
1.5. Identificação e taxonomia.....	10
1.5.1. Características moleculares.....	11
1.5.1.1. Mecanismos de trans-splicing.....	12
1.5.1.2. Trans-splicing em Phytomonas.....	13
1.6. Objetivos.....	16
2. Materiais e Métodos.....	18
2.1. Coleta.....	19
2.2. Isolamento, cultura e manutenção.....	20
2.3. Morfologia e Morfometria.....	22
2.4. Extração do DNA.....	23
2.5. PCR.....	23
2.6. Transferência de DNA.....	24
2.7. Fosforilação do oligonucleotídeo.....	25
2.8 Reações de hibridização, lavagem e processamento das membranas..	25
3. Resultados.....	27
3.1 Levantamento e identificação das espécies de insetos hemípteros....	28
3.2 Distribuição de hemípteros fitófagos nas estações climáticas.....	28

3.3 Tripanossomatídeos isolados de hemípteros.....	30
3.4 Morfologia e Morfometria.....	30
3.4.1 Grupo 1.....	31
3.4.2 Grupo 2.....	32
3.4.3 Grupo 3.....	34
3.4.4 Grupo 4.....	36
3.5 Marcadores Moleculares.....	37
3.5.1 Comparação do grupo Phytomonas com grupos 1, 2, 3 e 4.....	41
3.5.2 Análise dos resultados utilizando marcadores moleculares.....	43
4. Discussão.....	45
5. Conclusão.....	50
6. Referências Bibliográficas.....	53
Resumo.....	58
Abstract.....	59
Esta dissertação contém um CD	

Lista de Figuras

Figura nº	página
1- Estágios morfológicos de tripanossomatídeos inferiores.....	2
2- Flagelados encontrados no látex de Euphorbia.....	5
3- Exemplos de polimorfismo e plasticidade.....	6
4- Ciclo de vida dos Phytomonas.....	9
5- Representação esquemática da via de spliced-leader.....	12
6- Representação esquemática do gene SL de Phytomonas....	13
7- Oligonucleotídeos PSL1, PSL2, sonda SL3.....	24
8- Representativo de amplificação e hibridação	37

Lista de Tabelas

Tabela n ^o	página
1- Hemípteros coletados em Rondônia.....	28
2- Hemípteros coletados em Rondônia nas duas estações climáticas.....	28
3- Prevalência de tripanossomatídeos, segundo gênero e espécie de hemípteros.....	29
4- Cultura de tripanossomatídeos.....	30
5- Tripanossomatídeos do Grupo 1.....	31
6- Medidas em μm dos tripanossomatídeos do Grupo1.....	32
7- Tripanossomatídeos do grupo 2.....	33
8- Medidas em μm dos tripanossomatídeos do Grupo 2.....	34
9- Tripanossomatídeos do grupo 3.....	35
10- Medidas em μm dos tripanossomatídeos do Grupo 3.....	35
11- Tripanossomatídeos do grupo 4.....	36
12- Medidas em μm dos tripanossomatídeos do Grupo 4.....	36
13- Detecção de Phytomonas de hemípteros infectados com tripanossomatídeos a partir do DNA amplificado de glândulas salivares e tubo digestivo por Try-SLPCR e hibridação com a sonda SL3'.....	38
14- Detecção de Phytomonas utilizando como molde o DNA de glândulas salivares e tubo digestivo de hemípteros extraídos de laminae negativas para MI para amplificação por Try-SLPCR e hibridação com SL3'.....	39
15- Amplificação por Try-SLPCR do DNA de tripanossomatídeos extraídos de laminae e hibridação com a sonda SL3'.....	39
16- Amplificação por Try-SLPCR e hibridação com SL3' de DNA de tripanossomatídeos extraídos de lâminas, das formas coanomastigotas e amastigotas.....	40

17- Amplificação por Try-SLPCR e hibridação com SL3' de DNA de tripanossomatídeos extraídos de lâminas, positivos para MI.....	40
18- Amplificação por Try-SLPCR e hibridação com SL3' de DNA de tripanossomatídeos extraídos de lâminas.....	41
19- Relação Phytomonas identificadas por marcadores moleculares...	42
20- Medidas em μm de Phytomonas sp.....	43
21- Relação de Trypanosomatidae e Phytomonas definidos por marcadores moleculares e espécies de hemípteros.....	44

Abreviaturas

ACMs	anticorpos monoclonais
dATP	desoxiadenosinatriposfato
DNA	acido desoxirribonucléico
IM	investigação microscópica
LIT	Liver Infusion Triptose
mRNA	RNA mensageiro
nt	nucleotídeos
PBS	Phosphate buffered saline (salina tamponada com fosfato)
pb	pares de bases
PCR	Polimerase Chain Reaction (reação em cadeia da Polimerase)
Phy-SLPCR	PCR para amplificação de DNA de <i>Phytomonas</i>
pre-mRNA	precursor do RNA mensageiro.
pre-medRNA	precursor do pre-mRNA
RNA	acido ribonucléico
SDS	dodecil sulfato de sódio
SL	“spliced lider”
SLPCR	“spliced lider” PCR
SL3’	sonda específica para gênero <i>Phytomonas</i> .
SSC	solução citrato salina padrão
TCC-USP	Trypanosomatid Culture Collection of the University of São Paulo
Try-SLPCR	PCR para amplificação Trypanosomatidae

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Família *Trypanosomatidae*

A ordem Kinetoplastida compreende organismos flagelados com um ou dois flagelos e uma única mitocôndria organizada em torno de uma rede de fibrilas concatenadas de DNA que em conjunto constituem o cinetoplasto, localizado à base do flagelo.

A família Trypanosomatidae compreende Kinetoplastida com um único flagelo. São todos parasitas mono ou heteroxênicos.

Os gêneros *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Endotrypanum* e *Phytomonas* são parasitas heteroxênicos com hospedeiros invertebrados e vertebrados ou plantas no caso de *Phytomonas*. Outros quatro gêneros, *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Leptomonas* e *Herpetomonas* são parasitas monoxênicos de insetos e de outros poucos invertebrados. A localização do cinetoplasto em relação ao núcleo, a presença ou ausência de membrana ondulante e flagelo são as principais características que definem morfológicamente as diversas formas evolutivas dos tripanossomatídeos (Wallace, 1966) (fig.1).

Fig. 1 - Estágios morfológicos de tripanossomatídeos inferiores 1 - promastigota, 2 - opisthomastigota, 3 - amastigota, 4 - epimastigota, 5 - tripomastigota, 6 - coanomastigota (apud Vickerman, 1976).

No gênero *Leptomonas*, encontramos tripanossomatídeos monogenéticos, parasitas de protozoários e metazoários como nematódeos, moluscos e uma ampla variedade de insetos como dípteros, hemípteros, himenópteros, sifonápteros e anopluros onde são encontrados no trato digestivo, hemocele e nas glândulas salivares. Em seu ciclo evolutivo aparecem formas promastigotas, acompanhadas ou não de cistos (Wallace, 1966).

No gênero *Herpetomonas*, encontramos parasitas monogenéticos do trato digestivo de insetos, principalmente dípteros, embora tenham sido descritos também em outros insetos, inclusive hemípteros e lepidópteros. Apresentam em seu ciclo evolutivo as formas promastigotas e opistomastigotas sendo que a forma opistomastigota caracteriza o gênero (Wallace, 1966).

No gênero *Crithidia* encontramos parasitas que têm a extremidade anterior truncada em funil ou colar, tomando um aspecto de “grão de cevada”. O flagelo apresenta movimento circular diferente dos demais tripanossomatídeos (Wallace, 1966).

O gênero *Blastocrithidia*, de hemípteros, tem a morfologia característica dos epimastigota, com uma membrana ondulante que acompanha o flagelo antes de sua emergência do corpo celular. O gênero é de fácil reconhecimento tanto em preparações a fresco como coradas, porém de difícil isolamento e cultivo em laboratório (Wallace, 1966).

São incluídos no gênero *Leishmania* flagelados heteroxênicos, parasitas de insetos flebotomíneos, nos quais são encontradas formas promastigotas, e de vertebrados, onde proliferam sob a forma de amastigotas intracelulares de macrófagos.

O gênero *Trypanosoma* é constituído de parasitas heteroxênicos de triatomíneos e de vertebrados, em cujo ciclo se alternam formas epimastigotas e

tripomastigotas (nos insetos); amastigotas intracelulares e tripomastigotas (nos vertebrados).

O gênero *Endotrypanum* é representado por parasitas heteroxênicos de flebotomíneos e mamíferos. Formas promastigotas e amastigotas são encontradas nos insetos, enquanto nos mamíferos, ocorrem as formas epimastigota e tripomastigota intra-eritrocitárias.

O gênero *Phytomonas* ocorre em plantas sob a forma de longos promastigotas com torções ao longo do corpo. Nos insetos eles também ocorrem como promastigotas, mas sem o que os distinga dos promastigotas de outros gêneros de tripanossomatídeos. (Camargo, 1999).

.1.2. O Gênero *Phytomonas*.

Lafont deu o nome de *Leptomonas davidi* a flagelados encontrados no látex de *Euphorbia pilulifera*. No mesmo ano, 1909, Donovan propôs o nome de *Phytomonas* como nome genérico para tripanossomatídeos parasitas de plantas, mas essa terminologia não foi aceita e durante muitos anos os flagelados de plantas eram referidos ao gênero *Leptomonas* ou *Herpetomonas*. Foi somente entre 1970 e 1980 que a denominação *Phytomonas* ganhou maior aceitação como nome genérico. Embora, como se demonstrou mais tarde, nem todos os flagelados de plantas fossem *Phytomonas* (Camargo, 1999).

Os *Phytomonas* são parasitas comumente encontrados no látex, floema, suco de frutas, sementes, albúmem, e néctar de muitas famílias de plantas. Eles são inoculados em seus hospedeiros com a saliva de insetos hemípteros fitófagos. Há controvérsias sobre a patogenicidade deste gênero em plantas laticíferas ou frutas, porém é certo que os parasitas do floema são patogênicos em coqueiros, dendezeiros, e que podem causar epidemias letais em mandioca e café, epidemias estas responsáveis pela destruição de muitas plantações na América Central e do Sul (Camargo, 1999).

1.2.1. Morfologia

A maioria dos flagelados de plantas apresenta-se como promastigotas segundo a terminologia de Hoare & Wallace (1966).

Morfologicamente não é possível distinguir tripanossomatídeos de plantas de tripanossomatídeos de insetos. Talvez seja por essa razão que os dois grupos constituíssem juntos o chamado grupo dos tripanossomatídeos inferiores, uma denominação que está aparentemente em desacordo com sua posição filogenética.

A microscopia óptica revela uma estrutura em comum para esse tipo de *Trypanosomatidae*: um núcleo, um cinetoplasto, um corpo celular alongado e um flagelo. O corpo celular torcido ao longo de um eixo longitudinal é uma característica comum adicional, porém não privativa dos promastigotas do gênero *Phytomonas*.

Fig. 2 – Flagelados encontrados no látex de Euphorbia. ‘A’ corresponde a grânulos de amido (apud Lafont, 1910).

Como os tripanossomatídeos de insetos, os flagelados de plantas se multiplicam por divisão binária longitudinal. Apesar de se reproduzirem por fissão binária e de possuírem morfologia promastigota, os flagelados de plantas apresentam extremo polimorfismo. Uma mesma espécie pode apresentar diferentes formas e tamanhos, não somente em diferentes hospedeiros ou meios de cultura como também no mesmo hospedeiro (França, 1920) (fig. 2).

O polimorfismo dos flagelados de plantas ocorre também em seus hospedeiros intermediários. Jankevicius et al. (1989) descreveram promastigotas com grande polimorfismo quanto ao comprimento do corpo celular, no intestino (4,1 a 16,6 μ m), nos túbulos de Malpighi (5,6 μ m) e nas glândulas salivares (5,7; 24 e 80 μ m) de *Phthia picta*, inseto vetor de *Phytomonas serpens* (Fig. 3).

Fig. 3 - Exemplos de polimorfismo e plasticidade morfológica em flagelados de plantas são numerosos. Alguns podem ser artefatos resultantes de pH alterado ou, de mudanças osmóticas ou nutricionais entre outras. (apud Jankevicius et al. 1989).

Os promastigotas também podem apresentar polimorfismo em um mesmo meio de cultura. Jankevicius et al. (1989) mostraram que promastigotas pequenos (10 μ m), sem torções ao longo do corpo, predominavam em culturas em meio LIT (Liver Infusion Tryptose medium); com o envelhecimento das culturas apareciam gigantes promastigotas de 60 μ m, com torções ao longo do corpo.

Camargo em revisão de 1999 considera que o polimorfismo dos flagelados de plantas tem duas importantes implicações:

1 - Promastigotas morfológicamente distintos podem corresponder a um estágio ainda desconhecido de desenvolvimento do ciclo de vida destes flagelados. Em cada tipo de hospedeiro (planta ou inseto) o flagelado muda sua forma e, presumivelmente, sua fisiologia. Estas mudanças podem ser seqüencialmente programadas e podem corresponder a etapas do ciclo biológico, como nos outros dois gêneros heteroxênicos *Trypanosoma* e *Leishmania*. 2 - O marcante polimorfismo intra-específico dos flagelados de plantas inviabiliza a morfologia como parâmetro identificatório e/ou taxonômico. Isto porque promastigotas de uma determinada espécie podem assemelhar-se mais a formas evolutivas de outras espécies. Medidas do comprimento do corpo e do flagelo tanto quanto à distância do núcleo para o cinetoplasto (que eram considerados critérios taxonômicos no passado) são hoje considerados inadequados para tal finalidade.

1.3. Tripanossomatídeos de insetos

Uma das primeiras observações de tripanossomatídeos em insetos foi feita por Antony van Leeuwenhoek, no trato digestivo de tabanídeos em 1632. A partir daí muitas espécies de tripanossomatídeos foram encontradas em muitas das famílias de artrópodes.

Atualmente são conhecidas aproximadamente 850.000 espécies de insetos. Destas, 348 espécies foram encontradas parasitadas por tripanossomatídeos (Wallace, 1983).

1.3.1. Tripanossomatídeos em Hemípteros

Aders, em 1909, foi o primeiro a relatar em trato digestivo e glândulas salivares de um hemíptero fitófago, *Aspongopi viduatus*, a presença de numerosos flagelados de diferentes formas e tamanho que foram classificados como *Herpetomonas aspongopi*.

Hemípteros fitófagos abrigam muitas espécies de tripanossomatídeos hetero e monoxênicos. Dados da literatura descrevem cerca de 100 diferentes espécies de flagelados encontrados em diferentes espécies de plantas onde se alimentam os hemípteros (Camargo & Wallace, 1994). Se considerarmos que são 23000 espécies conhecidas na Ordem dos Hemípteros, fica evidente que somente uma pequena fração de parasitas e hospedeiros é conhecida até agora.

Dos hemípteros encontrados parasitados por flagelados, 9% eram da família *Lygaeidae*, 40% da família *Coreidae*, 44% da família *Pyrrhocoridae* e 18% da família *Pentatomidae* (Sbravate et al., 1989). A prevalência geral de flagelados em Hemípteros fitófagos foi de 35%. Os tripanossomatídeos foram encontrados no tubo digestivo, hemocele e glândulas salivares dos insetos hospedeiros. Dentre os insetos infectados, 68,4% tinham flagelados exclusivamente no trato digestivo, outros 31,6% tinham flagelados em suas glândulas salivares e 31,6% apresentavam infecção do trato digestivo e das glândulas salivares. Dentre os protozoários encontrados a grande maioria era representada por promastigotas (99,9%) com grandes torções ao longo do corpo e uns poucos epimastigotas e coanomastigotas, geralmente misturados com os promastigotas.

Os flagelados encontrados em hemípteros fitófagos não são necessariamente parasitas de plantas. Eles podem ser parasitas monoxênicos de insetos. Os epimastigotas e coanomastigotas foram identificados como *Blastocrithia* e *Crithidia*, respectivamente, mas os promastigotas deixam sempre dúvida se são *Leptomonas*, *Phytomonas* ou *Herpetomonas* (Camargo, 1999).

1.4. Transmissão

Camargo & Wallace (1994) reviram as observações e experimentações sobre a transmissão de flagelados de plantas e descreveram as várias evidências que ligam hemípteros fitófagos à transmissão de *Phytomonas* para plantas. Lafont encontrou o *Lygaeidae*, *Nysius euphorbiae*, em plantas que abrigavam *Leptomonas davidi* tendo obtido infecção experimental de plantas com insetos alimentados em plantas naturalmente infectadas. Da mesma maneira vários

autores: Bouet & Roubaud, Strong, Holmes, Vickerman, McGhee, Hanson e outros também apresentaram evidências sobre o papel dos hemípteros na transmissão de flagelados de plantas (Camargo & Wallace, 1994).

Vale ressaltar a experiência de Jankevicius et al. (1989) na transmissão de *Phytomonas serpens* de *Phthia picta*, criados em laboratório, para tomates cultivados em laboratório (fig 4).

Fig. 4 – Experimentos sobre o ciclo de vida de *Phytomonas serpens* envolvendo tomates/insetos/cultura. (Jankevicius et al., 1989).

Infecções experimentais de frutos de solanáceas também foram realizadas por Kastelein & Camargo (1990) que conseguiram infectar insetos a partir de frutos infectados e infectar frutos, inclusive tomates, a partir de pentatomídeos infectados.

1.5 Identificação e Taxonomia

A taxonomia dos tripanossomatídeos de insetos permaneceu confusa até que Wallace propôs características morfo-evolutivas para definir os gêneros da família Trypanosomatidae (Wallace, 1966). Mesmo com esses novos critérios, a posição taxonômica do gênero *Phytomonas* continuou confusa, pois o critério hospedeiro de origem (plantas) continuava balisando sua definição (Camargo, 1999).

As características morfológicas e o hospedeiro de origem que constituíam os parâmetros básicos para identificação do gênero e descrição de espécies de tripanossomatídeos, revelaram-se com o tempo insuficientes para os tripanossomatídeos inferiores (Camargo et al., 1990).

O critério morfológico é inadequado visto que estágios morfológicos idênticos são compartilhados por vários gêneros em alguma fase do ciclo. As formas promastigotas podem ocorrer nos gêneros *Leptomonas*, *Herpetomonas*, *Phytomonas*, *Leishmania* e *Endotrypanum*. Nessas circunstâncias a descrição morfológica simples, sem critérios adicionais, não pode esclarecer a posição taxonômica e classificação de um organismo sob estudo. Por outro lado, o critério hospedeiro de origem ficou abalado quando descrições de infecções mistas e resultados de infecções experimentais de insetos demonstraram que a suposta especificidade parasita-hospedeiro era irreal. Insetos de variadas espécies podiam hospedar espécies distintas de tripanossomatídeos enquanto estes eram capazes de infectar extensa variedade de insetos (Camargo, 1999).

Entre os *Phytomonas*, os critérios morfológico e hospedeiro de origem claramente provocavam conflito, principalmente quando pesquisadores isolaram de plantas, tripanossomatídeos que tinham características de outros gêneros de tripanossomatídeos (Conchon et al., 1989).

Sem muita escolha, pesquisadores iniciaram estudos comparativos que pudessem eventualmente mostrar uma característica comum entre

tripanossomatídeos de plantas capaz de distingui-los dos gêneros *Leptomonas*, *Herpetomonas* e *Crithidia*.

Quando Dollet obteve as primeiras culturas de flagelados de látex, as características bioquímicas, sorológicas e moleculares dos isolados de plantas passaram a ser investigadas (Dollet et al., 1982). Os primeiros estudos permitiram comparações entre tripanossomatídeos inferiores: determinação de requerimentos nutricionais (Silva & Roitman, 1989), análise comparativa do padrão de migração eletroforética de isoenzimas (Camargo et al., 1982), análise do padrão radioautográfico de proteínas de superfície marcadas por iodo radioativo (Camargo et al., 1982), análise do padrão de migração eletroforética dos fragmentos de kDNA gerados por enzima de restrição (Camargo et al., 1982), estudo comparativo entre enzimas do ciclo ornitina arginina (Camargo et al., 1987), reatividade com anticorpos monoclonais específicos (Teixeira et al., 1989), testes de aglutinação com Lectinas (Petry et al., 1987), análise de restrição dos genes ribossomais dos tripanossomatídeos (Camargo et al., 1992) e sondagem do gene “spliced leader” (Nunes et al., 1995; Teixeira et al., 1996).

Esses métodos permitiram avançar na caracterização do gênero *Phytomonas* levando diversos autores a usá-los para a identificação de *Phytomonas* entre os tripanossomatídeos encontrados em insetos (Sbravate et al., 1989; Teixeira et al., 1996).

1.5.1 - Características Moleculares: A análise de seqüências de DNA na caracterização de Tripanossomatídeos.

Técnicas da Biologia Molecular têm sido utilizadas com êxito na identificação de parasitas, particularmente as reações de amplificação em cadeia (PCR - Polymerase Chain Reaction) acopladas a hibridizações com sondas específicas. (Nunes et al., 1995; Teixeira et al., 1996; Serrano et al., 1999).

Em *Phytomonas*, 2 conjuntos de genes têm recebido atenção por sua utilidade taxonômica, o DNA ribossomal e o gene “spliced leader” ou mini-exon.

Aplicadas na identificação de parasitas cultivados em laboratório ou presentes em amostras biológicas de hospedeiros e vetores, seqüências específicas desses genes têm se revelado de grande utilidade diagnóstica (Teixeira et al., 1996; Serrano et al., 1999, a, b) e taxonômica (Serrano et al., 1999 c).

1.5.1.1. Mecanismos de *trans*-splicing.

O gene “spliced leader”, SL, dos Kinetoplastida está envolvido no processo de maturação do RNA mensageiro, através de um mecanismo de *trans*-splicing restrito a protozoários, alguns nematódeos e platelmintos.

Fig.5 - Representação esquemática da via de spliced do pre-mRNA. Os exons estão nos boxes. . Bp, ponto de ramificação. DebrEnz, enzima de desramificação . O círculo representa a estrutura cap4 do SL RNA.

O *trans*-splicing é uma reação de processamento de RNA em que exons de duas moléculas distintas de RNA, o pre-mRNA e um pequeno RNA, o “spliced leader” (SL) RNA, são ligadas para formarem moléculas maduras de mRNA (fig 5). A seqüência SL que representa a extremidade 5’ do SL RNA, é ligada ao sítio 3’ de spliced localizado no limite do mRNA maduro dentro do pre-mRNA policistrônico (Agabian, 1990, Ullu, 1996).

1.5.1.2. *Trans* splicing em *Phytomonas*.

Como para os tripanossomatídeos em geral, o processo de maturação do mRNA em *Phytomonas* também envolve o *trans*-splicing de uma sequência de 39 nucleotídeos (nt) para um precursor, o pre-medRNA. Esse 39nt precursor é codificado pelo gene “spliced leader” ou mini exon encontrado no genoma de tripanossomatídeos entre 100-200 repetições em tandem (fig.6).

Fig. 6 - Representação esquemática do gene SL de *Phytomonas* sp. Localização dos oligonucleotídeos PSL1 e PSL2, usados como iniciadores para amplificação por PCR, e os oligonucleotídeos SL3' e SL201, usados como sondas para hibridação por Southern blot.

Cada gene SL é formado de regiões transcritas e regiões não transcritas.

A região transcrita inclui um exon de 39nt que codifica o medRNA, seguido de um íntron de 50 a 110 pares de base (pb).

A sequência do exon é altamente conservada na família dos Trypanosomatidae com alguma variabilidade entre os gêneros, enquanto a região não transcrita mostra um alto grau de variabilidade entre os organismos (Nunes et al., 1995).

As sequências do mini exon ou “spliced leader”, foram determinadas por dois grupos diferentes Nunes et al., 1995 compararam a sequência de 05 isolados

de *Phytomonas* com as seqüências disponíveis de outros tripanossomatídeos e mostraram que a seqüência do íntron nas posições entre +40 e +58pb eram idênticas entre os isolados, mas diferiam das seqüências homólogas de outros tripanossomatídeos. Sturn et al., (1995), obtiveram resultados similares na comparação da seqüência do íntron SL de 03 isolados de *Phytomonas* de frutas, látex e floema.

Como observado em outros gêneros de tripanossomatídeos, os genes SL de *Phytomonas* exibem um alto grau ($\geq 94\%$) de seqüências homólogas em regiões transcritas. Regiões não transcritas demonstram ser bem menos conservadas (Nunes et al., 1995). Todos os isolados de *Phytomonas* são idênticos nos seus exons de 39nt e nos primeiros 19nt da seqüência do íntron.

As seqüências SL RNA dos isolados de *Phytomonas* podem ser usadas como identificadoras de gênero *Phytomonas*. Para explorar essa possibilidade Nunes et al., (1995) produziram a sonda SL3', complementar a região entre +40 e +58pb dos SL RNAs de todos os *Phytomonas* (fig 6). Essa seqüência é idêntica entre os isolados dos *Phytomonas* examinados, porém distintas de todos os outros gêneros de tripanossomatídeos.

Teixeira et al. (1996), testaram a hipótese da utilização do oligonucleotídeo SL3' como sonda gênero específica para 84 isolados de tripanossomatídeos. Os resultados da hibridação com a sonda SL3' coincidiram com os resultados de outros marcadores usados para identificar *Phytomonas*: a hibridação só foi positiva onde os flagelados eram IFA (imunofluorescência) positivo com os AcMs (anticorpos monoclonais) específicos para *Phytomonas*. Além disso, a hibridação positiva com o SL3' era sempre acompanhada da ausência de hibridação com o oligonucleotídeo SSU3, o que sugere ausência do sítio PvuII típica do gênero *Phytomonas* (Camargo et al., 1992).

Usando como iniciadores os oligonucleotídeos complementares às regiões flanqueadoras da seqüência SL3', Serrano et al., (1999), adaptaram a técnica do PCR para a identificação de *Phytomonas* em plantas e insetos

fitófagos. Das seqüências alvo selecionadas como iniciadoras, uma, denominada PSL1, é muito conservada em todos os tripanossomatídeos, enquanto a outra, PSL2, é conservada em *Phytomonas*, incluindo os isolados de látex, frutas e floema, mas distinta de todas as seqüências de SL RNA de outros gêneros de tripanossomatídeos (Serrano et al., 1999a) (fig. 6).

As utilizações de condições de estringência diferentes no PCR permitiram seja a amplificação do DNA de todos os tripanossomatídeos (Try-SLPCR) seja a amplificação específica do DNA de *Phytomonas* (Phy-SLPCR), (Serrano et al., 1999a).

Com o objetivo de desenvolver um método de PCR para detecção de *Phytomonas* diretamente em plantas e possíveis insetos vetores, sem necessidade de cultura em grande escala, foram testados pelo método Phy-SLPCR preparações de diferentes tecidos de plantas bem como de glândulas salivares e tubo digestivo de insetos fitófagos (Serrano et al., 1999a).

Os resultados obtidos mostraram que esse método é totalmente apropriado para detecção de *Phytomonas* em diferentes espécies e famílias de insetos e plantas (Serrano et al., 1999a).

Contudo, tecidos de plantas e insetos recém coletados ou recém congelados não são os métodos usados rotineiramente para armazenar tripanossomatídeos. A maioria das coleções de tripanossomatídeos são guardadas como esfregaços fixados em lâminas de vidro. Assim para ampliar a utilização e aplicabilidade do método SLPCR, ele foi adaptado para trabalhar experimentalmente com o DNA de tripanossomatídeos recuperado de esfregaços fixados, corados, e armazenados até por vários anos (Teixeira et al., 2000).

Tripanossomatídeos, particularmente os do gênero *Phytomonas*, podem infectar frutos, seiva, látex de plantas de várias famílias vegetais e têm sido detectados em plantas e insetos fitófagos (seus possíveis transmissores) de várias regiões do velho e novo continente.

Apesar da enorme variedade da flora e da fauna entomológica da Amazônia Brasileira, apenas 2 relatos existem sobre a ocorrência de tripanossomatídeos em plantas ou hemípteros fitófagos dessa região (Aragão, 1927, Sbravate et al., 1989).

A detecção de tripanossomatídeos em plantas e insetos pode ser feita por microscopia simples. Todavia a distinção entre *Phytomonas* e outros gêneros de tripanossomatídeos se constituía em um grande problema até recentemente, necessitando de isolamento e cultivo do flagelado e sua identificação por diferentes técnicas bioquímicas, sorológicas e moleculares. O processo diagnóstico era assim extremamente laborioso e problemático, o que praticamente impossibilitava a detecção de *Phytomonas* em plantas e insetos da Amazônia.

Com a adaptação do PCR para a detecção de *Phytomonas* em material fixado em lâminas, levantamentos da prevalência de tripanossomatídeos em espécimens amazônicos tornou-se exeqüível, permitindo a obtenção dos dados constantes do presente trabalho.

1.6. Objetivos

Com o objetivo de estudar a prevalência de tripanossomatídeos e, particularmente de *Phytomonas spp.* em hemípteros fitófagos e plantas da região amazônica, nos propusemos inicialmente a:

1 – Coletar exemplares de insetos em diversos *habitats* da região de Porto Velho – Rondônia. Identificar ou providenciar a identificação dos exemplares coletados.

2 - Preparar esfregaços em lâmina do conteúdo do seu tubo digestivo terminal, corar e examinar por microscopia óptica esses esfregaços para determinação da presença de tripanossomatídeos;

3 – Documentar e registrar a morfologia e morfometria desses flagelados;

4 – Extrair e amplificar por PCR o DNA das lâminas positivas para tripanossomatídeos;

5 – Hibridar os amplicons com a sonda SL3' para o diagnóstico do gênero *Phytomonas*, entre os tripanossomatídeos encontrados.

2. Materiais e Métodos

2.1. Coleta

Para a realização deste trabalho foram coletadas várias espécies de Insetos Hemípteros fitófagos no estado de Rondônia, estes organismos foram utilizados como fonte de tripanossomatídeos.

O estado de Rondônia limita-se ao norte com o estado do Amazonas a leste com o estado do Mato Grosso, ao sul com a República da Bolívia, e a oeste com o estado do Acre.

O clima predominante em Rondônia é o tropical úmido, com índice pluviométrico superior a 2000 mm anuais, e com pequenas variações de temperatura média anuais em torno de 26° C, embora possa ocorrer o fenômeno da friagem (de maio a outubro), resultante das invasões da massa polar, provocando quedas na temperatura que chega a baixar para 10° C. A estação chuvosa (o inverno regional) é longa e compreendida entre os meses de setembro a maio/junho. Registra-se, entretanto, um período de estiagem (junho a agosto) que, embora curto, reproduz o tipo de clima do Planalto Central (IBGE, 1995, 1996).

Hemípteros adultos foram coletados, no município de Porto Velho: nos km 11, 14, 16, 18, 36 da Br 364; na Universidade Federal de Rondônia; na praia do Tamanduá, na Cachoeira de Santo Antônio, na Cachoeira de Teotônio no Rio Madeira; na praia das Antas no rio Tapagem; no Parque Ecológico, no rio Maicí. No município de Triunfo, no município de Itapuã D'Oeste, e no município de Rolim de Moura.

Durante os meses de invernada (inverno regional) os insetos eram coletados após as chuvas e nos tempos de seca os insetos eram capturados pela manhã logo ao nascer do sol. Cada excursão contava com dois capturadores que trabalhavam por um período de duas horas de cada vez. Os hemípteros fitófagos eram capturados pelas patas com o auxílio de pinças ou com redes de filó e

conservados em frascos de vidro ou plástico, cobertos com gaze presa por elástico. Nos frascos eram adicionadas folhas, flores ou frutos da planta de onde os hemípteros foram coletados e algodão umedecido com água para garantir sua sobrevivência. Nos frascos eram anotados o local da coleta e a data e, quando possível, a identificação da planta de origem.

As coletas foram feitas durante o período de março de 1988 a janeiro de 1999.

Foram coletados 244 hemípteros fitófagos. Dois exemplares de cada tipo foram sacrificados em clorofórmio e montados de acordo com as regras entomológicas. Uma parte da coleção de hemípteros foi identificada com o auxílio do Prof^o Dr. Roberto Antonio Zucchi do Departamento de Entomologia da ESALQ (Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz –USP). Os exemplares das famílias *Pentatomidae* e *Coreidae* foram enviados para a Universidade Federal do Rio Grande do Sul e identificados pela Prof^a Dra Jocélia Grazia e Prof.^o Dr. José Antonio Marin Fernandes respectivamente, os exemplares das famílias *Miridae*, *Rhopalidae* e *Lygaeidae* foram identificados pelo Prof^o Dr. Paulo Sergio Fiuza Ferreira da Universidade Federal de Viçosa.

A coleção de hemípteros foi numerada segundo um código de identificação que considerava o número do inseto por ordem de coleta:

01/01 =

01 - número de identificação do inseto;

01 - número de coleta.

2.2. Isolamento, cultura e manutenção.

Os hemípteros coletados eram anestesiados por clorofórmio, lavados com etanol 70% e dissecados para separar as glândulas salivares e intestinos para exame quanto à presença de tripanossomatídeos. Os insetos eram colocados em superfície de vidro para a remoção das asas e patas com tesoura. Em seguida, com o auxílio de um estilete de ponta chata introduzido no pró-tórax separávamos

por simples tração a porção cefálica liberando as glândulas salivares. Estas eram transferidas para uma lâmina em PBS 0,01M estéril e levemente comprimidas entre lâmina e lamínula para, observação em microscópio de contraste de fase.

A seguir os conectivos do abdome eram cortados, o pronoto levantado e a musculatura torácica dorsal cortada para retirar o trato digestivo que era similarmente comprimido entre lâmina e lamínula para observação.

Todo material positivo para tripanossomatídeos era distribuído em 4 lâminas e fixado com metanol e também inoculado em tubos contendo meio de cultura bifásico. Este era composto de uma fase líquida de meio LIT (Camargo, 1964) acrescido de ampicilina e gentamicina numa concentração final de 4000 µg/ml e uma base sólida de Blood Agar Base (Difco) 4%. Os tubos eram mantidos em estantes inclinadas a 28°C durante 2 dias após o que eram examinados à procura de flagelados. Culturas negativas eram mantidas em cultivo por ainda 7 dias.

Para eliminação de fungos, culturas contendo parasitas eram inoculadas em tubos de vidro em **U**. Periodicamente recolhíamos amostras da extremidade do tubo oposta à da inoculação para observação microscópica. Quando apenas flagelados estavam presentes alíquotas eram inoculadas em LIT e mantidas a 28°C.

Culturas limpas de leveduras e fungos eram criopreservadas em nitrogênio líquido (Campaner, 1991).

Composição do meio LIT
Liver Infusion Tryptose serum medium

Componentes	g/l
Infuso de fígado (Difco)	5
Tryptose	5
NaCl	4
KCl	0,4
Na ₂ PO ₄	8
Glicose	2
*Hemina	0,01
**Soro bovino	100ml
pH 7,2 ajustado com HCl 2 N	
*Previamente dissolvido em NaOH 0,1 N	
** inativado a 68°C por 1 hora	
O meio era esterilizado por filtração em um filtro Millipore 02µm	

2.3. Morfologia e Morfometria

As lâminas positivas de hemípteros fitófagos, coradas com Giemsa, foram examinadas por microscopia óptica utilizando o programa de computação Metamorph Imaging System versão 3.0 para Microsoft Windows 95TM e listados/calculados no programa Microsoft Excel 97. De cada lâmina eram fotografados 30 flagelados em média, que eram medidos quanto ao:

1. Comprimento do corpo;
2. Comprimento do flagelo livre;
3. Distância do cinetoplasto à extremidade anterior do corpo.

Com estas medidas foram determinados a média aritmética (M), para estimar a média populacional da amostra, e o desvio padrão (dp), para avaliar a medida da variabilidade amostral.

2.4. Extração do DNA de tripanossomatídeos

Os esfregaços fixados com metanol foram recobertos com 35µl de SDS 0,002%, raspados com a ponteira de uma micropipeta e então transferidos para um tubo Eppendorf. Esta suspensão foi incubada para digestão com Proteinase K (100mg/ ml) a 55°C por 01 hora e inativado por 10' a 95°C. Os tubos Eppendorf foram centrifugados por 4 minutos e conservados a -20°C. Em seguida 3µl do sobrenadante foi utilizados para amplificação por PCR conforme descrito por Serrano et al., (1999b).

2.5. PCR

A amplificação por PCR foi feita em 50µl da reação de mistura: 3µl do DNA extraído conforme protocolo para extração de DNA descrito em 2.4; 0,2 mM de cada dNTP, 2,0µM de cada iniciador, PSL1 e PSL2, Buffer para PCR 10X contendo 1,5mM MgCl₂ e 2,5 unidades de Taq DNA polimerase (Gibco-BRL). Para amplificações de todos os tripanossomatídeos, Try-SLPCR, as reações foram submetidas a 30 ciclos de: 1min a 94°C, 1 min a 48°C e 1 min a 72°C com uma extensão final de 10 min a 72°C. Para cada conjunto de reações um tubo contendo DNA de *P. serpens* (TCC-USP) e um tubo sem DNA foram utilizados como controle positivo e branco, respectivamente (Serrano et al., 1999a).

Oligonucleotídeos gênero específicos foram desenhados por comparação das seqüências do SL RNA de *P. serpens*; *Jma*, isolado de *Jatropha macrantha* (TCC – USP # 060); *Aca*, isolado de *Allamanda cathartica* (TCC – USP # 083); *Cbe*, de *Citrus bergamia* (TCC – USP #233); *Ech*, isolado de *Euphorbia characias* (TCC – USP # 066) (Nunes et al., 1995); EM1 e Hart1 (Sturn et al, 1995) de *Palmae* e alinhadas com vários outros gêneros de tripanossomatídeos obtidos no GenBank. A localização e as seqüências dos oligonucleotídeos que foram empregadas como iniciadores para PCR (PSL1 e PSL2) ou como sondas na hibridação por “Southern blot” (SL3'), estão desenhadas na fig. 7.

Fig. 7 – O oligonucleotídeo PSL1 é complementar à sequência conservada em todos os gêneros de tripanossomatídeos. O oligonucleotídeo PSL2 é complementar à sequência encontrada exclusivamente em *Phytomonas*. A sonda SL3' é complementar à sequência +40 +58 pb do intron e específica para *Phytomonas* ssp.

Sequência dos iniciadores:

PSL1 – 5' GACTTTCAACTAACGCTAT 3'

PSL2 – 5' GAAGGTCCCCAGTCTAAAA 3'

Sequência da sonda:

SL3' – 5' TTCTGGAAGTTTCTCATA 3'.

Quando ocorreu inibição da reação do PCR, se procedeu a um retratamento da preparação do DNA já extraído da lâmina com Proteinase K ou se tentou inibição com 2% de BLOTTO (10% de leite desnatado) na reação de PCR.

2.6. Transferência de DNA (Southern blotting)

O produto de DNA amplificado, cerca de 6µl foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2% e colorido com brometo de etídio.

A 15µl do produto de PCR, adicionaram-se 85µl de TE, 100µl de solução desnaturante por 30', 200µl de solução neutralizante por 30' e 200µl de SSC 20X. A mistura foi então transferida para uma membrana (Hybond Amersham Pharmacia), tamponada com SSC 2X, em um aparelho Bio-Dot da Bio Rad. Após a transferência, os fragmentos foram fixados à membrana por exposição à luz UV no aparelho W-crosslinker (12000µj/cm²).

Solução desnaturante			Solução neutralizante		
0,5M	NaCl	87,6g	1,5M	NaCl	87,6g
0,5M	NaOH	20,0g	0,5M	Tris-HCL	60,5g
H ₂ O destilada para 1l			pH 7,5		
			H ₂ O destilada para 1l		
Autoclavar			Autoclavar		

2.7. Fosforilação do oligonucleotídeo

Para fosforilação do oligonucleotídeo fervemos 3µl do oligo SL3' (240ng/µl); e acrescentamos 12,0µl de H₂O, 5,0µl de Buffer 5x, 5,0µl de [γ ³²P] dATP (Amersham, 3.000 Ci/mmol) e 1µl de T4 Kinase Polynucleotidyl, deixar na estufa 37⁰ C por 1 ou 2 horas, de acordo com Maniatis, (1982).

2.8. Reações de hibridização, lavagem e processamento das membranas.

Nas reações de pré-hibridação dos “dot blots” utilizamos: SSC 5X, Caseína 2%, N-Lauril Sarcosine 0,01% e SDS 0,002%. A membrana era colocada numa cuba de plástico junto com a solução de pré-hibridação a 37⁰C por 1 hora com agitação.

Para a hibridação, o oligonucleotídeo marcado (SL3') em solução de hibridação era incubado com a membrana por 16 horas, 37⁰C sob agitação. Em seguida a membrana era lavada com SSC 6X por duas vezes por 15' à temperatura ambiente, depois com SSC 6X por duas vezes 15' a 50⁰C, sob agitação. Secadas com um papel de filtro após as lavagens, as membranas eram expostas a filmes de Raios-X (Kodak-T-Mat) por períodos de 72 a 96 horas a -80⁰ C com tela amplificadora.

Os filmes eram processados de acordo com as instruções do fabricante.

Para reutilização dos “dot blots” em novas reações, as sondas de reações precedentes eram removidas com NaOH 0.4N por 30’ sob agitação a 43⁰C e em seguida lavadas duas ou três vezes com SSC 2X por 15’ sob agitação a temperatura ambiente.

3. Resultados

3.1 Levantamento e Identificação das Espécies de Insetos Hemípteros Fitófagos.

Foram realizadas 37 coletas em várias localidades no estado de Rondônia entre maio de 1998 e janeiro de 1999, abrangendo as duas estações climáticas: o inverno (estação das águas, setembro a maio) e o verão (estação da seca de junho a agosto), Tabela 1.

Tabela 1 - Hemípteros coletados em Rondônia, durante o período de 98/99

Mês	mai	jun	jul	ago	set	out	Nov	Dez	jan	Total
Coletas	04	04	03	05	04	07	02	06	02	37
Total ins	35	42	16	28	30	23	16	25	28	244

Distribuição de hemípteros fitófagos, coletados no estado de Rondônia, durante o ano.

Foram enviados para identificação 17 hemípteros cujas duplicatas estão conservadas no CIBEBI – Centro Interdepartamental de Biologia e Biotecnologia da Universidade Federal do Estado de Rondônia.

3.2 Distribuição dos hemípteros fitófagos infectados por tripanossomatídeos nas duas estações climáticas regionais

O número de hemípteros coletados nas duas estações climáticas de Rondônia está compilado, por família, na Tabela 2.

Tabela 2 - Hemípteros coletados em Rondônia nas duas estações climáticas.

		Família de Hemíptero							
Estação do ano	Órgão	Co	Pe	Ly	La	Mi	Rh	Re	Total
Inverno	E	105	12	30	01	02	0	03	153
	Gs	04	-	-	-	-	-	-	04
	Td	33	-	06	01	-	-	01	41
	Gs/Td	24	-	-	-	-	-	-	24
	%+	57	-	20	100	-	-	33	44
Verão	E	60	01	09	10	09	02	0	91
	Gs	06	-	-	01	-	-	-	06
	Td	21	01	02	06	-	-	-	30
	Gs/Td	03	-	-	-	-	-	-	03
	%+	50	100	22	70	-	-	-	44
Total	E	125	13	39	11	11	02	03	244
	Gs	10	-	-	01	-	-	-	11
	Td	54	01	08	07	-	-	01	71
	Gs/Td	25	-	-	-	-	-	-	25
	%+	54	07	20	72	-	-	33	44

E, examinados; Gs, glândula salivar; Td, trato digestivo; Gs/Td, glândula salivar e trato digestivo; %+, porcentagem de positivos. Co, Coreidae; Pe, Pentatomidae; Ly, Lygaeidae; La, Largidae; Rh, Rhopalidae; Mi, Miridae; Re, Reduviidae.

No inverno (9 meses) entre os 153 hemípteros adultos coletados, 68 (44%) estavam positivos. No verão (3 meses) entre os 91 hemípteros adultos coletados 40 (44%) estavam positivos. As porcentagens de insetos infectados nas duas estações climáticas foram, portanto, bastante próximas, o que parece sugerir que as infecções estejam presentes o ano todo, o que contrasta com regiões temperadas e frias onde as taxas de infecção são menores no inverno.

Entre os 108 hemípteros parasitados por tripanossomatídeos inferiores, 83,4% eram da família Coreidae, 7,4% da família Largidae, 7,4% da família Lygaeidae, 0,9% da família Pentatomidae, 0,9% da família Reduvidae, 0% da família Rhopalidae e 0% da família Miridae.

A tabela 3 registra as espécies de hemípteros encontradas e, entre estas, as 13 espécies infectadas por tripanossomatídeos conforme aferido por microscopia dos órgãos indicados.

Tabela 3 - Prevalência de tripanossomatídeos, segundo gênero e espécie, nas diferentes famílias de hemípteros coletados em diversas regiões no estado de Rondônia.

Família	Gênero/Espécie	E	Gs	Td	Gs/Td	%
Coreidae	<i>Hypselonotus fulvus</i>	74	4	24	6	46
	* <i>Veneza stigma</i>	16		6	9	93
	<i>Veneza sp</i>	24	2	11	2	66
	* <i>Crinocerus sanctus</i>	33	4	9	2	48
	<i>Sphictyrtus cryseis</i>	1		1		100
	* <i>Lucullia flavovittata stal</i>	2			2	100
	<i>Phthia picta</i>	8		2	1	37
	* <i>Phthia lunata</i>	5		1	3	80
	* <i>Acanthocephala latipes</i>	2		1		50
	Total	165	10	55	25	47
Largidae	* <i>Largus humilis</i>	10	1	7		80
Miridae	NI	11				0
Rhopalidae	<i>Niesthrea sp</i>	2				0
Pentatomidae	<i>Edessa rufomarginata</i>	6				0
	<i>Euchistus sp</i>	7				0
Lygaeidae	NI	39		8		20
Reduvidae	<i>Arilus carinatus</i>	1		1		100
	<i>Aprumerus sp</i>	2		1		50

E, examinados; *Gs*, glândulas salivares; *Td*, trato digestivo; *Gs/Td*, glândulas salivares e trato digestivo, % percentagem de positivos, * espécies descritas pela primeira vez com infecção.

A maioria dos insetos (67%) apresentou flagelados somente no trato digestivo, 8% somente nas glândulas salivares e 25% no trato digestivo e glândulas salivares.

Entre os hemípteros fitófagos examinados 5 espécies (assinaladas com asterisco na Tabela 3) estão sendo descritas pela primeira vez como hospedeiras de flagelados.

3.3 Tripanossomatídeos isolados de hemípteros

Das 108 amostras positivas para tripanossomatídeos inoculadas em meio de cultura LIT, obtivemos apenas 05 isolados originários do trato digestivo (tabela 4).

Tabela 4 - Cultura de tripanossomatídeos recuperadas de hemípteros de acordo com local de coleta.

Local	Cultura	Pl. de origem	Hemíptero	Família
R de Moura	23/66	Quiabo	<i>H. fulvus</i>	<i>Coreidae</i>
Cach.St.Antonio	7/176	Floresta	<i>L. humilis</i>	Largidae
V.Eletronorte	264/266	Araçá	<i>Veneza sp</i>	<i>Coreidae</i>
V.Eletronorte	264/302	Araçá	<i>Veneza sp</i>	<i>Coreidae</i>
V.Eletronorte	269/269	Araçá	<i>Veneza sp</i>	<i>Coreidae</i>

A tabela 4 registra a plantas onde foram coletadas as espécies de hemípteros que geraram culturas positivas.

Estas culturas se encontram armazenadas em nitrogênio líquido no CEPEN - Centro de Pesquisas em Medicina Tropical de Rondônia, para posteriores testes.

3.4 Morfologia e morfometria

Dos insetos positivos foram feitos esfregaços dos órgãos infectados que foram corados com Giemsa para microscopia e análise morfométrica. 60 lâminas escolhidas ao acaso foram examinadas e fotografadas. Segundo suas características morfológicas, os flagelados foram reunidos em 4 grupos:

3.4.1 Grupo 1 – (clique aqui para ver figuras do grupo 1)

Constituído por promastigotas sem torção ao longo do corpo celular. A tabela 5 registra os flagelados desse grupo, as espécies hospedeiras de origem e o código de identificação da imagem.

Os resultados das medidas estão relacionados na tabela 6. As medidas extremas foram: para o comprimento do corpo, mínimo de 8,9 μm , e máximo de 24,1 μm ; para o comprimento do flagelo livre, 4,8 μm de mínimo e 34,9 μm de máximo.

Tabela 5 - Tripanossomatídeos do Grupo 1.

Hemíptero	Código
<i>Crinocerus sanctus</i>	282td
<i>Crinocerus sanctus</i>	132td
<i>Crinocerus sanctus</i>	120td
<i>Hypselonltus fulvus</i>	242gs
<i>Phthia picta</i>	31gs
<i>Hypselonltus fulvus</i>	83td
<i>Veneza stigma</i>	25td
<i>Veneza sp</i>	287td
<i>Veneza sp</i>	294td
<i>Hypselonltus fulvus</i>	239td
<i>Hypselonltus fulvus</i>	132td
<i>Hypselonltus fulvus</i>	148td
<i>Hypselonltus fulvus</i>	180td
<i>Hypselonltus fulvus</i>	243td
<i>Crinocerus sanctus</i>	100td
<i>Veneza stigma</i>	280td
<i>Veneza sp</i>	281td
<i>Hypselonltus fulvus</i>	86td
<i>Hypselonltus fulvus</i>	231td

180td *Hypselonltus fulvus*

282td *Crinocerus sanctus*

Tabela 6 – Medidas em μm dos tripanossomatídeos do Grupo1.

Isolado	c.c.	c.f.	c.a.
282td	12, $\pm 3,3^b$ (5,6-19,2) ^c	14,4 $\pm 4,1$ (6,9-23,1)	3,3 $\pm 0,7$ (2,1-4,7)
132td	13,3 $\pm 2,3$ (7,9-17,8)	11,5 $\pm 4,0$ (2,3-18,8)	2,4 $\pm 0,6$ (1,0-3,9)
120td	11,1 $\pm 2,4$ (5,4-16,1)	9,9 $\pm 3,9$ (3,4-19,9)	2,8 $\pm 0,6$ (1,6-3,9)
242gs	8,9 $\pm 2,7$ (4,4-14,4)	27,4 $\pm 6,6$ (11,1-39,6)	4,5 $\pm 0,9$ (2,9-5,9)
31gs	19,3 $\pm 4,1$ (12,4-24,9)	25,3 $\pm 8,5$ (5,7-36,5)	5,0 $\pm 1,3$ (3,5-9,0)
83td	14,0 $\pm 3,8$ (10,1-25,3)	13,4 $\pm 3,1$ (5,2-17,0)	3,4 $\pm 0,9$ (1,9-5,5)
25td	12,4 $\pm 2,6$ (12,5-14,0)	12,3 $\pm 3,4$ (9,9-14,7)	3,7 $\pm 0,6$ (2,9-3,6)
287td	20,2 $\pm 4,0$ (12,2-29,6)	29,5 $\pm 6,9$ (14,6-44,6)	6,5 $\pm 2,0$ (2,5-11,6)
294td	24,1 $\pm 9,2$ (13,9-43,1)	8,7 $\pm 3,0$ (5,0-13,1)	5,6 $\pm 2,0$ (3,0-9,5)
239gs	12,8 $\pm 2,6$ (6,9-21,0)	12,6 $\pm 4,0$ (4,0-21,8)	3,3 $\pm 0,6$ (2,0-5,2)
180td	12,4 $\pm 1,9$ (7,6-15,6)	16,1 $\pm 3,7$ (7,7-21,4)	2,9 $\pm 0,4$ (1,5-3,9)
243td	25,6 $\pm 5,3$ (13,4-37,9)	26,8 $\pm 1,2$ (6,0-36,0)	5,2 $\pm 1,8$ (2,2-9,3)
100td	9,5 $\pm 1,7$ (7,8-14,2)	9,2 $\pm 2,8$ (5,8-16,3)	3,1 $\pm 0,8$ (2,2-5,3)
280td	20,3 $\pm 4,0$ (15,0-25,7)	22,3 $\pm 4,2$ (14,5-28,4)	3,9 $\pm 0,7$ (2,9-5,2)
281td	20,6 $\pm 3,9$ (13,1-31,4)	34,9 $\pm 6,6$ (19,0-45,1)	6,6 $\pm 2,0$ (2,4-10,6)
86td	22,3 $\pm 3,7$ (15,7-30,2)	19,8 $\pm 6,5$ (11,1-37,9)	5,5 $\pm 1,3$ (3,0-8,2)
231td	11,8 $\pm 1,8$ (6,5-15,9)	14,1 $\pm 2,9$ (8,3-20,6)	2,6 $\pm 0,4$ (1,9-3,8)

a, média aritmética; b, desvio padrão; c, valores mínimos e máximos; c.c, comprimento do corpo; c.f., comprimento do flagelo; c.a., distância do cinetoplasto à extremidade anterior.

3.4.2 Grupo 2 (clique aqui para ver figuras do grupo 2)

No Grupo 2 foram agrupados promastigotas com torção ao longo do corpo celular.

A tabela 7 registra os flagelados deste grupo, as espécies hospedeiras, órgão de origem e código de identificação. Os resultados das medidas estão registrados na tabela 8. As medidas extremas para o comprimento do corpo foram 11,8 μm e 73,6 μm e para o comprimento do flagelo livre 2,2 μm e 34,8 μm .

Tabela 7 - Tripanossomatídeos do grupo 2.

Hemíptero	Código/Órgão
<i>Hypselonoltus fulvus</i>	24gs
<i>Veneza sp</i>	294td
<i>Veneza sp</i>	302td
<i>Hypselonoltus fulvus</i>	236gs
<i>Hypselonoltus fulvus</i>	236td
<i>Veneza stigma</i>	246td
<i>Veneza stigma</i>	238td
<i>Veneza stigma</i>	281td
<i>Crinicerus sanctus</i>	101td
NI	212td
NI	213td
NI	216td
<i>Hypselonoltus fulvus</i>	234td
<i>Hypselonoltus fulvus</i>	190gs
<i>Hypselonoltus fulvus</i>	190td
Ni	206td
<i>Veneza sp</i>	283td
<i>Veneza stigma</i>	166td
<i>Veneza stigma</i>	165td
<i>Veneza stigma</i>	276td
<i>Veneza sp</i>	265td
<i>Veneza sp</i>	269td
<i>Hypselonoltus fulvus</i>	91gs
<i>Hypselonoltus fulvus</i>	244td
<i>Hypselonoltus fulvus</i>	87td
<i>Hypselonoltus fulvus</i>	232td
<i>Venezasp</i>	300td
<i>Veneza sp</i>	287td
<i>Hypselonoltus fulvus</i>	148td
<i>Hypselonoltus fulvus</i>	238td
<i>Veneza sp</i>	267gs

165td *Veneza stigma*

190gs *Hypselonoltus fulvus*

Tabela 8 - Medidas em μm dos tripanossomatídeos do Grupo 2.

isolado	c.c.	c.f.	c.a.
24gs	13,0 ^a $\pm$ 2,0 ^b (9,6-17,7) ^c	13,9 $\pm$ 3,6 (7,2-22,6)	2,6 $\pm$ 0,6 (3,9-16,1)
294td	24,1 $\pm$ 9,2 (14-43,2)	8,7 $\pm$ 3,0 (5,0-13,2)	5,6 $\pm$ 2,0 (3,1-9,6)
302td	19,9 $\pm$ 3,1 (13,1-28,8)	27,0 $\pm$ 6,1 (9,7-34,4)	4,6 $\pm$ 1,7 (2,3-9,7)
236gs	15,1 $\pm$ 4,1 (9,2-27,3)	31,7 $\pm$ 8,6 (1,7-5,4)	9,0 $\pm$ 2,6 (3,3-15,2)
236td	19,8 $\pm$ 6,3 (9,3-37,7)	17,7 $\pm$ 3,9 (8,3-26,8)	3,9 $\pm$ 1,0 (2,3-6,8)
246td	24,6 $\pm$ 7,1 (12,0-39,8)	24,3 $\pm$ 9,8 (7,6-42,3)	3,7 $\pm$ 1,2 (2,1-7,6)
238td	18,6 $\pm$ 4,9 (7,9-31,1)	15,1 $\pm$ 4,7 (8,4-28,5)	4,2 $\pm$ 1,1 (2,1-6,7)
281gs	23,8 $\pm$ 4,5 (16,6-39,2)	30,7 $\pm$ 10,3 (7,4-45,9)	6,3 $\pm$ 2,2 (3,7-10,7)
101gs	23,7 $\pm$ 5,2 (12,6-35,2)		
212td	12,7 $\pm$ 2,5 (6,7-16,6)	14,8 $\pm$ 4,1 (7,1-22,5)	3,1 $\pm$ 10,6 (1,6-4,6)
213td	13,2 $\pm$ 2,7 (8,9-20,7)	11,8 $\pm$ 3,3 (7,1-20,2)	3,6 $\pm$ 0,6 (2,5-5,0)
216td	20,3 $\pm$ 3,6 (12,8-29,3)	17,0 $\pm$ 4,8 (8,7-27,1)	3,9 $\pm$ 1,9 (2,2-6,4)
234td	16,0 $\pm$ 3,7 (10,8-31,3)	10,5 $\pm$ 4,1 (4,4-20,7)	3,2 $\pm$ 0,8 (1,6-5,5)
190gs	37,0 $\pm$ 12,8 (17,6-73,6)	4,3 $\pm$ 0,9 (2,4-6,4)	8,4 $\pm$ 2,7 (3,5-14,0)
190td	35,0 $\pm$ 12,8 (17,6-73,6)	8,4 $\pm$ 2,7 (3,5-14,0)	4,3 $\pm$ 0,9 (2,9-6,4)
206td	11,8 $\pm$ 2,8 (6,6-21,7)	6,9 $\pm$ 4,1 (3,8-14,9)	2,9 $\pm$ 1,1 (1,3-6,6)
283td	20,2 $\pm$ 5,4 (13,3-37,3)	18,9 $\pm$ 6,0 (11,2-32,9)	3,7 $\pm$ 0,8 (2,3-5,6)
166td	20,2 $\pm$ 4,6 (12,8-27,6)	13,8 $\pm$ 7,9 (8,0-25,4)	3,9 $\pm$ 0,9 (2,4-5,5)
165td	20,5 $\pm$ 4,0 (8,4-30,2)	20,4 $\pm$ 5,9 (7,9-32,1)	4,5 $\pm$ 1,6 (5,5-6,5)
276td	27,1 $\pm$ 11,4 (13,1-52,0)	21,3 $\pm$ 5,3 (13,1-36,8)	4,6 $\pm$ 1,2 (2,8-7,5)
265td	24,5 $\pm$ 5,4 (16,3-34,5)	34,8 $\pm$ 7,5 (19,6-48,9)	4,6 $\pm$ 1,1 (2,7-6,9)
269td	23,1 $\pm$ 5,2 (12,2-33,9)	31,3 $\pm$ 7,7 (9,3-45,8)	3,8 $\pm$ 0,7 (2,5-5,1)
91gs	23,9 $\pm$ 5,6 (13,6-32,3)	7,8 $\pm$ 1,9 (3,8-10,9)	3,2 $\pm$ 0,8 (1,9-5,3)
244td	25,3 $\pm$ 5,6 (13,7-35,8)	2,2 $\pm$ 2,1 (3,8-10,9)	3,3 $\pm$ 0,8 (2,0-5,4)
87td	19,1 $\pm$ 3,6 (11,8-25,4)	15,5 $\pm$ 3,5 (10,8-23,3)	4,3 $\pm$ 1,7 (2,0-8,9)
232td	19,4 $\pm$ 4,4 (9,6-30,9)	13,8 $\pm$ 3,2 (6,2-20,4)	4,1 $\pm$ 0,8 (2,5-6,0)
300td	12,8 $\pm$ 2,6 (7,4-20,2)	10,6 $\pm$ 4,0 (4,3-21,7)	3,2 $\pm$ 0,8 (1,9-5,2)
287td	20,2 $\pm$ 4,0 (12,2-29,6)	29,5 $\pm$ 6,9 (14,6-44,6)	6,5 $\pm$ 2,0 (2,5-11,6)
148td	18,4 $\pm$ 3,0 (13,2-27,7)	22,6 $\pm$ 6,6 (13,6-34,5)	3,6 $\pm$ 0,9 (1,9-5,6)
267gs	22,4 $\pm$ 4,1 (16,4-30,9)	30,7 $\pm$ 6,9 (16,7-44,0)	6,6 $\pm$ 1,9 (4,1-11,1)

a, média aritmética; b, desvio padrão; c, valores mínimos e máximos; c.c, comprimento do corpo; c.f., comprimento do flagelo; c.a., distância do cinetoplasto à extremidade do corpo.

3.4.3 Grupo 3 (clique aqui para ver figuras do grupo 3)

O Grupo 3 apresenta tripanossomatídeos com acentuado polimorfismo. Formas promastigotas com flagelo livre e outras aflageladas de tamanho variado ocorrem em grande quantidade.

A tabela 9 relaciona os tripanossomatídeos deste grupo, as espécies hospedeiras, os órgãos de origem e o código de identidade.

Os resultados das medidas destes tripanossomatídeos estão relacionados na tabela 10. As medidas extremas foram de 11,0 μm e 5,6 μm para o flagelo quando presente e 28,3 μm e 13,6 μm para o comprimento do corpo

Tabela 9 - Tripanossomatídeos do grupo 3

Hemípteros	Código
<i>Crinocerus sanctus</i>	103
<i>Veneza sp</i>	287gs
<i>Hypselonoltus fulvus</i>	244gs
<i>Hypselonoltus fulvus</i>	245gs
<i>Veneza stigma</i>	247gs
<i>Crinocerus sanctus</i>	148gs
NI	204gs
NI	207gs
<i>Hypselonoltus fulvus</i>	243gs

245gs *Hypselonoltus fulvus*

287gs *Veneza sp*

Tabela 10 - Medidas em μm dos tripanossomatídeos do Grupo 3.

isolado	c.c.	c.f.	c.a.
103gs	$28,3^a \pm 7,3^b (17,4-42,1)^c$ $5,4 \pm 1,0 (3,9-7,0)$	$7,4 \pm 2,4 (3,7-2,3)$	$3,0 \pm 0,8 (1,9-5,9)$
287gs	$24,2 \pm 6,8 (13,0-40,1)$ $8,8 \pm 1,5 (7,1-9,8)$	$5,6 \pm 1,3 (3,4-7,7)$	$4,1 \pm 0,8 (3,0-6,0)$
244gs	$25,0 \pm 6,1 (10,5-35,2)$ $8,8 \pm 0,7 (7,1-9,9)$	$7,4 \pm 1,8 (3,3-11,7)$	$3,5 \pm 0,8 (2,1-5,4)$
245gs	$25,4 \pm 6,4 (12,9-37,2)$ $8,5 \pm 1,6 (6,2-13,0)$	$11,0 \pm 2,9 (7,1-15,8)$	$3,6 \pm 0,7 (2,1-5,2)$
247gs	$21,2 \pm 6,7 (10,7-33,8)$ $8,8 \pm 1,2 (6,7-10,9)$	$6,4 \pm 2,1 (5,0-11,9)$	$3,4 \pm 0,6 (2,4-4,6)$
148gs	$13,6 \pm 1,1 (11,5-15,6)$		
204gs	$4,7 \pm 0,9 (2,8-6,8)$		
207td	$17,0 \pm 5,0 (8,8-28,5)$ $7,2 \pm 1,4 (5,2-11,2)$	$7,2 \pm 2,3 (4,1-11,8)$	$3,1 \pm 1,1 (2,0-7,8)$ $2,2 \pm 0,3 (1,4-3,1)$
243gs	$22,9 \pm 5,4 (13,1-33,3)$ $8,4 \pm 1,3 (6,3-11,6)$	$7,5 \pm 1,4 (4,1-10,3)$	$3,3 \pm 0,8 (1,9-5,5)$

a, média aritmética; b, desvio padrão; c, valores mínimos e máximos; c.c., comprimento do corpo; c.f., comprimento do flagelo; c.a., distância do cinetoplasto à extremidade do corpo.

3.4.4 Grupo 4 (clique aqui para ver figuras do grupo 4)

O Grupo 4 apresenta tripanossomatídeos com formas promastigotas com flagelo livre ao lado de coanomastigotas. As imagens correspondem às formas coanomastigotas.

A tabela 11 registra tripanossomatídeos deste grupo, com as espécies e órgãos de origem e seu código de identidade. Os resultados das medidas destes tripanossomatídeos estão relacionados na tabela 12. As medidas extremas foram de 10,6µm e 7,5µm para o comprimento do corpo e 9,3 µm e 3,7µm no comprimento do flagelo livre.

Tabela 11 -Tripanossomatídeos do grupo 4.

Hemíptero	Código	Forma
<i>Veneza sp</i>	288td	P, C
<i>Lygaeidae, sp. não identificada</i>	176td	P, C
<i>Arilus carinatus</i>	296td	P, C
<i>Phthia lunata</i>	152td	P, C

288td *Veneza sp*

296td *Arilus carinatus*

Tabela 12 - Medidas em µm dos tripanossomatídeos do Grupo 4.

Isolado	c.c	c.f	c.a
288td	7,5 ^a ±1,4 ^b (4,5-12,0) ^c	3,7±1,7 (1,3-10,0)	2,4±0,6 (1,4-4,0)
176td	10,6±1,8 (6,8-13,9)	7,8±2,0 (3,0-11,0)	2,8±0,7 (1,7-4,5)
296td	8,0±1,9 (5,8-13,4)	5,6±1,7 (3,0-9,3)	3,4±0,8 (2,8-4,7)
152td	10,2±1,1 (8,6-12,2)	9,3±2,1 (5,7-12,4)	3,9±0,7 (2,6-4,4)

a, média aritmética; *b*, desvio padrão; *c*, valores mínimos e máximos; *c.c*, comprimento do corpo; *c.f.*, comprimento do flagelo; *c.a.*, distância do cinetoplasto à extremidade do corpo.

3.5 Marcadores moleculares

Foram analisadas 178 lâminas contendo esfregaços de tubo digestivo e glândulas salivares de hemípteros fitófagos e hemípteros predadores, fixados com metanol. Destas 178 lâminas 141 apresentavam parasitas à microscopia de luz. O DNA foi recuperado das lâminas e amplificados por Try – SLPCR. Foram encontradas 105 amostras positivas para tripanossomatídeos. Exemplos dos resultados estão na figura 8. O produto amplificado por Try – SLPCR foi hibridado com a sonda SL3'. Foram encontradas 42 amostras positivas, que representam o gênero *Phytomonas*.

Fig. 08 – Fotos representativas de amplificação e hibridação.

a) Try – SLPCR Amplificação de fragmentos do DNA de flagelados recuperados de laminas digeridos com Proteinase K e da amplificação/reporeamento a 48° C.

b) Hibridação do produto de amplificação por PCR das amostras processadas

c).MI – Investigação microscópica.

269td, isolado de *Veneza* sp; 270gs, isolado do hemíptero *Veneza stigma*; 274gs, isolado de *Hypselonoltus fulvus*; 239gs, isolado do hemíptero *Hypselonoltus fulvus*; 273gs, isolado do hemíptero *Phthia lunata*; 89gs, isolado do hemíptero *Largus humilis*; 282td, isolado do hemíptero *Crinocerus sanctus*, 281td, isolado de *Veneza* sp; 246gs, isolado de *Phthia lunata*; C+, para controle positivo foi utilizado o DNA genômico de amostra de *P. serpens* (TCC-USP # 060); φ, branco.

Tabela 13 - Detecção de *Phytomonas* de hemípteros infectados com tripanossomatídeos à partir do DNA amplificado de glândulas salivares e tubo digestivo por Try-SLPCR e hibridação com a sonda SL3'.

Cód.	Isol.	Família	Espécie	MI	F	Try-SL PCR	SL3'
A1	282td	Coreidae	<i>Crinocerus sanctus</i>	++	P	+	+
A2	281td	Coreidae	<i>Veneza sp</i>	+++	P	+	+
B2	287gs	Coreidae	<i>Veneza sp</i>	++	PA	+	+
D1	243td	Coreidae	<i>Hypselonoltus fulvus</i>	+	P	+	+
D3	244td	Coreidae	<i>Hypselonoltus fulvus</i>	+	P	+	+
D4	244gs	Coreidae	<i>Hypselonoltus fulvus</i>	+	P	+	+
E4	272gs	Coreidae	<i>Veneza stigma</i>	+	P	+	+
E5	272td	Coreidae	<i>Veneza stigma</i>	+	P	+	+
F2	274gs	Coreidae	<i>Phthia lunata</i>	+	P	+	+
F4	275gs	Coreidae	<i>Phthia lunata</i>	+	P	+	+
H1	280gs	Coreidae	<i>Veneza stigma</i>	+++	P	+	+
J2	236gs	Coreidae	<i>Hypselonoltus fulvus</i>	+++	P	+	+
J3	236td	Coreidae	<i>Hypselonoltus fulvus</i>	+++	P	+	+
J4	238gs	Coreidae	<i>Hypselonoltus fulvus</i>	+++	P	+	+
J5	238td	Coreidae	<i>Hypselonoltus fulvus</i>	+++	P	+	+
M3	189td	Coreidae	<i>Hypselonoltus fulvus</i>	+	P	+	+
N4	195td	NI	NI	+	P	+	+
N5	207gs	NI	NI	+	P	+	+
N6	207td	NI	NI	+	P	+	+
O2	213td	NI	NI	+	P	+	+
P6	168gs	Coreidae	<i>L flavovittata</i>	+	P	+	+
Q1	168td	Coreidae	<i>L flavovittata</i>	+	P	+	+
Q2	169tdg	Coreidae	<i>L flavovittata</i>	+	P	+	+
R2	294td	Coreidae	<i>Veneza sp</i>	+	P	+	+
R3	296td	Reduviidae	<i>Arilus carinatus</i>	+	PC	+	+
R4	297td	Coreidae	<i>Veneza stigma</i>	+	P	+	+
S2	300td	Coreidae	<i>Veneza sp</i>	+	P	+	+
S6	129td	Lygaeidae	NI	++	P	+	+
T1	129gs	Lygaeidae	NI	+++	P	+	+
T3	134td	Lygaeidae	NI	+++	P	+	+
U5	121gs	Coreidae	<i>Crinocerus sanctus</i>	+	P	+	+
Z1	83td	Coreidae	<i>Hypselonoltus fulvus</i>	+	P	+	+
Z2	82td	Coreidae	<i>Hypselonoltus fulvus</i>	+	P	+	+
25	265td	Coreidae	<i>Veneza sp</i>	+	P	+	+
26	267td	Coreidae	<i>Veneza sp</i>	+	P	+	+
31	268gs	Coreidae	<i>Veneza stigma</i>	+	P	+	+
34	245gs	Coreidae	<i>Hypselonoltus fulvus</i>	+	P	+	+
35	245td	Coreidae	<i>Hypselonoltus fulvus</i>	+	P	+	+

MI, investigação microscópica; F, morfologia; Try-SLPCR, PCR específico para tripanossomatídeos, SL3', sonda

Tabela 14 Detecção de *Phytomonas* usando como molde o DNA de glândulas salivares e tubo digestivo por amplificação por Try-SLPCR e hibridação com SL3' tripanossomatídeos extraídos de lâminas, negativos para MI.

Cód.	Isol.	Família	Espécie	MI	F	Try-SL PCR	SL3'
D2	243gs	Coreidae	<i>Hypselonoltus fulvus</i>	-	-	+	+
E1	270gs	Coreidae	<i>Veneza stigma</i>	-	-	+	+

MI, investigação microscópica; F, morfologia; Try-SLPCR, PCR específico para tripanossomatídeos, SL3', sonda

Tabela 15 Amplificação por Try-SLPCR e hibridação com SL3' do DNA de tripanossomatídeos extraídos de lâminas

Cód.	Isol.	Família	Espécie	MI	F	Try-SL PCR	SL3'
B4	287td	Coreidae	<i>Veneza sp</i>	++	P	+	-
C2	290tdg	Coreidae	<i>Veneza sp</i>	+	P	+	-
D5	268td	Coreidae	<i>Veneza stigma</i>	+	P	+	-
E2	270td	Coreidae	<i>Veneza stigma</i>	+	P	+	-
E6	273gs	Coreidae	<i>Phthia lunata</i>	+	P	+	-
F1	273td	Coreidae	<i>Phthia lunata</i>	+	P	+	-
H4	198td	Coreidae	<i>Hypselonoltus fulvus</i>	+	P	+	-
I5	233td	Coreidae	<i>Hypselonoltus fulvus</i>	+++	P	+	-
I6	234td	Coreidae	<i>Hypselonoltus fulvus</i>	+++	P	+	-
J6	239gs	Coreidae	<i>Hypselonoltus fulvus</i>	+++	P	+	-
L1	205td	NI	NI	+	P	+	-
L2	206td	NI	NI	+	P	+	-
L6	176td	Lygaeidae	NI	+	P	+	-
M1	180td	Coreidae	<i>Hypselonoltus fulvus</i>	+	P	+	-
M2	182td	NI	NI	+	P	+	-
M4	190gs	Coreidae	<i>Hypselonoltus fulvus</i>	+	P	+	-
M5	190td	Coreidae	<i>Hypselonoltus fulvus</i>	+	P	+	-
M6	192gst	Coreidae	<i>Phthia picta</i>	+	P	+	-
N2	194td	Coreidae	<i>Acantocephala latipes</i>	+	P	+	-
N3	195td	NI	NI	+	P	+	-
O1	212td	NI	NI	+	P	+	-
O3	216td	NI	NI	+	P	+	-
O4	204gs	NI	NI	+	P	+	-
O5	112td	NI	NI	+	P	+	-
T2	132td	Lygaeidae	NI	++	P	+	-
T4	136td	Lygaeidae	NI	++	P	+	-
U2	148td	Lygaeidae	NI	+++	P	+	-
U3	149td	Coreidae	<i>Crinocerus sanctus</i>	+++	P	+	-
V6	112td	Coreidae	<i>Veneza stigma</i>	++	P	+	-
X1	107td	Coreidae	<i>Crinocerus sanctus</i>	+	P	+	-
X4	103gs	Coreidae	<i>Crinocerus sanctus</i>	++	P	+	-
X5	101td	Coreidae	<i>Crinocerus sanctus</i>	+	P	+	-
X6	167td	Coreidae	<i>Crinocerus sanctus</i>	+	P	+	-

Y1	100td	Coreidae	<i>Crinocerus sanctus</i>	+	P	+	-
Y2	99gs	Coreidae	<i>Crinocerus sanctus</i>	+	P	+	-
Y3	93td	Coreidae	<i>Hypselonoltus fulvus</i>	+	P	+	-
Y4	91gs	Coreidae	<i>Hypselonoltus fulvus</i>	+	P	+	-
Y5	90td	Largidae	<i>Largus humilis</i>	++	P	+	-
W1	88td	Coreidae	<i>Hypselonoltus fulvus</i>	+	P	+	-
W2	87td	Coreidae	<i>Hypselonoltus fulvus</i>	+	P	+	-
Z3	81td	Coreidae	<i>Hypselonoltus fulvus</i>	+	P	+	-
15	13td	Largidae	<i>Largus humilis</i>	+	P	+	-
22	260td	NI	NI	+	P	+	-
23	261td	coreidae	<i>Phthia lunata</i>	+	P	+	-
24	263td	Coreidae	<i>Sphictyrtus cryseis</i>	+	P	+	-
32	239gs	Coreidae	<i>Hypselonoltus fulvus</i>	+++	P	+	-
33	242gs	Coreidae	<i>Hypselonoltus fulvus</i>	+	P	+	-
36	246gs	Coreidae	<i>Veneza stigma</i>	+	P	+	-
51	232td	Coreidae	<i>Hypselonoltus fulvus</i>	+++	P	+	-
53	122td	Coreidae	<i>Crinocerus sanctus</i>	+++	P	+	-
55	126td	Coreidae	<i>Crinocerus sanctus</i>	+++	P	+	-
56	127td	Coreidae	<i>Hypselonoltus fulvus</i>	++	P	+	-

MI, investigação microscópica; F, morfologia; Try-SLPCR, PCR específico para tripanossomatídeos, SL3', sonda

Tabela 16 Amplificação por Try-SLPCR e hibridação com SL3' de DNA de tripanossomatídeos extraídos de lâminas das formas coanomastigota e amastigota.

Cód.	Isol.	Família	Espécie	MI	F	Try-SL PCR	SL3'
O6	153td	Lygaeidae	NI	+	C	+	-
P1	152td	Lygaeidae	NI	+	C	+	-
P2	148gs	Lygaeidae	NI	+	A	+	-
U4	152td	Lygaeidae	NI	++	C	+	-

MI, investigação microscópica; F, morfologia; Try-SLPCR, PCR específico para tripanossomatídeos, SL3', sonda

Tabela 17 Amplificação por Try-SLPCR e hibridação com SL3' de DNA de tripanossomatídeos extraídos de lâminas, positivos para MI.

Cód.	Isol.	Família	Espécie	MI	F	Try-SL PCR	SL3'
A6	283td	Coreidae	<i>Veneza sp</i>	++	P	-	-
B1	284gs	Coreidae	<i>Veneza sp</i>	++	P	-	-
C4	291td	Coreidae	<i>Veneza sp</i>	++	P	-	-
C6	302td	Coreidae	<i>Veneza sp</i>	+++	P	-	-
F3	274td	Coreidae	<i>Phthia lunata</i>	+	P	-	-
F5	275td	Coreidae	<i>Phthia lunata</i>	+	P	-	-

G1	276td	Coreidae	<i>Veneza stigma</i>	+	P	-	-
G5	278td	Coreidae	<i>Veneza stigma</i>	+	P	-	-
H2	280td	Coreidae	<i>Veneza stigma</i>	+++	P	-	-
H3	281gs	Coreidae	<i>Veneza sp</i>	+	P	-	-
I2	231td	Coreidae	<i>Hypselonoltus fulvus</i>	+	P	-	-
I3	232gs	Coreidae	<i>Hypselonoltus fulvus</i>	++	P	-	-
N1	193td	Largidae	<i>Largus humilis</i>	+	P	-	-
R6	298td	Coreidae	<i>Veneza stigma</i>	+	P	-	-
S5	302td	Coreidae	<i>Veneza stigma</i>	+	P	-	-
T5	139td	Coreidae	<i>Hypselonoltus fulvus</i>	++	P	-	-
T6	141td	Lygaeidae	<i>NI</i>	+	P	-	-
U1	148gs	Lygaeidae	<i>NI</i>	++	P	-	-
U6	120gs	Coreidae	<i>Crinocerus sanctus</i>	+++	P	-	-
V1	119td	Coreidae	<i>Crinocerus sanctus</i>	+++	P	-	-
V2	118td	Lygaeidae	<i>NI</i>	+	P	-	-
V3	116td	Lygaeidae	<i>NI</i>	+	P	-	-
V4	113gs	Coreidae	<i>Crinocerus sanctus</i>	++	P	-	-
V5	112gs	Coreidae	<i>Veneza stigma</i>	+	P	-	-
X2	105td	Largidae	<i>Largus humilis</i>	+	P	-	-
X3	110td	Largidae	<i>Largus humilis</i>	+	P	-	-
W3	86td	Coreidae	<i>Hypselonoltus fulvus</i>	+	P	-	-
W4	84td	Coreidae	<i>Hypselonoltus fulvus</i>	+	P	-	-
Z5	27td	Coreidae	<i>Phthia phicta</i>	+	P	-	-
Z6	25td	Coreidae	<i>Veneza stigma</i>	+	P	-	-
11	25gs	Coreidae	<i>Veneza stigma</i>	+	P	-	-
12	23td	Coreidae	<i>Hypselonoltus fulvus</i>	+	P	-	-
13	18td	Largidae	<i>Largus humilis</i>	+	P	-	-
14	15td	Largidae	<i>Largus humilis</i>	+	P	-	-
16	247gs	Coreidae	<i>Veneza stigma</i>	+	P	-	-
21	247td	Coreidae	<i>Veneza stigma</i>	+	P	-	-
41	246td	Coreidae	<i>Veneza stigma</i>	+	P	-	-
52	122gs	Coreidae	<i>Crinocerus sanctus</i>	+	P	-	-
Z4	66td	Coreidae	<i>Hypselonoltus fulvus</i>	+	C	-	-

MI, investigação microscópica; F, morfologia; Try-SLPCR, PCR específico para tripanossomatídeos, SL3', sonda

Tabela 18 Amplificação por Try-SLPCR e hibridação com SL3' de DNA de tripanossomatídeos extraídos de lâminas.

Cód.	Isol.	Família	Espécie	MI	F	Try-SL PCR	SL3'
L3	171gs	Coreidae	<i>Acantocephala latipes</i>	-	-	+	-
42	254td	Coreidae	<i>Hypselonoltus fulvus</i>	-	-	+	-

MI, investigação microscópica; F, morfologia; Try-SLPCR, PCR específico para tripanossomatídeos, SL3', sonda

O isolado B6/288td, MI ++, apresentando formas promastigota e coanomastigota, amplificação Try-SLPCR -, SL3'+.

3.5.1 – Comparação do grupo dos *Phytomonas* com os grupos 1, 2, 3 e 4

A tabela 19 registra os flagelados do gênero *Phytomonas* com as espécies hospedeiras, o código de identificação e as forma evolutivas. Como se pode observar, *Phytomonas* distribuem-se pelos 4 grupos definidos pela análise morfométrica, tabela 20. Todavia, um reparo deve ser feito. É que embora não se tenha dúvida quanto à presença de *Phytomonas* em uma lâmina SL3' positiva, não se pode ter certeza que os flagelados medidos sejam realmente deste gênero. Isto porque nada impede que as lâminas alberguem flagelados de mais de um gênero. Mas, de qualquer forma, a enorme dispersão morfométrica entre os flagelados examinados vem mais uma vez mostrar a precariedade da morfometria como parâmetro identificatório.

Tabela 19 – Distribuição de *Phytomonas* pelos diferentes grupos morfométricos.

Espécie	Código	Forma	Grupo	SL3'
<i>Crinocerus sanctus</i>	282td	P	1	+
<i>Hypselonltus fulvus</i>	83td	P	1	+
<i>Veneza sp</i>	287td	P	1	+
<i>Veneza sp</i>	294td	P	1	+
<i>Hypselonltus fulvus</i>	243td	P	1	+
<i>Hypselonltus fulvus</i>	238td	P	2	+
<i>Veneza sp</i>	281td	P	2	+
<i>Veneza sp</i>	267gs	P	2	+
<i>Veneza sp</i>	287gs	P	2	+
<i>Hypselonoltus fulvus</i>	244gs	PA	3	+
<i>Hypselonoltus fulvus</i>	245gs	PA	3	+
<i>Veneza stigma</i>	247gs	PA	3	+
<i>Crinocerus sanctus</i>	148gs	PA	3	+
<i>Hypselonoltus fulvus</i>	243gs	PA	3	+
<i>Veneza sp</i>	288td	PC	4	+

P, promastigota; A, amastigota; C, coanomastigota.

245gs *Hypselonoltus fulvus*

245gs *Hypselonoltus fulvus*

288td *Veneza sp*

288gs *Veneza sp*

Tabela 20 - Medidas μm de *Phytomonas* spp.

Isolado	c.c	c.f	c.a
282td	12, ^a $\pm$ 3,3 ^b (5,6-19,2) ^c	14,4 $\pm$ 4,1 (6,9-23,1)	3,3 $\pm$ 0,7 (2,1-4,7)
83td	14,0 $\pm$ 3,8 (10,1-25,3)	13,4 $\pm$ 3,1 (5,2-17,0)	3,4 $\pm$ 0,9 (1,9-5,5)
287td	20,2 $\pm$ 4,0 (12,2-29,6)	29,5 $\pm$ 6,9 (14,6-44,6)	6,5 $\pm$ 2,0 (2,5-11,6)
294td	24,1 $\pm$ 9,2 (13,9-43,1)	8,7 $\pm$ 3,0 (5,0-13,1)	5,6 $\pm$ 2,0 (3,0-9,5)
238td	18,6 $\pm$ 4,9 (7,9-31,9)	15,1 $\pm$ 4,7 (8,4-28,4)	4,2 $\pm$ 1,1 (2,0-6,7)
243td	25,6 $\pm$ 5,3 (13,4-37,9)	26,8 $\pm$ 1,2 (6,0-36,0)	5,2 $\pm$ 1,8 (2,2-9,3)
281td	20,6 $\pm$ 3,9 (13,1-31,4)	34,9 $\pm$ 6,6 (19,0-45,1)	6,6 $\pm$ 2,0 (2,4-10,6)
267gs	22,4 $\pm$ 4,1 (16,4-30,9)	30,7 $\pm$ 6,9 (16,7-44,0)	6,6 $\pm$ 1,9 (4,1-11,1)
287gs	24,2 $\pm$ 6,8 (13,0-40,1)	5,6 $\pm$ 1,3 (3,4-7,7)	4,1 $\pm$ 0,8 (3,0-6,0)
	8,8 $\pm$ 1,5 (7,1-9,8)		
244gs	25,0 $\pm$ 6,1 (10,5-35,2)	7,4 $\pm$ 1,8 (3,3-11,7)	3,5 $\pm$ 0,8 (2,1-5,4)
	8,8 $\pm$ 0,7 (7,1-9,9)		
245gs	25,4 $\pm$ 6,4 (12,9-37,2)	11,0 $\pm$ 2,9 (7,1-15,8)	3,6 $\pm$ 0,7 (2,1-5,2)
	8,5 $\pm$ 1,6 (6,2-13,0)		
247gs	21,2 $\pm$ 6,7 (10,7-33,8)	6,4 $\pm$ 2,1 (5,0-11,9)	3,4 $\pm$ 0,6 (2,4-4,6)
	8,8 $\pm$ 1,2 (6,7-10,9)		
148gs	13,6 $\pm$ 1,1 (11,5-15,6)		
243gs	22,9 $\pm$ 5,4 (13,1-33,3)	7,5 $\pm$ 1,4 (4,1-10,3)	3,3 $\pm$ 0,8 (1,9-5,5)
	8,4 $\pm$ 1,3 (6,3-11,6)		
288td	7,5 $\pm$ 1,4 (4,5-12,0)	3,7 $\pm$ 1,7 (1,3-10,0)	2,4 $\pm$ 0,6 (1,4-4,0)

a, média aritmética; b, desvio padrão; c, valores mínimos e máximos; c.c, comprimento do corpo; c.f., comprimento do flagelo; c.a., distância do cinetoplasto à extremidade do corpo.

3.5.2 Análise dos resultados utilizando marcadores moleculares

A análise dos resultados utilizando o método de Try-SLPCR e hibridação para pesquisa de tripanossomatídeos e *Phytomonas* spp está compilado na tabela 21.

Tabela 21 Relação de Trypanosomatidae e *Phytomonas* definidos por marcadores moleculares e espécies de hemípteros.

Hospedeiro de origem		Try-SLPCR +		SL3'+
Família	Espécie	E	Tripanosomatídeos	<i>Phytomonas</i>
Coreidae	<i>Crinocerus sanctus</i>	33	6	3
	<i>Hypselonotus fulvus</i>	74	25	9
	<i>Veneza stigma</i>	16	8	4
	<i>Veneza sp</i>	24	8	7
	<i>Sphictyrtus cryseis</i>	01	1	0
	<i>Lucullia flavovittata stal</i>	02	2	2
	<i>Phthia picta</i>	08	2	2
	<i>Phthia lunata</i>	05	4	2
	<i>Acantocephala latipes</i>	02	1	0
Largidae	<i>Largus humilis</i>	11	2	2
Lygaeidae	NI	39	8	2
Miridae	ni	11	-	-
Rhopalidae	<i>Niesthrea sp</i>	2	-	-
Pentatomidae	<i>Edessa rufomarginata</i>	6	-	
	<i>Euchistus sp</i>	7	-	
Reduviidae	<i>Arilus carinatus</i>	1	1	1
	<i>Apromerus sp</i>	2	-	

Try-SLPCR, PCR específico para tripanossomatídeos, SL3', sonda específica para *Phytomonas*

Dos 244 hemípteros fitófagos examinados, 13,5% foram encontrados positivos para o gênero *Phytomonas*. Dos 108 insetos positivos por investigação microscópica, 30,5% foram do gênero *Phytomonas*. Destes insetos positivos, os órgãos infectados foram: glândulas salivares, 18% , tubo digestivo 45% tubo digestivo e glândulas salivares, 18%.

Foram 06 as espécies descritas pela primeira vez albergando *Phytomonas*: *Crinocerus sanctus*, *Phthia lunata*, *Veneza stigma*, *Lucullia flavovittata stal*, todas da família Coreidae, *Largus humilis* da família Largidae. Também foi descrito pela primeira vez como hospedeiro do gênero *Phytomonas* o inseto predador da família Reduviidae, *Arilus carinatus*.

4. Discussão

Tripanossomatídeos monoxênicos são encontrados com relativa frequência em insetos hemípteros fitófagos. Tripanossomatídeos heteroxênicos do gênero *Phytomonas*, são encontrados em plantas, particularmente em laticíferas, e também encontrados em frutos e em plantas cultivadas como café, dendê, coqueiros e mandioca onde causam doenças de considerável importância econômica (Camargo, 1990). Admite-se de acordo com algumas evidências que estes flagelados sejam transmitidos por hemípteros fitófagos (Kastelein, 1985; Camargo, 1999), uma vez que esses flagelados são frequentemente encontrados nas glândulas salivares desses insetos podendo ser inoculados com saliva antes ou durante a alimentação na planta hospedeira (Camargo & Wallace, 1994). Dados da literatura mostram que dos hemípteros encontrados parasitados por flagelados, 9% eram da família Lygaeidae, 44% da família Coreidae, 40% da família Pyrrhocoridae, 18% da família Pentatomidae. Sendo a prevalência de flagelados em insetos de 35% (Sbravate et al., 1989).

Para se ter uma avaliação da incidência de tripanossomatídeos de insetos e plantas no estado de Rondônia foi necessário um levantamento preliminar das principais espécies de insetos fitófagos na região. Dos 244 insetos encontrados 67,6% foram da família Coreidae, 5,2% da família Pentatomidae, 16% da família Lygaeidae, 4,5% da família Largidae, 4,5% da família Miridae, 1% da família Rhopalidae, todos hemípteros fitófagos e 1,2% da família Reduvidae, inseto predador (dados na tabela 1 e 2).

Em seus estudos Sbravate et al., (1989) encontraram uma prevalência de 35% de flagelados em hemípteros fitófagos. Em nosso estudo, por investigação microscópica, dados da tabela 2, foi mostrada a prevalência de flagelados em fitófagos é mais elevada, da ordem de 44%. Insetos de 5 famílias de Hemiptera foram encontradas parasitadas por tripanossomatídeos, sendo 4 famílias de fitófagos. Entre estas, na família Coreidae, dos 165 examinados, 54% se encontraram parasitados por flagelados; na família Pentatomidae, do total de 13 examinados, 7% abrigavam parasitas flagelados; na família Lygaeidae, dos 39 examinados 20% foram positivos; na família Largidae foram examinados 11

insetos e 72% estavam abrigando flagelados. Mesmo já tendo sido descrita como albergando tripanossomatídeos, a família Miridae (Camargo & Wallace, 1994) não apresentou insetos infectados assim como a família Rhopalidae. Também foram encontrados 33% de insetos parasitados na família Reduviidae. Os Coreidae (54%) e Largidae (72%), foram os mais freqüentemente encontrados positivos para flagelados. Embora nossas coletas dessem preferência aos insetos colonizadores da floresta, muitos foram coletados em plantas cultivadas onde sabidamente prevalecem os Coreidae.

Entre os hemípteros fitófagos examinados por investigação microscópica dados da tabela 3 comparados com Camargo & Wallace (1994), uma família – Largidae, três gêneros, *Crinocerus*, *Lucullia* e *Acantocephala* e duas espécies, *Phthia lunata* e *Veneza stigma*, foram pela primeira vez descritas como hospedeiros de flagelados.

Os resultados de nossas coletas mostraram não haver diferenças de infecção por tripanossomatídeos tanto no inverno (44%) quanto no verão (44%) (tabela 2). As porcentagens de insetos infectados nas duas estações climáticas foram, portanto, bastante aproximadas o que parece sugerir que as infecções estejam presentes o ano todo, o que contrasta com regiões temperadas e frias onde as taxas de infecção são menores no inverno.

Antes da análise que se segue, algumas observações se fazem necessárias a respeito da metodologia utilizada. Apesar de invalidada como parâmetro de identificação da família Trypanosomatidae (Camargo, 1999) procedeu-se a análise morfológica e morfométrica dos flagelados para organizar grupos que pudessem ser comparados com os resultados das provas moleculares, uma vez que é a primeira vez que estuda-se *Phytomonas* e outros tripanossomatídeos na região do estado de Rondônia

Os tripanossomatídeos referidos na literatura como parasitas de hemípteros fitófagos pertencem aos gêneros *Leptomonas*, *Phytomonas*, *Crithidia*, *Blastocrithidia* e *Herpetomonas*. Ao examinarmos os esfregaços corados com

Giernsa do conteúdo intestinal e glândulas salivares de insetos, encontramos 88% de formas promastigotas, 4% de coanomastigotas e 8% de amastigotas, estes sempre associadas com formas promastigotas. Excetuando-se os coanomastigotas típicos do gênero *Crithidia*, formas promastigotas são comuns à maioria dos gêneros de tripanossomatídeos inferiores. Outra característica comum da análise morfológica diz respeito ao intenso polimorfismo que Jankevicius et al., (1989) já haviam descrito em flagelados de um mesmo inseto vetor. Entre promastigotas existe um polimorfismo muito acentuado tanto em relação a comprimento do corpo quanto ao do flagelo. Além disso, alguns promastigotas apresentam uma ou mais torções ao longo do corpo ausente na maioria. Obedecendo a um critério puramente morfométrico os tripanossomatídeos foram organizados em 4 grupos conforme as dimensões do flagelo livre e do corpo, a presença ou ausência de torções ao longo do corpo, e a presença concomitante de formas amastigotas (tabelas 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12). Essa análise morfométrica dos parasitas, embora tenha nos permitido distribuí-los em 4 grupos, não serviu para distinguir os gêneros dos parasitas e, portanto identificar o gênero *Phytomonas* entre eles.

A dificuldade do cultivo *in vitro* dos tripanossomatídeos do gênero *Phytomonas* prejudica a correta identificação e os dados reais da prevalência destes flagelados em insetos e plantas (Teixeira, et al., 2000). Em virtude destas dificuldades, dos 108 hemípteros fitófagos encontrados parasitados por tripanossomatídeos, somente 4% foram isolados para futuras culturas e testes, ou seja, uma pequena amostra em relação ao número de insetos parasitados (tabela 4).

Em virtude das dificuldades de isolamento e cultura, para obtermos dados sobre a real prevalência de *Phytomonas* em insetos fitófagos, utilizamos técnicas de diagnóstico molecular recentemente desenvolvidas.

A adaptação e o uso do método SL-PCR seguido de hibridação (Southern blot) com sonda para esfregaços em lâminas, veio resolver vários problemas na pesquisa de *Phytomonas* e/ou outros tripanossomatídeos em regiões onde as

facilidades laboratoriais são precárias ou nem existem, pois este método não requer o isolamento e o cultivo de flagelados (Teixeira et al., 2000). Utilizando o SL-PCR, à temperatura de 48^oC (Serrano et al., 1999a) seguida de hibridação com a sonda SL3' foi possível identificar *Phytomonas* entre as amostras de tripanossomatídeos. Além disso, dois isolados negativos para MI foram detectados Try-SLPCR (+) e SL3'(+) (tabela 14) demonstrando a sensibilidade e as vantagens da pesquisa utilizando a amplificação por PCR. (Tabela 21).

Dos 244 hemípteros fitófagos examinados, 13,5% foram encontrados positivos para o gênero *Phytomonas*. Dos 108 insetos positivos por investigação microscópica, 30,5% foram do gênero *Phytomonas*. Destes insetos positivos, os órgãos infectados foram: glândulas salivares, 18% , tubo digestivo 45% tubo digestivo e glândulas salivares, 18%.

Estes resultados mostram claramente a utilidade do SL-PCR em levantamento epidemiológicos sobre a ocorrência de *Phytomonas* entre insetos, tarefa que seria praticamente impossível se dependêssemos de isolamento e cultura dos flagelados, particularmente em regiões em que esses procedimentos enfrentam inúmeras dificuldades (Teixeira et al., 2000).

Outra observação que merece ser ressaltada é a de que hemípteros também podem abrigar simultaneamente tripanossomatídeos inferiores de mais de um gênero. Esta última observação foi sempre prejudicada no passado pelo fato de que isolamento e cultura tendem a privilegiar uma espécie de flagelados entre as várias que podem ser encontradas em um inseto. Por isso, infecções múltiplas permaneceram e permanecem críticas nos métodos tradicionais de diagnóstico.

Finalmente, a utilização do método nos permitiu identificar 6 novas espécies hospedeira de *Phytomonas*: *Crinocerus sanctus*, *Phthia lunata*, *Veneza stigma*, *Lucullia flavovittata*, fitófagos da família Coreidae, *Largus humilis* da família Largidae e o predador *Arilus carinatus* da família Reduviidae.

5. Conclusão

As espécies de insetos hemípteros fitófagos encontrados na região do estado de Rondônia, durante o período da coleta, são das famílias Coreidae, Largidae, Lygaeidae, Pentatomidae, Rhopalidae e Miridae, sendo os Coreidae os mais comumente encontrados.

Os insetos são encontrados na mesma proporção durante o ano todo, sem apresentar variações sazonais.

A presença de infecção nos insetos é a mesma nas duas estações climáticas independente do hemíptero examinado.

Entre as famílias de hemípteros analisadas os Coreidae apresentam maior taxa de infecção por tripanossomatídeos.

Os tripanossomatídeos encontrados nas glândulas salivares ou tubo digestivo apresentam sempre acentuado polimorfismo.

A caracterização dos gêneros de tripanossomatídeos pelo “amplificação do “spliced leader” e hibridação com a sonda SL3’ permitiu verificar que :1/3 dos tripanossomatídeos encontrados nos hemípteros fitófagos eram do gênero *Phytomonas*;

Os hemípteros fitófagos da família Coreidae foram os que mais apresentaram *Phytomonas*.

Phytomonas foram encontrados infectando o tubo digestivo, a glândula salivar e também a hemocele.

Insetos que abrigam *Phytomonas* também podem hospedar outros gêneros de tripanossomatídeos inferiores.

Além disso, pudemos identificar 06 novas espécies hospedeiras de *Phytomonas*: *Crinocerus sanctus*, *Phthia lunata*, *Veneza stigma*, *Lucullia flavovittata* da família Coreidae, *Largus humilis* da família Largidae e o inseto predador *Arilus carinatus* da família Reduviidae.

6. Referências Bibliográficas

- Agabian, N. (1990). *Trans-splicing on nuclear pré-mRNAs*. *Cell* **61**: 1157-1160.
- Aragão, H. B. (1927). Sur um flagellé du látex de *Manihot palmata*, *Phytomonas françai* n. sp. *Comptes Rendus dès Séances de la Société de Biologie* **97**: 1077- 1080.
- Camargo, E.P. (1964). Growth and differentiation in *Trypanossoma cruzi*. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **6**: 93 -100.
- Camargo, E. P., Mattei D., Barbieri, C.L., and Morel, C.M. (1982). Eletrophoreticanalysis of endonucleases - generated fragments of k – DNA, of esterase isoenzymes and of surface proteins as aids for species identification of insects. Trypanosomatids. *Journal of Parasitology* **29**: 251 – 258.
- Camargo, E. P., Silva, S, Roitman, I., De Souza, Jankevicius, J. V., and Dollet, M. (1987). Enzymes of ornithine-arginine metabolism in trypanossomatids of the genus *Phytomonas*. *Journal of Protozoology* **34**: 439 - 441.
- Camargo, E. P., Kastelein,P. and Roitman, I. (1990). Trypanossomatid parasites of plants (*Phytomonas*). *Parasitology Today* **6**: 22 - 25.
- Camargo, E. P., Sbravate C., Teixeira, M.M.G., Uliana, S. R., Soares, M. B. M., Affonso, H.T., and Floeter-Winter, L. (1992). Ribossomal DNA restriction analysis and synthetic oligonucleotide probing in the identification of genera of lower trypanossomatids. *Journal of Parasitology* **78**: 40 - 48.
- Camargo, E. P.,and Wallace, G. (1994). Vector of plant parasites of the genus *Phytomonas* (Protozoa, Zoomastigophorea, kinetoplastida). In “*Advances in Disease Vector Research*” (K.F., Harris, Ed.), pp. 333 - 359. Springer-Verlag, New York, NY.
- Camargo, E, P. (1999). *Phytomonas* and other parasites of plants and fruit. *Advances in Parasitology*, **42**: 29 -112.
- Campaner, M. Prevalência, isolamento e estudo morfológico de tripanossomatídeos de hemípteros fitófagos e plantas. São Paulo, (1991), (*Dissertação de Mestrado-Instituto de Ciências Biomédicas de Universidade de São Paulo*).
- Conchon, I., Campaner, M., Sbravate, C., and Camargo, E. P.(1989). Trypanossomatids, other than *Phytononas* sp., isolated and cultured from fruit. *Journal of Protozoology* **36**: 412 - 414.
- Dollet, M., Cambrony, D. And Gargani, D. (1982). Culture axenique *in vitro* de *Phytomonas* sp (Trypanosomatidae) d'Euphorbe transmis par *Stenocephalus*

- agilis* Scop (Coreide). *Comptes Rendus de l'Académie de Sciences, Paris* **295**: 547 – 550.
- Fiorini, J. E., Cucolichio, G., Rezende, D., Faria e Silva P. M. Soares, M.J. and DeSouza, W. (1996). Biochemical and morphological study of o trypanossomatid isolated from mulberry [Abstract]. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **91**: 99.
- França, C., (1920). La flagellose dès euphorbes. *Annales de L'Institut Pasteur, Paris* **34**, 432 - 465
- Hoare, C. A. and Wallace, F. G.(1966). Developmental stages of trypanossomatid flagellates: a new terminology. *Nature* **212**: 1385 -1386.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, (1995). *Censo Agropecuário do estado de Rondônia*.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, (1996). *Censo Agropecuário do estado de Rondônia*.
- Jankevicius, J. V., Jankevicius, S. I., Campaner, M., Conchon, I., Maeda, L. A., Teixeira, M. M. G., Freymuller, E. And Camargo, E. P. (1989). Life cycle and culturing of *Phytomonas serpens* (Gibbs), a trypanossomatid parasite of tomatoes. *Journal of Protozoology* **36**: 265 - 271.
- Kastelein,P.; (1985). Transmission of *Phytomonas sp* (Tripanossomatidae) by the bug *Edessa loxdali* (Pentatomidae). *Surinaamse Land Bolew* **33**, 62- 64.
- Lafont,A. (1910). Sur la presence d'un Leptomonas, parasite de la classe des Flagellés, dans le latex de trois Euphorbiacées. *Annales de l' Institut Pasteur, Paris* **24**: 205 -219.
- Maniatis, T.; Fritsch, E.F.; Sambrook, J. Molecular cloning: a laboratory manual, New York, Cold Spring Harbor Laboratory (1982).
- Nunes, N. R., Teixeira, M. M. G., Camargo, E. P. & Buck, G. A. (1995). Sequence and structural characterization of the spliced leader genes and transcripts in *Phytomonas*. *Mol. Biochem. Parasitol* **74**: 233 -237.
- Petry, K., Shotellius, J. and Dollet, M. (1987). Differentiation of *Phytomonas* sp. and lower trypanossomatids (*Herpetomonas*, *Crithidia*) by agglutination tests with lectins. *Parasitology Research* **74**: 1 - 4.
- Riou, J. F., Dollet, M., Ahomadegbe, J. C., Dominique, C. and Riou, G. (1987). Caracterization of *Phytomonas* ssp. Kinetoplast DNA, a plant pathogenic trypanossomal species.*FEBS Letters* **213**: 304 - 308.

- Sbravate, C., Campaner, M., Camargo, L.E.A., Conchon, I., Teixeira, M. M. G., and Camargo, E.P. (1989). Culture and generic identification of trypanosomatids of phytophagous hemiptera in Brazil. *Journal of Protozoology* **36**: 543 - 547
- Serrano, M., G., Nunes, L., R., Campaner, M., Buck, G., A., Camargo, E., P., Teixeira, M., M., G., (1999a) Trypanosomatidae: *Phytomonas* detection in plants and phytofagous insects by PCR amplification of genus-especific sequence of the splice leader gene. *Exp. Parasitol.* **91**: 268 - 269.
- Serrano, M., Campaner, M., Buck, G., A., Teixeira, M., M., G. & Camargo, E. P. (1999b). PCR amplification of the spliced leader gene for the diagnosis of tripanossomatid parasites of plants and insects in methanol fixed smears. *FEMS Microbiol.Letters*, **176**: 241- 246.
- Serrano, M. G., Camargo, E. P., Teixeira, M. M. G., (1999c). *Phytomonas*, Analysis of Polymorphism and Genetic Relatedness between Isolates from Plants and Phytophagous Insects from Different Geographic Regions by RAPD Fingerprints and Synapomorphic Markers. *Eukaryotic Microbiology* **46**: 617 – 675
- Silva, J. B. T. and Roitman, I. (1989). Growth of *Phytomonas serpens* in a chemically defined medium [Abstract]. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **84**: 157.
- Sturm, N., Fernandes, O. and Campbell, D. A. (1995). The mini-exon genes of three *Phytomonas* isolates that differ in plant tissue tropism. *FEMS Microbiology Letters* **130**: 177-182.
- Wallace, F.G., (1966). The trypanosomatids of insects and arachnids. *Experimental Parasitology* **18**, 124 -193.
- Wallace, F.G., Camargo, E.P., McGhee, R. B., and Roitman, I. (1983). Guidelines for the description of lower trypanosomatids. *J. Protozool.* **30**: 308 - 313.
- Teixeira, M. M. G. and Camargo, E. P. (1989). Monoclonal antibodies for the identification of trypanosomatids of the genus *Phytomonas*, *Journal of Protozoology* **36**: 262 - 264.
- Teixeira, M. M. G., Campaner, M. and Camargo, E. P. (1994). Detection of trypanosomatid *Phytomonas* parasitic in plants by polymerase chain reaction aplification of 18S ribossomal DNA. *Parasitology Research* **80**: 512 - 516.
- Teixeira, M. M. G. , Campaner, M. and Camargo, E. P. (1995). Caracterization of the target-antigens of anti *Phytomonas* specific monoclonal antibodies. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **42**: 232 - 237.

- Teixeira, M. M. G., Serrano, M. G., Nunes, L. R., Campaner, M. Buck, G. and Camargo, E. P. (1996). Trypanossomatidae: a splice-leader derived probe specific for thre genus *Phytomonas*. *Experimental Parasitology* **84**: 311 - 319.
- Teixeira, M. M. G., Takata, C. S. A, Conchon, I., Campaner, M. and Camargo, E. P. (1997). Ribossomal and kDNA markers distinguish two sub-groups of *Herpetomonas* among old species and new trypanossomatids isolated from flies. *Journal of Parasitology* **83**: 58 - 65.
- Teixeira, M. M. G., Serrano, M. G., Camargo, E. P. (2000). New Data from Old Trypanossomatid Preparations. *Parasitology Today* **16**: 261 - 263.
- Ullu, E., Tschudi, C., and Gunzl, A. *Trans* splicing in trypanossomatid protozoa - Molecular Biology of Parasite Protozoa – (1996). IRL PRESS, OXFORD UNIVERSITY PRESS, Oxford, New York, Tokio.

RESUMO

Tripanossomatídeos particularmente os do gênero *Phytomonas*, podem infectar, frutos, látex, seiva, floema e flores de muitas famílias de vegetais, e foram detectados em insetos fitófagos de seus possíveis vetores em várias regiões do Velho e Novo Continente.

Em contraste com a enorme variedade da flora e da fauna entomológica da Amazônia Brasileira, poucas espécies têm sido descritas albergando tripanossomatídeos.

Os tripanossomatídeos pertencentes a estes gêneros podem apresentar formas evolutivas típicas que permitem a sua identificação morfológica. No entanto as formas promastigota, existentes tanto no ciclo evolutivo dos gêneros *Herpetomonas*, *Leptomonas* e *Phytomonas*, não permitem a identificação morfológica, sendo necessário parâmetros adicionais para a diferenciação entre os gêneros.

A dificuldade do cultivo “in vitro”, impede a correta avaliação da presença destes parasitas em insetos e plantas, impossibilitando uma avaliação do universo dos tripanossomatídeos.

No presente trabalho foram realizadas 37 coletas de hemípteros adultos, no estado de Rondônia, nas duas estações climáticas regional durante o período de 1998 a 1999. Foram coletados 244 hemípteros pertencentes a 17 espécies diferentes as quais 13 se revelaram portadoras de tripanossomatídeos.

Das amostras positivas foram feitos esfregaços em lâminas e corados com Giemsa para posterior análise morfológica e morfométrica.

Numa segunda etapa fizemos aplicação do PCR (reação em cadeia da Polimerase) em DNA recuperado de esfregaços em lâminas para pesquisa de tripanossomatídeos de insetos e plantas seguido de hibridação com sonda SL3' específica para pesquisa do gênero *Phytomonas*, com vistas a um estudo preliminar da presença de tripanossomatídeos e *Phytomonas* em Hemípteros Fitófagos no estado de Rondônia sem necessidade de isolamento e cultura axênica dos parasitas.

ABSTRACT

Tripanossomatids, particularly *Phytomonas*, may infect the fruit, latex, sap, phloem and flowers of many plant families. These parasites have also been detected in phytofagous insects which are potential vectors in many areas of the Old and New World.

In spite of the enormous variety of flora and entomological fauna of the Brazilian Amazon only a few species have been described harbouring tripanossomatids.

Some genera of tripanossomatids present typical morphological forms which they can be identified. However, the promastigote form occurs in the genera *Herpetomonas*, *Leptomonas* and *Phytomonas*, so other parameters are needed to separate them.

The difficulties of in vitro cultivation also hinders determining the presence of these parasites in both insects and plants, thus making it impossible to establish realistic incidence rates of these ubiquitous parasites.

In the present study 37 collections of adult hemipterans were made in Rondônia State during the different regional seasons of 1998 to 1999. A total of 244 bugs belonging to 17 species were collected of which 13 had trypanosomatid infections.

Methanol fixed smears of all the infections were made on glass slides and stained with Giemsa for the morphological studies and morphometric analyses.

In a second phase, we used the PCR (Polimerase Chain Reaction) to recover DNA from the methanol fixed smears. The PCR products were hybridized with the SL3' probe which is specific for *Phytomonas*. The aim of this preliminary study was to locate trypanosomatids infections in phytophagous Hemiptera captured in Rondônia State and then determine which of these belonged to the genus *Phytomonas* without the necessity of isolation in culture.