

---

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

---

**JOÃO MARCOS DOS SANTOS NEVES**

**ANÁLISE DA RELAÇÃO EVOLUTIVA ENTRE  
*TRIATOMA MELANOCEPHALA* NEIVA & PINTO,  
1923, *T. VITTICEPS* (STAL, 1859) E *T.*  
*TIBIAMACULATA* (PINTO, 1926) COM O  
COMPLEXO *T. BRASILIENSIS*, POR MEIO DE  
CRUZAMENTOS EXPERIMENTAIS**

JOÃO MARCOS DOS SANTOS NEVES

ANÁLISE DA RELAÇÃO EVOLUTIVA ENTRE *TRIATOMA MELANOCEPHALA* NEIVA & PINTO, 1923, *T. VITTICEPS* (STÅL, 1859) E *T. TIBIAMACULATA* (PINTO, 1926) COM O COMPLEXO *T. BRASILIENSIS*, POR MEIO DE CRUZAMENTOS EXPERIMENTAIS

Orientador: Prof. Dr. Kaio Cesar Chaboli Alevi

Co-orientador: Me. Yago Visinho dos Reis

Supervisor: Prof. Dr. Cláudio José Von Zuben

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Rio Claro  
2019

N518a      Neves, João Marcos dos Santos  
Análise da relação evolutiva entre *Triatoma melanocephala* Neiva & Pinto, 1923, *T. vitticeps* (Stål, 1859) e *T. tibiamaculata* (Pinto, 1926) com o complexo *T. brasiliensis*, por meio de cruzamentos experimentais / João Marcos dos Santos Neves. -- , 2019  
26 p. : il., tabs.

Trabalho de conclusão de curso ( - ) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara,  
Orientador: Kaio Cesar Chaboli Alevi  
Coorientador: Yago Visinho Reis

1. Triatominae. 2. Hibridização. 3. Doença de Chagas. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

## **Agradecimentos**

Gostaria de agradecer primeiramente meu orientador Kaio Cesar Chaboli Alevi e meus colegas de laboratório por terem me proporcionado essa grande oportunidade de realizar esse projeto.

Agradeço aos meus pais por sempre terem me apoiado, fazendo de tudo para que eu pudesse chegar aonde cheguei, por sempre acreditarem em mim e nos meus irmãos e por todo sacrifício que fizeram para proporcionar o melhor que podiam para gente. Agradeço meus irmãos (Eduan, Ariane e Pedro) por estarmos sempre compartilhando - além do sangue - todas as conquistas e frustrações, por serem sempre presentes na minha vida (mesmo distantes) e me darem o melhor suporte que um irmão pode ter. Agradeço também minha família por serem grandes influências no meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Agradeço minha querida República Makuta por ter sido meu lar durante todo esse tempo de graduação. Nela eu construí uma segunda família que vou levar para toda minha vida, cada um que passou por ela (sendo morador ou agregado) me marcou de uma maneira única e contribuiu para meu desenvolvimento pessoal.

Agradeço ao meu grupo de amigos intitulados carinhosamente de "Formation" (Caçapa, Gian, Helena, Isa, Lígia, Marina, Nay e Sorriso) por terem compartilhado comigo os melhores e piores momentos dessa experiência que é a graduação. Sentirei muita falta de tudo que passamos juntos (festas, interbio, aulas, cafés da tarde, almoços, jantares, passeios no horto, brechós...) e espero que esse não seja o fim de nossa história.

Por fim, e não menos importante, agradeço a minha amiga Letícia Helena por ter me acompanhado desde o ensino médio e que, mesmo indo para um campus diferente do meu, sempre esteve muito presente em toda minha jornada. A nossa amizade é única e indescritível, a distância só tornou esse laço mais forte e indestrutível. Obrigado por sempre ser meu ponto de escape em todas as situações, as coisas seriam muito mais difíceis sem você. Continue fazendo o que você faz de melhor e nunca duvide do seu potencial de ajudar as pessoas.

## RESUMO

Com base, principalmente, em dados morfológicos e na disposição geográfica, os triatomíneos foram agrupados em oito subcomplexos específicos. No entanto, com a disponibilidade de dados genéticos, diversos subcomplexos foram reagrupados. *Triatoma melanocephala* Neiva & Pinto, 1923, *T. vitticeps* (Stål, 1859) e *T. tibiamaculata* (Pinto, 1926) foram inicialmente agrupados no subcomplexo *T. brasiliensis*. Contudo, análises cariosistemáticas sugeriram que essas espécies não se enquadram nesse subcomplexo. Recentemente, foi definido um novo subcomplexo intitulado *T. vitticeps* (composto por *T. melanocephala* e *T. vitticeps*). Além disso, *T. tibiamaculata* foi resgatada como um táxon irmão de *P. megistus*, mostrando-se mais próxima do gênero *Panstrongylus* Berg, 1879. Levando em consideração que cruzamentos experimentais são importantes para a taxonomia e sistemática das espécies, pois a caracterização de barreiras reprodutivas pré ou pós-zigóticas e a análise do grau de homeologia entre os cromossomos dos híbridos (que é resultante da combinação de dois genomas diferentes) possibilita confirmar o *status* específico e compreender a relação evolutiva das espécies, avaliou-se a relação entre *T. melanocephala*, *T. vitticeps* e *T. tibiamaculata* com o subcomplexo *brasiliensis*, por meio de cruzamentos experimentais. Nenhum cruzamento resultou em híbridos, o que levou a caracterização de barreiras pré-zigóticas. Levando em consideração que as espécies do subcomplexo *T. brasiliensis* não apresentam barreiras pré-zigóticas interespecífica, a caracterização de barreira reprodutiva demonstra que *T. melanocephala*, *T. vitticeps* e *T. tibiamaculata* não apresentam relação de proximidade evolutiva com as espécies desse subcomplexo.

**Palavras-chave:** Triatominae; Hibridização; Doença de Chagas

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	6
2. OBJETIVO GERAL.....	10
2.1 Objetivos específicos.....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	12
4.1 Artigo.....	12
5. CONCLUSÃO.....	21
6. REFERÊNCIAS.....	22

## 1. INTRODUÇÃO

Os triatomíneos (Hemiptera, Triatominae) são insetos hematófagos de grande importância epidemiológica, pois são considerados como a principal forma de transmissão do protozoário *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), agente etiológico da doença de Chagas (WHO, 2018). Essa doença negligenciada atinge cerca de oito milhões de pessoas e coloca em risco de infecção, aproximadamente, outras 25 milhões, sendo o tratamento com os anti-tripanosomatídeos (Benznidazol e Nifurtimox) efetivos apenas na fase aguda da doença (que, na maioria dos casos, é assintomática) (WHO, 2018), o que ressalta a importância dos programas de controle de vetores por serem considerados como a principal medida para minimizar a incidência de novos casos chagásicos (WHO, 2018).

Atualmente, existem 154 espécies descritas na subfamília Triatominae, agrupadas em 19 gêneros e cinco tribos (OLIVEIRA e ALEVI, 2017; DORN et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2018; LIMA-CORDÓN et al., 2019; NASCIMENTO et al., 2019; POINAR, 2019). Embora existam espécies com maior ou menor grau de importância na transmissão da doença de Chagas [com destaque para *Triatoma infestans* Klug, 1834, *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835), *T. brasiliensis* Neiva, 1911, *T. pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964 e *T. sordida* (Stål, 1859) que apresentam maiores competências vetoriais no Brasil (GALVÃO, 2014)], todos os triatomíneos, de ambos os sexos e em qualquer fase do desenvolvimento após a eclosão são considerados como potenciais vetores dessa enfermidade (GALVÃO, 2014).

Com base, principalmente, em dados morfológicos e na disposição geográfica, os triatomíneos foram agrupados em oito subcomplexos específicos, a saber, *T. dimidiata*, *M. phyllosoma*, *T. brasiliensis*, *T. infestans*, *T. maculata*, *T. matrogrossensis*, *T. rubrovaria* e *T. sordida* (SCHOFIELD e GALVÃO, 2009). No entanto, com a disponibilidade de dados genéticos, diversos subcomplexos foram reagrupados (ALEVI et al., 2012, 2014, 2017; GARDIM et al., 2014; PITA et al., 2016), pois embora esses agrupamentos de espécies não sejam reconhecidos pelo Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICNZ, 1999), Justi et al. (2014) destacam que eles devem representar grupos naturais (grupos monofiléticos).

*T. melanocephala* Neiva & Pinto, 1923, *T. vitticeps* (Stål, 1859) e *T. tibiamaculata* (Pinto, 1926) foram inicialmente agrupados no subcomplexo

*brasiliensis* (SCHOFIELD e GALVÃO, 2009). Contudo, análises cariossistemáticas sugeriram a exclusão das espécies desse subcomplexo (ALEVI et al., 2012). Dados morfológicos, citogenéticos e filogenéticos agruparam *T. melanocephala* e *T. vitticeps* em um novo subcomplexo intitulado *T. vitticeps* (ALEVI et al., 2017). Além disso, curiosamente, as reconstruções filogenéticas apontaram para maior relação de proximidade entre *T. tibiamaculata* com o gênero *Panstrongylus* Berg, 1879, mostrando que essa espécie é um táxon irmão de *P. megistus* (Burmeister, 1835) (HYPSA et al., 2002; GARDIM et al., 2014).

O *status* específico de diversas espécies agrupadas no subcomplexo *T. brasiliensis* (ESPÍNOLA, 1971; COSTA et al., 2003; MENDONÇA et al., 2014, 2016; ALEVI et al., 2018) foi corroborado por meio de cruzamentos experimentais, pois com base no conceito biológico de espécie apresentado por Mayr et al. (1963) e Dobzhansky (1970) [“espécies são grupos de populações naturais que se inter cruzam real ou potencialmente e que são isoladas reprodutivamente de outros grupos (produzindo qualquer incompatibilidade reprodutiva entre os parentais, esterilidade dos híbridos ou ambos)”], a caracterização de barreiras reprodutivas pré ou pós-zigóticas permite confirmar o *status* específico das espécies.

Além da taxonomia, os cruzamentos experimentais também são ferramentas usadas na sistemática, uma vez que a relação evolutiva entre as espécies pode ser avaliada tanto pela análise das barreiras reprodutivas interespecíficas como pelo grau de homeologia dos cromossomos dos híbridos (que é resultante da combinação de dois genomas diferentes), pois para que ocorra pareamento entre dois genomas distintos é necessário que haja, pelo menos, 80% de homeologia entre os cromossomos (RILEY, 1966). Enquanto todas as espécies do subcomplexo *brasiliensis* conseguem hibridizar [pela relação de proximidade filogenética das espécies – grupo monofilético – (OLIVEIRA et al., 2018)], ou seja, não apresentam barreiras pré-zigóticas interespecíficas (COSTA et al., 2003; MENDONÇA et al., 2014), quando *T. brasiliensis* foi cruzado com espécies de outros subcomplexos, como *T. sordida* e *T. infestans* (PERLOWAGORA-SZUMLEWICS e CORREIA, 1972), os ovos foram inférteis [pela maior distância filogenética (JUSTI et al., 2014)].

Segundo Dewey (1982), análises genômicas clássicas (que envolvem a avaliação do comportamento dos cromossomos na metáfase I em híbridos interespecíficos) permitem o estabelecimento de estruturas filogenéticas e podem ser empregadas na definição de posicionamentos taxonômicos e evolutivos das



espécies. Essa ferramenta foi utilizada na subfamília Triatominae para avaliar a associação de *T. lenti* Sherlocki & Serafim, 1967 e *T. bahiensis* Sherlocki & Serafim, 1967 com o subcomplexo *brasiliensis* e, com base no alto grau de homeologia observado nas metáfases I, a relação evolutiva dessas espécies com o subcomplexo foi confirmada (MENDONÇA et al., 2014; ALEVI et al. 2018).

Os mecanismos de isolamento reprodutivo pré-zigóticos (MAYR, 1963; DOBZHANSKY, 1970) conhecidos na subfamília Triatominae são:

#### **a) Isolamento ecológico**

Como exemplo clássico para esse tipo de isolamento reprodutivo, podemos utilizar *T. infestans* e *T. platensis* Neiva, 1913 que são espécies que derivaram de um ancestral comum (JUSTI et al., 2014), mas apresentam hábitos diferentes, a saber, *T. infestans* está associado a regiões domiciliares e se alimenta de sangue de mamíferos (GALVÃO, 2014) e *T. platensis* está associada com ninhos de aves e se alimenta, preferencialmente, do sangue desses vertebrados (ABALOS e WYGODZINSKY, 1951). O único elo que permite a relação entre essas espécies são os galinheiros (ABALOS, 1948; BARRETTO, 1976).

#### **b) Isolamento mecânico**

Na subfamília Triatominae, o isolamento mecânico está associado com a incompatibilidade das genitálias e acontece com certa frequência apenas em uma direção dos cruzamentos, como ocorre no cruzamento entre fêmea de *T. platensis* com machos de *T. delpontei* Romaña & Abalos, 1947 (USINGER et al., 1966). Abalos (1948) sugere que, possivelmente, o tamanho da genitália masculina de *T. delpontei* possa estar relacionado com a incompatibilidade na cópula.

#### **c) Isolamento gamético**

Embora nunca analisado entre os triatomíneos, esse tipo de isolamento pré-zigótico pode ser o mecanismo que inviabiliza a produção de híbridos em diversos cruzamentos experimentais, como, por exemplo, entre *T. lenti* e *T. infestans* (CERQUEIRA, 1982) e entre *T. brasiliensis* e *T. petrocchiae* Pinto & Barreto, 1925 (ESPÍNOLA, 1971), pois, equivocadamente, quando os cruzamentos não resultam em híbridos (mesmo que em apenas uma das direções), é sugerido que a

incompatibilidade das genitálias tenha ocorrido entre os parentais, sem que a morfologia dos gametas ou, até mesmo, das genitálias seja analisada.

Já os mecanismos de isolamento pós-zigóticos (MAYR, 1963; DOBZHANSKY, 1970) analisados até o momento foram:

#### **a) Inviabilidade do híbrido**

Embora os mecanismos pré-zigóticos não tenham inviabilizado a produção de híbridos, nesse tipo de isolamento os híbridos que eclodem dos ovos têm viabilidade extremamente reduzida (baixo valor adaptativo), não chegando até a fase adulta da primeira geração híbrida (F1). Esse fenômeno evolutivo pode ser representado pelo cruzamento entre *T. mexicana* (Herrich-Schaeffer, 1848) e as seis espécies de *Meccus* Stål, 1859 (MARTÍNEZ-IBARRA et al., 2011). Essa inviabilidade dos híbridos apresentada para o cruzamento entre espécies de gêneros diferentes é extremamente importante do ponto de vista taxonômico, pois ressalta o *status* de cada gênero [o gênero *Meccus*, por exemplo, por muito tempo, foi considerado como *Triatoma* Laporte, 1832 (PINTO, 1927; HYPESA et al., 2002)].

#### **b) Esterilidade do híbrido**

Nesse caso, os híbridos em F1 chegam até a fase adulta, mas são incapazes de produzir a segunda geração híbrida (F2), pois são estéreis (disgenesia gonadal) ou produzem gametas inviáveis (resultantes de anomalias cromossômicas durante a espermatogênese), como acontece, por exemplo, para os híbridos resultantes entre o cruzamento experimental entre *T. infestans* e *T. rubrovaria* (Blanchard, 1843) (que apresentam ausência de pareamento ou pareamento trivalente entre os cromossomos homólogos) (PÉREZ et al., 2005), assim como para os híbridos do cruzamento entre *T. sordida* e *T. pseudomaculata* (SCHEREIBER et al., 1974) (que apresentaram espermátides e espermatozoides gigantes e anômalos).

#### **c) Desmoronamento do híbrido**

Esse tipo de isolamento pós-zigótico foi recentemente descrito para os triatomíneos e está relacionado com a inviabilidade híbrida a partir da F2, ressaltando a importância das análises da viabilidade híbrida até, pelo menos, a terceira geração (F3) antes de sugerir eventos de sinonimização entre espécies de

triatomíneos que não apresentaram isolamento reprodutivo. Mendonça et al. (2014) analisaram a espermatogênese de híbridos em F1 [resultantes do cruzamento experimental entre *T. lenti* e *T. sherlocki* Papa et al. (2002)] e observaram 100% de pareamento entre os cromossomos homeólogos. No entanto, quando os autores analisaram o grau de pareamentos em F2, observaram erros nos pareamentos de diversos cromossomos (univalentes), por incompatibilidade genética, o que resulta em gametas inviáveis (fenômeno confirmado pela taxa de eclosão dos ovos que resultariam em F3).

## 2. OBJETIVO GERAL

Analisar a relação evolutiva entre *T. melanocephala*, *T. vitticeps* e *T. tibiamaculata* com o subcomplexo *T. brasiliensis*, por meio de cruzamentos experimentais.

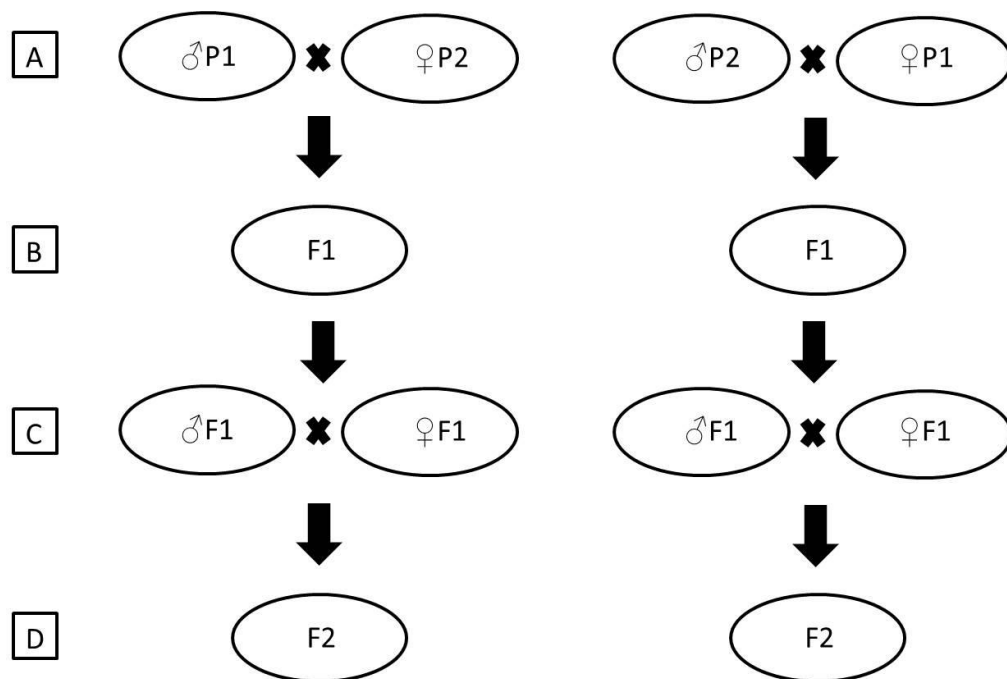
### 2.1 Objetivos específicos

- a. Realizar cruzamentos experimentais entre *T. melanocephala*, *T. vitticeps* e *T. tibiamaculata* com *T. brasiliensis*;
- b. Avaliar a dinâmica evolutiva dos cruzamentos experimentais, por meio da análise da cópula, da taxa de oviposição, da taxa de eclosão dos ovos e da viabilidade dos híbridos.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Insetário de Triatominae da FCFAR/UNESP, Araraquara que apresenta toda a infraestrutura e biossegurança necessária para a realização do projeto de pesquisa. Os cruzamentos experimentais interespecíficos entre *T. vitticeps*, *T. melanocephala* e *T. tibiamaculata* com *T. brasiliensis* foram realizados em ambas as direções (Figura 1) [assim como cruzamentos intraespecíficos também foram realizados entre os parentais e utilizados como parâmetro de comparação (grupo controle) (MARTINEZ-IBARRA et al., 2008)]. Para garantir que toda a prole fosse resultante do cruzamento experimental, foram utilizadas ninfas de quinto instar (N5) machos e fêmeas [caracterizadas de acordo com a metodologia de Rosa et al. (1992)] para ambas as espécies parentais (MARTÍNEZ-IBARRA et al., 2011), uma vez que os triatomíneos só atingem a maturidade sexual após a muda imaginal. Além disso, para garantir a viabilidade dos

cruzamentos e a efetividades dos resultados, pelo menos seis casais (sendo trez réplicas para cada direção) foram formados para cada teste de cruzamento experimental. Os casais foram mantidos separadamente em potes de plástico (5 cm de diâmetro, 10 cm de altura) com uma sanfona vertical de papelão (para maior movimentação e facilidade na alimentação desses insetos) (BELISÁRIO et al., 2007), em temperatura ambiente e foram alimentados semanalmente com sangue de pato, uma vez que as aves são refratárias ao *T. cruzi*.



**Figura 1.** Fluxograma representado os cruzamentos experimentais que foram realizados durante o experimento. A: Cruzamentos experimentais entre os parentais [*T. vitticeps* (P1) e *T. brasiliensis* (P2)/*T. melanocephala* (P1) e *T. brasiliensis* (P2)/*T. tibiamaculata* (P1) e *T. brasiliensis* (P2)], nas duas direções. B: Híbridos que poderiam ter eclodido dos cruzamentos experimentais (F1), caso não fossem detectadas barreiras reprodutivas pré-zigóticas. C: Cruzamentos experimentais que poderiam ser realizados entre os híbridos (F1) provenientes de cada geração, caso não fossem inviáveis (inviabilidade do híbrido) ou inférteis (esterilidade do híbrido). D: Segunda geração híbrida (F2) que poderia eclodir, caso não existisse barreira intraespecífica pré ou pós-zigótica instalado entre os cruzamentos realizados.

Os casais foram acompanhados rotineiramente para análise e possível fotodocumentação das cópulas, assim como realizado por Campos-Soto et al. (2016). Além disso, semanalmente os ovos foram coletados, contabilizados e separados em um novo pote de plástico para avaliar a taxa de eclosão. Após a eclosão das ninfas, o desenvolvimento (N1 até N5) e a taxa de mortalidade também foram acompanhados semanalmente (BELISÁRIO et al., 2007).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Artigo (submetido para publicação na revista internacional *Infection, Genetics and Evolution*)

**Isolamentos pré-zigótico confirma a exclusão de *Triatoma melanocephala*, *T. vitticeps* e *T. tibiamaculata* do subcomplexo *T. brasiliensis* (Hemiptera, Triatominae)**

**Prezygotic isolation confirms the exclusion of *Triatoma melanocephala*, *T. vitticeps* and *T. tibiamaculata* of the *T. brasiliensis* subcomplex (Hemiptera, Triatominae)**

João Marcos dos Santos Neves<sup>a</sup>, Paulo Sergio de Sousa<sup>b</sup>, Jader de Oliveira<sup>a</sup>, Amanda Ravazi<sup>b</sup>, Fernanda Fernandez Madeira<sup>c</sup>, Yago Visinho dos Reis<sup>b</sup>, Ana Beatriz Bortolozo de Oliveira<sup>c</sup>, Heloisa Pinotti<sup>a</sup>, Maria Tercília Vilela de Azeredo-Oliveira<sup>c</sup>, João Aristeu da Rosa<sup>a</sup>, Kaio Cesar Chaboli Alevi<sup>a,b\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Parasitologia, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, FCFAR/UNESP, Rodovia Araraquara-Jaú km 1, 14801-902, Araraquara, SP, Brasil.

<sup>b</sup> Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, IBB/UNESP, Rua Dr. Antônio Celso Wagner Zanin, 250, Distrito de Rubião Júnior, 18618-689, Botucatu, SP, Brasil.

° Laboratório de Biologia Celular, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, IBILCE/UNESP, Rua Cristóvão Colombo 2265, 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

### **Resumo**

A doença de Chagas é causada pelo *Trypanosoma cruzi* e transmitida principalmente pelos triatomíneos. *Triatoma* é um grupo parafilético e as espécies desse gênero são agrupadas em complexos e subcomplexos. Dados morfológicos e de distribuição geográfica agruparam inicialmente *T. melanocephala*, *T. vitticeps* e *T. tibiamaculata* no subcomplexo *T. brasiliensis*. Entretanto, análises cariotípicas e filogenéticas sugeriram a exclusão dessas espécies desse subcomplexo. Considerando que estudos sobre cruzamentos experimentais podem ajudar a entender a sistemática das espécies, nós realizamos cruzamentos experimentais entre *T. melanocephala*, *T. vitticeps* e *T. tibiamaculata* com *T. brasiliensis*. Nenhum cruzamento resultou em híbridos. Levando em consideração que as espécies do subcomplexo *T. brasiliensis* não apresenta barreiras pré-zigóticas interespecífica, a caracterização de barreira reprodutiva mostra que *T. melanocephala*, *T. vitticeps* e *T. tibiamaculata* não apresentam relação de proximidade evolutiva com as espécies desse subcomplexo. Assim, nós confirmamos a exclusão dessas espécies do subcomplexo *T. brasiliensis* e enfatizamos a importância de cruzamentos experimentais para estudos evolutivos.

### **Abstract**

Chagas disease is caused by the *Trypanosoma cruzi* and transmitted mainly by triatomines. *Triatoma* is a paraphyletic group and the species of this genus are grouped into complexes and subcomplexes. Morphological data and geographical distribution grouped initially *T. melanocephala*, *T. vitticeps* and *T. tibiamaculata* in the *T. brasiliensis* subcomplex. However, karyotypic and phylogenetic analysis suggested the exclusion of these species from this subcomplex. Considering that studies of experimental crosses can help to understand the systematics of species, we performed experimental crosses between *T. melanocephala*, *T. vitticeps* and *T. tibiamaculata* with *T. brasiliensis*. No crosses resulted in hybrids. Taking into account that the species of the *T. brasiliensis* subcomplex do not present interspecific

prezygotic barriers, the characterization of reproductive barriers shows that *T. melanocephala*, *T. vitticeps* and *T. tibiamaculata* do not present an evolutionary proximity relationship with the species of this subcomplex. Thus, we confirmed the exclusion of these species from the *T. brasiliensis* subcomplex and we emphasize the importance of experimental crosses for evolutionary studies.

**Palavras chaves:** Vetores de doença de Chagas; sistemática; isolamento reprodutivo.

**Key words:** Chagas disease vectors; systematics; reproductive isolation

### Short Communication

Chagas disease, also known as American trypanosomiasis, is a potentially life-threatening illness caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) (Kinetoplastida, Trypanosomatidae). It is still extremely prevalent in 21 Latin American countries, where it is mostly vector-borne. The main vector involved in the transmission of the parasite to humans is a triatomine bug, also known as a 'kissing bug'. An estimated 8 million people are infected worldwide, mostly in Latin America. In addition, it is also estimated that over 10 000 people die every year from clinical manifestations of Chagas disease, and more than 25 million people risk acquiring the disease (WHO, 2019).

Vector control remains the most useful method to prevent new chagasic patients (WHO, 2019). Currently were described 154 species of triatomines (151 living species and three fossils) assigned to 19 genera and five tribes (Oliveira and Alevi, 2017; Dorn et al., 2018; Oliveira et al., 2018; Lima-Cordón et al., 2019; Nascimento et al., 2019; Poinar, 2019). Although *Triatoma* Laporte, 1832 (Triatomini tribe), *Panstrongylus* Berg, 1879 (Triatomini tribe) and *Rhodnius* Stål, 1859 genus (Rhodniini tribe) are the most important genus from the epidemiological point of view (Justi et al., 2014), all the species are considered as potential Chagas disease vectors.

The *Triatoma* genus is a paraphyletic group (Justi et al., 2014). The species of this genus are grouped into complexes and subcomplexes (Lucena, 1970; Schofield and Galvão, 2009; Justi et al., 2014; Alevi et al., 2017). Although according to the International Code of Zoological Nomenclature (ICZN, 1999) the complex and

subcomplex are not valid groupings, they must represent natural groups, namely, monophyletic groups (Justi et al., 2014). Initially, the complexes and subcomplexes were proposed based only on geographic distribution (Lucena, 1970). Subsequently, with the use of morphological data (Lent and Wygodzinsky, 1979) and their association (Schofield and Galvão, 2009). Furthermore, with the application of genetic techniques (such as cytogenetic and molecular analysis), some groupings were reorganized because they did not represent natural groups (Alevi et al., 2012, 2017; Gardim et al., 2014; Justi et al., 2014; Pita et al., 2016)

Morphological data and geographical distribution grouped initially *T. melanocephala* Neiva and Pinto, 1923, *T. vitticeps* (Stål, 1859) and *T. tibiamaculata* (Pinto, 1926) in the *T. brasiliensis* subsubcomplex (Schofield and Galvão, 2009). With the availability of karyotypic data, it was suggested the exclusion of species from this subcomplex (Alevi et al., 2012), because they present chromosome numbers different from all Southern America *Triatoma* species. Phylogenetic analysis confirmed the exclusion of *T. melanocephala*, *T. vitticeps* and *T. tibiamaculata* from the *T. brasiliensis* subcomplex, since these species do not share common ancestry (Gardim et al., 2014).

From a systematic point of view, the degree of relatedness of species can be evaluated through the characterization of prezygotic or postzygotic reproductive barriers, i.e., evolutionarily more distant species have pre-zygotic barriers that prevent the formation of hybrids [as, for example, *T. brasiliensis* Neiva, 1911 x *T. sordida* (Stål, 1859) and *T. brasiliensis* x *T. infestans* (Klug, 1834) (Perlowagora-Szumlewics and Correia, 1972)], while evolutionarily closer species can produce hybrids that will be later unfeasible (hybrid breakdown) by postzygotic barriers such as hybrid inviability [as occurs between *T. mexicana* (Herrich-Schaeffer, 1848) x *Meccus* spp. (Martínez-Ibarra et al., 2011)], hybrid sterility [as occurs between *T. infestans* x *T. rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Pérez et al., 2005)], or hybrid collapse [as occurs between *T. lenti* Sherlock and Serafim, 1967 x *T. sherlocki* Papa, Jurberg, Carcavallo, Cerqueira and Barata, 2002 (Mendonça et al., 2014)]. Based on the above, we performed experimental crosses between *T. melanocephala*, *T. vitticeps* and *T. tibiamaculata* with *T. brasiliensis*, with systematic focus.

In order to evaluate the reproductive compatibility (Mayr, 1963) between *T. melanocephala*, *T. vitticeps* and *T. tibiamaculata* with *T. brasiliensis* subcomplex, reciprocal experimental crosses were conducted [as *T. brasiliensis* species



subcomplex show chromosomal homogeneity (Panzera et al., 2000; Alevi et al., 2013, 2014; Mendonça et al., 2016; Guerra et al., 2019), *T. brasiliensis* was selected for crosses] (Table 1). The experimental crosses were conducted in the Triatominae insectary of the School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University (UNESP), Araraquara, São Paulo, Brazil, in according to the experiments of Costa et al. (2003) and Mendonça et al. (2014): the insects were sexed as 5th instar nymphs, and males and females were kept separately until they reached the adult stage in order to guarantee the virginity of the insects used in the crosses. For the experimental crosses, three couples from each set were placed in plastic jars (diameter 5 cm × height 10 cm) and kept at room temperature. Furthermore, intraspecific crosses were also performed for group control (except for *T. tibiamaculata* because there were few specimens in the colony and we prioritized the experimental crosses) (Table 1). The eggs were collected weekly throughout the female's oviposition periods and the egg fertility rate was calculated (Table 1).

The crosses between *T. melanocephala*, *T. vitticeps* and *T. tibiamaculata* with *T. brasiliensis* did not result in hybrids (Table 1). The presence of prezygotic reproductive barriers shows that these species do not present an evolutionary proximity relationship, corroborating the cytogenetic (Alevi et al., 2012, 2014) and molecular data (Gardim et al., 2014) which demonstrate that these species should not be included in the *T. brasiliensis* subcomplex.

The species of the *T. brasiliensis* subcomplex [*T. brasiliensis*, *T. juazeirensis* Costa and Félix, 2007, *T. melanica* Neiva and Lent, 1941, *T. petrocchiae* Pinto and Barreto, 1925, *T. lenti* Sherlock and Serafim, 1967, *T. bahiensis* Sherlock and Serafim, 1967, *T. sherlocki* Papa et al., 2002, and the subspecies *T. b. macromelanosoma* Galvão, 1965] are not reproductively isolated [possibly by the relation of phylogenetic proximity of the species, since it is a monophyletic group (Oliveira et al., 2018)], being possible to obtain hybrids by experimental crosses in all directions (Costa et al., 2003; Correia et al., 2013; Mendonça et al., 2014, 2016). It is believed that postzygotic barriers, as the hybrid collapse, characterized for the crosses between *T. lenti* and *T. sherlocki* and *T. lenti* and *T. bahiensis* (Mendonça et al., 2014; Alevi et al., 2018), are responsible for hybrid breakdown of this subcomplex in the nature.

However, when the species of *T. brasiliensis* subcomplex were crossed with species of other subcomplexes that are phylogenetically distant (Justi et al., 2014,

2016), such as *T. sordida* and *T. infestans* (Perlowagora-Szumlewics and Correia, 1972), the eggs were infertile, confirming that *T. melanocephala*, *T. vitticeps* and *T. tibiamaculata* are not part of this subcomplex and should be regrouped [*T. melanocephala* and *T. vitticeps* were recently grouped into a new subcomplex called *T. vitticeps* (Alevi et al., 2017)].

Thus, we confirmed the exclusion of *T. melanocephala*, *T. vitticeps* and *T. tibiamaculata* from the *T. brasiliensis* subcomplex and we emphasize the importance of experimental crosses for evolutionary studies.

### **Acknowledgments**

This work was financed by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Process number 2019/01197-9), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

### **Ethical standards**

The experiments comply with the current laws of the country in which they were performed.

### **Conflict of interest**

The authors declare that they have no conflict of interest.

### **References**

- Alevi, K.C.C., Mendonça, P.P., Pereira, N.P., Guerra, A.L., Facina, C.H., Rosa, J.A., Azeredo-Oliveira, M.T.V., 2013. Distribution of constitutive heterochromatin in two species of triatomines: *Triatoma lenti* Sherlock and Serafim (1967) and *Triatoma sherlocki* Papa, Jurberg, Carcavallo, Cerqueira & Barata (2002). *Infect. Genet. Evol.* 13, 301–303. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.11.011>.
- Alevi, K.C.C., Mendonça, P.P., Succi, M., Pereira, N.P., Rosa, J.A., Azeredo-Oliveira, M.T.V., 2012. Karyotype of *Triatoma melanocephala* Neiva and Pinto (1923). Does this species fit in the *Brasiliensis* subcomplex? *Infect. Genet. Evol.* 12, 1652-1653. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.06.011>

- Alevi, K.C.C., Oliveira, J., Azeredo-Oliveira, M.T.V., Rosa, J.A., 2017. *Triatoma vitticeps* subcomplex (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae): a new grouping of Chagas disease vectors from South America. *Parasit. Vect.* 10, 180–186. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2129-1>.
- Alevi, K.C.C., Rosa, J.A., Azeredo-Oliveira, M.T.V., 2014. Cytotaxonomy of the *Brasiliensis* subcomplex and the *Triatoma brasiliensis* complex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Zootaxa.* 3838, 583–589. <http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.3838.5.7>.
- Correia, N., Almeida, C.E., Lima-Neiva, V., Gumiel, M., Lima, M.M., Medeiros, L.M.O., Mendonça, V.J., Rosa, J.A, Costa, J., 2013. Crossing experiments confirm *T. sherlocki* as a member of the *Triatoma brasiliensis* species complex. *Acta Trop.* 128,162-167.
- Costa, J., Almeida, C.E., Dujardin, J.P., Beard, C.B., 2003. Crossing Experiments Detect Genetic Incompatibility among Populations of *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Heteroptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 98, 637-639. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762003000500009>.
- Dorn, P.L., Justi, S.A., Dale, C., Stevens, L., Galvão, C., Lima-Cordón, R., Monrot, C., 2018. Description of *Triatoma mopan* sp. n. from a cave in Belize (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *ZooKeys;* 775, 69–95. <https://zookeys.pensoft.net/articles.php?id=22553>.
- Gardim, S., Almeida, C.E., Takiya, D.M., Oliveira, J., Araújo, R.F., Cicarelli, R.M.B., Rosa, J.A., 2014. Multiple mitochondrial genes of some sylvatic Brazilian *Triatoma*: non-monophyly of the *T. brasiliensis* subcomplex and the need for a generic revision in the Triatomini. *Infect. Genet. Evol.* 23, 74-79. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.01.024>.
- Guerra, A.L., Borsatto, K.C., Teixeira, N.P.D., Madeira, F.F., Oliveira, J., Rosa, J.A., Azeredo-Oliveira, M.T.V., Alevi, K.C.C., 2019. Revisiting the Homoploid Hybrid Speciation Process of the *Triatoma brasiliensis macromelasoma* Galvão, 1956 (Hemiptera, Triatominae) Using Cytogenetic and Molecular Markers. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 4, 911–913. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0813>.
- ICNZ (The International Code of Zoological Nomenclature), 1999. The International Code of Zoological Nomenclature. <https://www.iczn.org/> (accessed 17 August 2019).

- Justi, S.A., Galvao, C., Schrago, C.G., 2016. Geological changes of the Americas and their influence on the diversification of the Neotropical kissing bugs (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). PLoS Negl. Trop. Dis. 10: e0004527.
- Justi, S.A., Russo, C.A.M., Mallet, J.R.S., Obara, M.T., Galvão, C., 2014. Molecular phylogeny of Triatomini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Parasit. Vect. 7, 149. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-149>.
- Lent, H., Wygodzinsky, P. 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) and their significance as vector of Chagas's disease. Bull. Am. Mus. Nat. Hist. 163, 123–520.
- Lima-Cordón, R.A., Monroy, M.C., Stevens, L., Rodas, A., Rodas, G.A., Dorn, P.L., Justi, S.A., 2019. Description of *Triatoma huehuetenanguensis* sp. n., a potential Chagas disease vector (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). ZooKeys. 820, 51–70. <https://doi.org/10.3897/zookeys.820.27258>.
- Lucena, D.T., 1970. Estudos sobre a doença de Chagas no Brasil. Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop. 22, 3–173.
- Martínez-Ibarra, J.A., Grant-Guillén, Y., Delgadillo-Aceves, I.N., Zumaya-Estrada, F.A., Rocha-Chávez, G., Salazarschettino, P.M., Alejandre-Aguilar, R., Villalobos, G., Noguera-Torres, B., 2011. Biological and genetic aspects of crosses between phylogenetically close species of Mexican Triatomines (Hemiptera: Reduviidae). J. Med. Entomol. 48, 705-707. <https://doi.org/10.1603/ME10159>.
- Mayr, E., 1963. Animal Species and Evolution. Harvard University Press, Cambridge.
- Mendonça, V.J., Alevi, K.C.C., Medeiros, L.M.O., Nascimento, J.D., Azeredo-Oliveira, M.T.V., Rosa, J.A., 2014. Cytogenetic and morphologic approaches of hybrids from experimental crosses between *Triatoma lenti* Sherlock & Serafim, 1967 and *T. sherlocki* Papa et al., 2002 (Hemiptera: Reduviidae). Infect. Genet. Evol. 26, 123-131. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.05.015>.
- Mendonça, V.J., Alevi, K.C.C., Pinotti, H., Gurgel-Gonçalves, R., Pita, S., Guerra, A.L., Panzera, F., Araújo, R.F., Azeredo-Oliveira, M.T.V., Rosa, J.A., 2016. Revalidation of *Triatoma bahiensis* Sherlock & Serafim, 1967 (Hemiptera: Reduviidae) and phylogeny of the *T. brasiliensis* species complex. Zootaxa. 4107, 239–254. <http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.4107.2.6>.
- Nascimento, J.D., Ravazi, A., Alevi, K.C.C., Pardo-Diaz, C., Salgado-Roa, F.C., da Rosa, J.A., de Azeredo Oliveira, M.T.V., de Oliveira, J., Hernández, C., Salazar, C., Ramírez, J.D., 2019. Taxonomical over splitting in the *Rhodnius prolixus* (Insecta:

Hemiptera: Reduviidae) clade: Are *R. taquarussuensis* (da Rosa et al., 2017) and *R. neglectus* (Lent, 1954) the same species? PLoS One. 14, e0211285. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211285>.

Oliveira, J., Alevi, K.C.C., 2017. Taxonomic status of *Panstrongylus herreri* Wygodzinsky, 1948 and the number of Chagas disease vectors. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 50, 434–435. <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0125-2017>.

Oliveira, J., Ayala, J.M., Justi, S.A., Rosa, J.A., Galvão, C., 2018. Description of a new species of *Nesotriatoma* Usinger, 1944 from Cuba and revalidation of synonymy between *Nesotriatoma bruneri* (Usinger, 1944) and *N. flavida* (Neiva, 1911) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). J. Vector Ecol. 43, 148–157. <https://doi.org/10.1111/jvec.12294>.

Oliveira, J., Marcer, P.L., Takiya, D.M., Mendonça, V.J., Belintani, T., Barges, M.D., Mateo, L., Chagas, V., Folly-Ramos, E., Cordeiro-Estrela, P., Gurgel-Gonçalves, R., Costa, J., Rosa, J.A., Almeida, C.E., 2017. Combined phylogenetic and morphometric information to delimit and unify the *Triatoma brasiliensis* species complex and the Brasiliensis subcomplex. Acta Trop. 170, 140–148. <http://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.02.020>.

Panzer, F., Pérez, R., Nicolini, P., Hornos, P., Costa, J., Borges, E., Diotaiuti, L., Schofield, J., 2000. Chromosome homogeneity in populations of *Triatoma brasiliensis* Neiva 1911 (Hemiptera–Reduviidae–Triatominae). Cad. Saúde Pública. 16, 83–88. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2000000800009>.

Pérez, R., Hernández, M., Quintero, O., Scvortzoff, E., Canale, D., Méndez, L., Cohanoff, C., Martino, M., Panzer, F., 2005. Cytogenetic analysis of experimental hybrids in species of Triatominae (Hemiptera-Reduviidae). Genetica. 125, 261-270. <https://doi.org/10.1007/s10709-005-0369-z>.

Perlowagora-Szumlewics, A., Correia, M.V., 1972. Induction of male sterility manipulation of genetic mechanisms present in vector species of Chagas disease (remarks on integrating sterile-male release with insecticidal control measures against vectors of Chagas disease). Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 14, 360-371.

Pita, S., Lorite, P., Nattero, J., Galvão, C., Alevi, K.C.C., Teves, S.C., Azeredo-Oliveira, M.T.V., Panzer, F., 2016. New arrangements on several species subcomplexes of *Triatoma* genus based on the chromosomal position of ribosomal genes (Hemiptera: Triatominae). Infect. Genet. Evol. 43, 225-231. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.05.028>.

Poinar, G, 2019. A primitive triatomine bug, *Paleotriatoma metaxytaxa* gen. et sp. nov. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), in mid-Cretaceous amber from northern Myanmar. *Cretaceous Res.* 93, 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.cretres.2018.09.004>.

Schofield, C.J., Galvão, C., 2009. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Trop.* 110, 88–100. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.01.010>.

WHO, 2019. Chagas disease (American trypanosomiasis). World Health Organization. Disponível em <<https://www.who.int/chagas/disease/en/>>. Acesso em 11 de dezembro de 2019.

**Table 1.** Intraspecific (control group) and interspecific experimental crosses performed between *T. melanocephala*, *T. vitticeps*, *T. tibiamaculata* and *T. brasiliensis*.

Experimental crosses	Number of eggs				Egg Fertility
	C1	C2	C3	Total	
<i>T. brasiliensis</i> ♀ x <i>T. vitticeps</i> ♂	28	32	30	90	0%
<i>T. vitticeps</i> ♀ x <i>T. brasiliensis</i> ♂	84	40	23	147	0%
<i>T. brasiliensis</i> ♀ x <i>T. melanocephala</i> ♂	19	21	23	63	0%
<i>T. melanocephala</i> ♀ x <i>T. brasiliensis</i> ♂	28	24	26	78	0%
<i>T. brasiliensis</i> ♀ x <i>T. tibiamaculata</i> ♂	123	34	36	193	0%
<i>T. tibiamaculata</i> ♀ x <i>T. brasiliensis</i> ♂	25	08	27	60	0%
Control experiments	C1	C2	C3	Total	
<i>T. brasiliensis</i> ♀ x <i>T. brasiliensis</i> ♂	79	192	-	271	59%
<i>T. melanocephala</i> ♀ x <i>T. melanocephala</i> ♂	60	51	191	302	63%
<i>T. vitticeps</i> ♀ x <i>T. vitticeps</i> ♂	39	172	142	353	70%

## 5. CONCLUSÃO

Com base na caracterização de barreiras pré-zigóticas instaladas entre *T. melanocephala*, *T. vitticeps* e *T. tibiamaculata* quando cruzados com um membro do subcomplexo *T. brasiliensis* (*T. brasiliensis*) e, levando em consideração que as espécies agrupadas nesse subcomplexo não apresentam barreiras pré-zigóticas (COSTA et al., 2003; CORREIA et al., 2013; MENDONÇA et al., 2014, 2016), pode-se concluir que *T. melanocephala*, *T. vitticeps* e *T. tibiamaculata* não apresentam

relação evolutiva e, conseqüentemente, não fazem parte do subcomplexo *T. brasiliensis*.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABALOS JW, 1948. Sobre híbridos naturales y experimentales de *Triatoma*. Anais do Instituto Regional 2: 209-223.
- ABALOS JW, WYGODZINSKY P 1951. Las Triatominae argentinas. Monographia Inst. Med. Reg. Tucuman 1: 1-178.
- ALEVI KCC, MENDONÇA PP, SUCI M, PEREIRA NP, ROSA JA, AZEREDO-OLIVEIRA MTV, 2012. Karyotype and spermatogenesis in *Triatoma melanocephala* Neiva and Pinto (1923). Does this species fit in the Brasiliensis subcomplex? Infection, Genetics and Evolution 12: 1652-1653.
- ALEVI KCC, OLIVEIRA J, AZEREDO-OLIVEIRA MTV, ROSA JA, 2017. *Triatoma vitticeps* subcomplex (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae): a new grouping of Chagas disease vectors from South America. Parasites & Vectors 10: 180.
- ALEVI KCC, PINOTTI H, ARAÚJO RF, AZEREDO-OLIVEIRA MTV, ROSA JA, MENDONÇA VJ, 2018. Hybrid collapse confirm the specific status of *Triatoma bahiensis* Sherlock and Serafim, 1967 (Hemiptera, Triatominae). The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 98: 475-477.
- ALEVI KCC, ROSA JA, AZEREDO-OLIVEIRA MTV, 2014. Cytotaxonomy of the Brasiliensis subcomplex and the *Triatoma brasiliensis* complex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Zootaxa. 3838: 583-589.
- BARRETTO MP, 1976. Ecologia de triatomíneos e transmissão do *Trypanosoma cruzi*, com especial referência ao Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 6: 339-353.
- BELISÁRIO CJ, D'ÁVILA PESSOA GC, DIOTAIUTI L, 2007. Biological aspects of crosses between *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) and *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964 (Hemiptera: Reduviidae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 102: 517-521.
- CAMPOS-SOTO R, PANZERA F, PITA S, LAGES C, SOLARI A, BOTTO-MAHAN, 2016. Experimental crosses between *Mepraia gajardoi* and *M. spinolai* and hybrid chromosome analyses reveal the occurrence of several isolation mechanisms. Infection, Genetics and Evolution 45: 205-212.

- CERQUEIRA RL, 1982. Estudos sobre populações de triatomíneos silvestres encontrado em Santo Inácio – Bahia. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 68p.
- CORREIA N, ALMEIDA CE, LIMA-NEIVA V, GUMIEL M, LIMA MM, MEDEIROS LMO, MENDONÇA VJ, ROSA JA, COSTA J, 2013. Crossing experiments confirm *T. sherlocki* as a member of the *Triatoma brasiliensis* species complex. *Acta Tropica* 128:162-167.
- COSTA J, ALMEIDA CE, DUJARDIN JP, BEARD CB, 2003. Crossing Experiments Detect Genetic Incompatibility among Populations of *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98: 637-639.
- DEWEY, D.R. Genomic and phylogenetic relationships among North American perennial Triticeae. In: ESTES, J.R., TYRL, R.J., BRUNKEN, J.N. (eds) *Grasses and Grasslands: Systematics and Ecology*. University of Oklahoma Press, Norman, pp 51-88, 1982.
- DOBZHANSKY T, 1970, *Genetics of the Evolutionary Process* (New York: Columbia University Press), pp. 71-93.
- DORN PL, JUSTI SA, DALE C, STEVENS L, GALVÃO C, CORDON RL, MONROY C, 2018. Description of *Triatoma mopan* sp. n. (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) from a cave in Belize. *Zookeys* 775, 69-95.
- ESPÍNOLA HN, 1971. Reproductive isolation between *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 and *Triatoma petrochii* Pinto & Barretto, 1925 (Hemiptera Reduviidae). *Revista Brasileira de Biologia*, 31 : 277-281.
- GALVÃO C, 2014. *Vetores da doença de chagas no Brasil*. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia.
- GARDIM S, ALMEIDA CE, TAKIYA DM, OLIVEIRA J, ARAÚJO RF, CICARELLI RMB, ROSA JA, 2014. Multiple mitochondrial genes of some sylvatic Brazilian *Triatoma*: non-monophyly of the *T. brasiliensis* subcomplex and the need for a generic revision in the Triatomini. *Infection, Genetics and Evolution* 23: 74-79.
- HYPSA V, TIETZ D, ZRZAVY J, REGO RO, GALVÃO C, JURBERG J, 2002. Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the asiatic clade. *Molecular Phylogenetic and Evolution* 23: 447-457.



- INTERNATIONAL CODE ON ZOOLOGICAL NOMENCLATURE (ICNZ), 1999.  
Disponível em: <http://www.nhm.ac.uk/hosted-sites/iczn/code/>, data de acesso: 05 de outubro de 2018.
- JUSTI SA, RUSSO CAM, MALLET JRS, OBARA MT, GALVÃO C, 2014. Molecular phylogeny of Triatomini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Parasites & Vectors* 7: 149.
- LIMA-CORDÓN RA, MONROY MC, STEVENS L, RODAS A, RODAS GA, DORNI PL, JUSTI SA, 2019. Description of *Triatoma huehuetenanguensis* sp. n., a potential Chagas disease vector (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Zookeys*, 820: 51-70.
- MARTÍNEZ-IBARRA J A, LV VENTURA-RODRÍGUEZ, K MEILLON-ISAIS, H BARAJAS-MARTÍNEZ, R ALEJANDRE-AGUILAR, P LUPERCIOCORONEL, G ROCHA-CHÁVEZ, B NOGUEDA-TORRES, 2008. Biological and genetic aspects of experimental hybrids from species of the *Phyllosoma* complex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 103: 236-243.
- MARTÍNEZ-IBARRA JA, Y GRANT-GUILLÉN, IN DELGADILLO-ACEVES, FA ZUMAYA-ESTRADA, G ROCHA-CHÁVEZ, PM SALAZARSCHETTINO, R ALEJANDRE-AGUILAR, G VILLALOBOS, B NOGUEDA-TORRES, 2011. Biological and genetic aspects of crosses between phylogenetically close species of Mexican Triatomines (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Medical Entomology* 48: 705-707.
- MAYR E, 1963. *Animal Species and Evolution*. Harvard University Press, Cambridge.
- MENDONÇA VJ, ALEVI KCC, MEDEIROS LMO, NASCIMENTO JD, AZEREDO-OLIVEIRA MTV, ROSA JA, 2014. Cytogenetic and morphologic approaches of hybrids from experimental crosses between *Triatoma lenti* Sherlock & Serafim, 1967 and *T. sherlocki* Papa et al., 2002 (Hemiptera: Reduviidae). *Infection, Genetics and Evolution* 26: 123-131.
- MENDONÇA VJ, ALEVI KCC, PINOTTI H, GURGEL-GONGALVES R, PITA S, GUERRA AL, PANZERA F, ARAÚJO RF, AZEREDO-OLIVEIRA MTV, ROSA JA, 2016. Revalidation of *Triatoma bahiensis* Sherlock & Serafim, 1967 (Hemiptera: Reduviidae) and phylogeny of the *T. brasiliensis* species complex. *Zootaxa* 4107: 239-254.

- NASCIMENTO JD, DA ROSA JA, SALGADO-ROA FC, HERNÁNDEZ C, PARDO-DIAZ C, ALEVI KCC, et al. (2019) Taxonomical over splitting in the *Rhodnius prolixus* (Insecta: Hemiptera: Reduviidae) clade: Are *R. taquarussuensis* (da Rosa et al., 2017) and *R. neglectus* (Lent, 1954) the same species? PLoS ONE 14(2): e0211285.
- OLIVEIRA J, ALEVI KCC, 2017. Taxonomic status of *Panstrongylus herreri* Wygodzinsky, 1948 and the number of Chagas disease vectors. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 50: 434-435.
- OLIVEIRA J, AYALA JM, JUSTI SA, ROSA JA, GALVÃO C, 2018. Description of a new species of *Nesotriatoma* Usinger, 1944 from Cuba and revalidation of synonymy between *Nesotriatoma bruneri* (Usinger, 1944) and *N. flavida* (Neiva, 1911) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Journal of Vector Ecology 43: 148-157.
- OLIVEIRA J, MARCER PL, TAKIYA DM, MENDONÇA VJ, BELINTANI T, BARGUES MD, MATEO L, CHAGAS V, FOLLY-RAMOS E, CORDEIRO-ESTRELA P, GURGEL-GONÇALVES R, COSTA J, ROSA JA, ALMEIDA CE, 2017. Combined phylogenetic and morphometric information to delimit and unify the *Triatoma brasiliensis* species complex and the *Brasiliensis* subcomplex. Acta Tropica 170: 140–148.
- PÉREZ R, HERNÁNDEZ M, QUINTERO O, SCVORTZOFF E, CANALE D, MÉNDEZ L, COHANOFF C, MARTINO M, PANZERA F, 2005. Cytogenetic analysis of experimental hybrids in species of Triatominae (Hemiptera-Reduviidae). Genetica 125: 261-270.
- PERLOWAGORA-SZUMLEWICS A, CORREIA MV, 1972. Induction of male sterility manipulation of genetic mechanisms present in vector species of Chagas disease (remarks on integrating sterile-male release with insecticidal control measures against vectors of Chagas disease). Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 14: 360-371.
- PINTO C, 1927. Classification de genres d'hémiptères de la famille Triatomidae (Reduvidioidea). Boletim Biológico 8: 103-114.
- PITA S, LORITE P, NATTERO J, GALVÃO C, ALEVI KCC, TEVES SC, AZEREDO-OLIVEIRA MTV, PANZERA F, 2016. New arrangements on several species subcomplexes of *Triatoma* genus based on the chromosomal position of

- ribosomal genes (Hemiptera: Triatominae). *Infection, Genetics and Evolution* 43: 225-231.
- POINAR G, 2019. A primitive triatomine bug, *Paleotriatoma metaxytaxa* gen. et sp. nov. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), in mid-Cretaceous amber from northern Myanmar. *Cretaceous Research* 93: 90-97.
- RILEY R, 1966. The secondary pairing of bivalents with genetically similar chromosomes. *Nature* 185: 751-752.
- ROSA JA, BARATA JMS, BARELLI N, SANTOS JLF, BELDA NETO FM, 1992. Sexual distinction between 5th instar nymphs of six species (Hemiptera: Reduviidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 87: 257-264.
- SCHEREIBER G, PINHO AC, PARENTONI R, SALGADO AA, GODOI JR. TL, 1974. Cytogenetics of Triatominae: II Spermatogenesis in hybrid between *Triatoma infestans* and *Triatoma pseudomaculata* (Hemiptera, Reduviidae). *Revista Brasileira de Biologia* 31: 1-9.
- SCHOFIELD, C. J., GALVÃO, C, 2009. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta tropica* 110: 88-100.
- USINGER RL, WYGODZINSKY RYCKMAN ER, 1966. The Biosystematics of Triatominae. *Annual Review of Entomology* 11: 309-329.
- WHO - World Health Organization, 2018. *Weekly Epidemiological Record* 90: 33-44.