



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Fernanda Fernandez Madeira

Microevolução de *Triatoma sordida* (Stål, 1859) (Hemiptera, Triatominae)

São José do Rio Preto
2021

Fernanda Fernandez Madeira

Microevolução de *Triatoma sordida* (Stål, 1859) (Hemiptera, Triatominae)

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira

Coorientadores: Prof^a. Dr^a. Ana Letícia Guerra

Prof. Dr. Kaio Cesar Chaboli Alevi

São José do Rio Preto
2021

M181m Madeira, Fernanda Fernandez
Microevolução de *Triatoma sordida* (Stål, 1859) (Hemiptera, Triatominae)
/Fernanda Fernandez Madeira. -- São José do Rio Preto, 2021
180 f. : il., tabs., fotos, mapas

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de
Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto
Orientadora: Maria Tercília Vilela Azeredo Oliveira
Coorientador: Kaio Cesar Chaboli Alevi

1. *Triatoma sordida*. 2. Especiação Críptica. 3. Genética de populações. 4.
Cruzamentos experimentais. 5. Taxonomia integrativa. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências
Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Fernanda Fernandez Madeira

Microevolução de *Triatoma sordida* (Stål, 1859) (Hemiptera, Triatominae)

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dr^a. Lilian Castiglioni
FAMERP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Luís Lênin Vicente Pereira
UNIJALES - Jales

Prof. Dr. Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti
UFAC – Câmpus de Rio Branco

Prof. Dr. Carlos Eduardo Almeida
UFBA – Câmpus de Ondina

São José do Rio Preto
27 de agosto de 2021

Dedico o presente trabalho aos meus pais Sheila e Francisco, à minha vó Nadyr, e ao meu marido Renan. Aos meus pais, por tenho o privilégio de ainda tê-los em minha vida após uma breve, mas dura batalha contra a COVID-19. À minha vó, por sempre ter tido orgulho dos vários anos que passei em uma universidade estadual. E ao meu marido, por sempre me apoiar em cada decisão, por comemorar cada pequeno passo, cada artigo científico publicado, e por sempre se interessar por tudo que eu tento explicar sobre o que foi esse trabalho de doutorado. Cada vitória que eu conquisto na vida é graças a todos vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida e pelas oportunidades concedidas nesta encarnação. Obrigada pelos Teus planos para a minha vida sempre serem maiores do que os meus sonhos!

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira, pelo acolhimento, conhecimentos compartilhados e por todas as oportunidades de crescer em minha vida acadêmica. Agradeço pela confiança de sempre e por toda a colaboração envolvida na realização desse trabalho.

Aos meus preciosos co-orientadores, Dr^a. Ana Letícia Guerra e Prof. Dr. Kaio Cesar Chaboli Alevi, por toda orientação e auxílio prestados. À Ana Letícia, querida amiga, que me introduziu ao mundo molecular dos triatomíneos e por ser a grande responsável pelo meu conhecimento no assunto. E, principalmente, ao Kaio, um pesquisador impecável e brilhante, que sempre me ajudou de todas as formas possíveis ao longo da minha trajetória acadêmica desde que entrei no laboratório. Você é uma inspiração para qualquer profissional. A finalização desse trabalho só foi possível graças a vocês.

Aos membros da banca examinadora de defesa, Prof^{ra}. Dr^a. Lilian Castiglioni, Prof. Dr. Luís LÊNIN Vicente Pereira, Prof. Dr. Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti e Prof. Dr. Carlos Eduardo Almeida, por aceitarem o convite e se disponibilizarem para avaliar, contribuir e enriquecer ainda mais a versão final desse trabalho.

Ao Prof. Dr. João Aristeu da Rosa, pela recepção carinhosa de sempre e pela disponibilização do Insetário de Triatominae, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCFAR) da UNESP – Câmpus de Araraquara, permitindo assim a realização e o acompanhamento dos cruzamentos experimentais. Agradeço também ao querido Prof. Dr. Jader de Oliveira, pelos dias de trabalho leves e descontraídos no insetário e pelos auxílios de toda natureza prestados ao longo do presente trabalho.

Aos integrantes atuais e antigos do Laboratório de Biologia Celular, em especial, agradeço aos queridos colegas Amanda, Ana Beatriz, Ana Letícia, Giovana, Isadora, Luiza, Nathália, Kaio e Yago. Obrigada pela convivência, pelo apoio de toda natureza e pela possibilidade de crescimento pessoal e profissional. Agradeço também à equipe híbridos (Amanda, Bia, Kaio, Jader e Yago), um time composto de pessoas muito especiais e competentes, que sempre trazem muitas risadas, guinchos e momentos de descontração nas viagens para o insetário de Araquara. O trabalho, quando realizado dessa maneira, é tão prazeroso, que não me importaria de continuar cuidando dos cruzamentos experimentais até os 15 anos do Otto. Sem vocês os desafios desse trabalho seriam muito mais difíceis de resolver. Muito obrigada amigos!

Aos meus amigos de graduação e da vida, Denise, Daniele, Jacqueline e Natan, sempre juntos desde o primeiro ano e sempre unidos (e desunidos) em grupos de seminários e trabalhos. Obrigada por tornar essa parte da minha trajetória acadêmica mais leve e significativa. Saibam que, com certeza, vocês foram e continuarão sendo parte importante da minha vida.

Ao IBILCE/UNESP pelo espaço físico, estrutura e todo apoio que proporciona o desenvolvimento de nossas pesquisas. Mais do que isso, agradeço à essa instituição por todas as experiências que pude viver ao longo dos últimos dez anos, e também pela oportunidade de conhecer pessoas incríveis e de construir lembranças muito especiais.

Aos professores do curso de graduação em Ciências Biológicas e do Programa de Pós-Graduação em Biociências do IBILCE/UNESP, que contribuíram direta ou indiretamente para minha formação; aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, por todos os serviços e auxílios prestados, pelo profissionalismo e pela paciência de sempre.

*À toda a minha família, pelo carinho e amor incondicional. Aos meus pais, Sheila e Francisco, por serem o motivo de eu querer ser um ser humano melhor a cada dia, por sempre me apoiarem em todas as decisões e por se orgulharem sempre do que me tornei. Aos meus avós paternos Carmina (**in memorian**) e Antônio (**in memorian**), e avós maternos Diego (**in memorian**) e Nadyr. Obrigada a cada um de vocês por tantos momentos e pelos ensinamentos que me proporcionaram a vontade de poder dar o meu melhor, de ser o meu melhor (e mesmo de deixar o melhor na hora do adeus).*

Aos meus “filhos peludinhos”, Meg, Clarinha e Bento, por trazerem a felicidade e o amor mais sincero ao meu cotidiano e por manter a minha sanidade mental.

Ao meu marido Renan. Me falta vocabulário para dizer o quanto eu te amo. Amigo, namorado, marido, pai de shih-tzu e futuro pai dos meus filhos. A cada ano que passa, mais títulos ele acumula. Morro de orgulho da nossa história e de tudo que conquistamos até aqui. Já fizemos muito, temos muito mais ainda a fazer. Ser sua companheira é um privilégio do qual eu nunca quero abrir mão.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse momento e para o meu crescimento profissional e pessoal, o meu mais sincero muito obrigada!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Eu sou parte de uma equipe. Então, quando venço, não sou eu apenas quem vence. De certa forma, termino o trabalho de um grupo enorme de pessoas”. (Ayrton Senna)

“O que temos, nós deixamos.

O que somos, nós levamos.”

(Divaldo Pereira Franco)

RESUMO

Triatoma sordida (Stål, 1859) é considerado, atualmente, o vetor da doença de Chagas mais frequentemente capturado no ambiente peridomiciliar no Brasil. Além da sua ampla distribuição geográfica nacional, incluindo 14 estados brasileiros, esta espécie também foi relatada em outros países da América do Sul, como Argentina, Bolívia, Paraguai e Uruguai. Diversos estudos sinalizam polimorfismos em *T. sordida*, o que levou a sugestão do fenômeno de especiação críptica nessa espécie e, principalmente, a recente caracterização de três possíveis táxons diferentes, a saber, *T. sordida sensu stricto*, *T. sordida* Argentina e *T. sordida* La Paz. Dessa forma, diante da necessidade de se expandir o conhecimento acerca da questão taxonômica de *T. sordida*, o presente estudo teve como objetivo realizar uma análise integrada de aspectos evolutivos dessa espécie, com ênfase no fenômeno de especiação críptica, por meio da caracterização das populações brasileiras por parâmetros moleculares e citogenéticos, além de análises envolvendo sistemática filogenética, taxonomia integrativa e a realização de cruzamentos experimentais intraespecíficos entre exemplares de *T. sordida* do Brasil, Argentina e Bolívia. Por meio das análises envolvendo marcadores citogenéticos e moleculares, foi verificada a baixa diversidade genética das populações brasileiras de *T. sordida*, evidenciada pelos seguintes fatores: mesmo padrão de bandamento C e CMA3/DAPI, baixa diversidade nucleotídica, alta diversidade haplotípica, baixa distância genética entre todas as localidades analisadas, alto valor do índice F_{st} , e a formação de um clado monofilético das populações brasileiras amostradas e separado de espécimes da Argentina, suportando que todos os espécimes brasileiros podem ser agrupados como *T. sordida sensu stricto*. Com base nas análises de taxonomia integrativa (análises morfológicas, morfométricas, moleculares e cruzamentos experimentais), também demonstramos que o citótipo *T. sordida* da Argentina é uma nova espécie, confirmando o *status* específico de *T. rosai* sp. nov. Além disso, baseando-se na baixa distância genética entre *T. sordida sensu stricto* e *T. sordida* La Paz, associada à ausência de barreiras reprodutivas pré-zigóticas e pós-zigóticas, ausência de disgenesia gonadal e de erros de pareamentos cromossômicos dos híbridos F1 e F2 resultantes, sugerimos que o citótipo *T. sordida* La Paz representa apenas um polimorfismo cromossômico de *T. sordida sensu stricto*.

Palavras-chave: *Triatoma sordida*. Especiação críptica. Genética de populações. Cruzamentos experimentais. Taxonomia integrativa.

ABSTRACT

Triatoma sordida (Stål, 1859) is currently considered the vector of Chagas disease most frequently captured in peridomestic environment in Brazil. In addition to its wide national geographic distribution, including 14 Brazilian states, this species has also been reported in other countries in South America, such as Argentina, Bolivia, Paraguay and Uruguay. Several studies indicate polymorphisms in *T. sordida*, which led to the suggestion of the phenomenon of cryptic speciation in this species and, mainly, the recent characterization of three possible different taxa, namely, *T. sordida sensu stricto*, *T. sordida Argentina* and *T. sordida La Paz*. Thus, in view of the need to expand knowledge about the taxonomic issue of *T. sordida*, the present study aimed to carry out an integrated analysis of evolutionary aspects of this species, with emphasis on the phenomenon of cryptic speciation, through the characterization of Brazilian populations by molecular and cytogenetic parameters, in addition to analyzes involving phylogenetic systematics, integrative taxonomy and the performance of intraspecific experimental crosses between specimens of *T. sordida* from Brazil, Argentina and Bolivia. Through analyzes involving cytogenetic and molecular markers, the low genetic diversity of the Brazilian populations of *T. sordida* was verified, evidenced by the following factors: same pattern of C- and CMA3/DAPI-banding, low nucleotide diversity, high haplotypic diversity, low genetic distance between all the locations analysed, high value of the F_{st} index, and the formation of a monophyletic clade of the Brazilian populations sampled and separated from specimens from Argentina. Therefore, we support that all Brazilian specimens can be grouped as *T. sordida sensu stricto*. Based on integrative taxonomy analyzes (morphological, morphometric, molecular analyzes and experimental crosses), we also demonstrated that the cytotype *T. sordida* from Argentina is a new species, confirming the specific status of *T. rosai* sp. nov. Furthermore, based on the low genetic distance between *T. sordida sensu stricto* and *T. sordida* La Paz, associated with the absence of pre-zygotic and post-zygotic reproductive barriers, absence of gonadal dysgenesis and of chromosomal pairing errors of the F1 and F2 resulting, we suggest that the cytotype *T. sordida* La Paz represents only a chromosomal polymorphism of *T. sordida sensu stricto*.

Keywords: *Triatoma sordida*. Cryptic speciation. Population genetics. Experimental crosses. Integrative taxonomy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida da espécie <i>T. carrioni</i>	31
Figura 2. Exemplo de triatomíneo (<i>Triatoma sordida</i>) defecando (A, seta) e urinando (B, seta) durante o repasto sanguíneo.	31
Figura 3. Holótipo de <i>Triatoma sordida</i> descrito por Stål, em 1859, e depositado no Zoologisches Museum, Berlim, Alemanha.	33
Figura 4. Espécime de <i>Triatoma sordida</i> e sua disposição geográfica no Brasil.	33
Figura 5. Ocupação espacial e nicho ecológico das espécies <i>T. sordida</i> e <i>T. infestans</i>	35
Figura 6. Padrão de heterocromatina (A, C e E) e marcação das sondas DNAr 45S (B, D e F - setas) em <i>T. sordida sensu stricto</i> (A, B), <i>T. sordida</i> Argentina (C, D) e <i>T. sordida</i> La Paz (E, F).	37
Figura 7. Árvore filogenética obtida por Máxima Verossimilhança dos citótipos de <i>T. sordida</i> , com base no gene mitocondrial COI.	37
Figura 8. Esquema do complexo gênico nuclear de DNA ribossomal, com os genes das subunidades do DNAr 18S, 28S e 5.8S, além dos espaços internos transcritos (ITS-1 e ITS-2).	41
Figura 9. Morfologia geral de um barbeiro, com pronoto e escutelo em detalhes.	63
Figura 10. Morfologia de <i>Triatoma rubrofasciata</i>	63
Figura 11. Exemplo de recipientes em que os cruzamentos experimentais foram realizados.	67

LISTA DE FIGURAS – CAPÍTULO I

Figure 1. Constitutive heterochromatin pattern and composition of AT-rich and CG-rich DNA observed in <i>T. sordida</i> Brazilians.	80
---	----

LISTA DE FIGURAS – CAPÍTULO II

Figure 1. Map of Brazil showing the study sample areas for <i>Triatoma sordida</i> populations.	101
Figure 2. Haplotype frequencies of cytochrome b in Brazilian samples. The scale bar shows the percentage of each haplotype per location indicated in the horizontal boxes.	101

Figure 3. Bayesian inference trees reconstructed from cyt b (A) and nd1 (B) sequences. The numbers above the branches represent clade support higher than 70. A cytochrome b sequence of *Triatoma infestans* and an nd1 sequence of *T. brasiliensis* were used as outgroups, respectively..... 102

Figure 4. Haplotype frequencies of nd1 gene in Brazilian samples. The scale bar shows the percentage of each haplotype per location indicated in the horizontal boxes. 103

LISTA DE FIGURAS – CAPÍTULO III

Figure 1. *Triatoma rosai* sp. nov. male (A) dorsal view, (B) ventral view, *T. sordida* male (C) dorsal view, (D) ventral view. 136

Figure 2. *Triatoma rosai* sp. nov. female (A) dorsal view, (B) ventral view, *T. sordida* female (C) dorsal view, (D) ventral view. 137

Figure 3. Detail of Head: (A) *T. rosai* sp. nov. dorsal view, (B) *T. sordida* dorsal view; Detail of Pronotum: (C) *T. rosai* sp. nov. dorsal view (D) *T. sordida* dorsal view..... 138

Figure 4. Detail of Head by SEM: (A) *T. rosai* sp. nov. by dorsal view, (B) *T. sordida* by dorsal view; Detail of Pronotum by SEM: (C) *T. rosai* sp. nov. dorsal view (D) *T. sordida* dorsal view; Detail of scutellum by SEM: (E) *T. rosai* sp. nov. dorsal view (F) *T. sordida* dorsal view. ac: anteclypeus; ge: gena; ju: jugum; oc: ocellus; aa: anterolateral angle; co: collar; hu: humeral angles..... 139

Figure 5. Female external genitalia by SEM: *T. rosai* sp. nov. (A) dorsal view, (C) posterior view, (E) ventral view, *T. sordida*: (B) dorsal view, (D) posterior view, (F) ventral view. Gc 8: gonocoxite; Gc 9: gonapophyse; Gp 8: gonapophyse, VII, VIII, IX: tergites; X: segment. 140

Figure 6. Detail of genital capsule *T. rosai* sp. nov.: (A) dorsal view, (B) ventral view, *T. sordida*: (C) dorsal view, (D) ventral view. cg: genital capsule, pa: paramere. 141

Figure 7. Paramere of *T. rosai* sp. nov.: (A) dorsal view, (B) ventral view; (C) Median process of the pygophore; Paramere of *T. sordida*: (D) dorsal view, (E) ventral view; (F) Median process of the pygophore..... 141

Figure 8. Phallus of *T. rosai* sp. nov.: (A) dorsal view, (B) ventral view, *T. sordida*: (C) dorsal view, (D) ventral view. bpa: basal plate arm, aa: articulatory apparatus, es: endosomal struts. 142

Figure 9. Phallus of *T. rosai* sp. nov.: (A) dorsal view, (B) lateral view, (C) ventral view; *T. sordida*: (D) dorsal view, (E) Lateral view, (F) ventral view. en: endosoma, dps: dorsal phallothecal sclerite, es: endosoma struts..... 142

Figure 10. Occurrence of *T. rosai* sp. nov. in Argentina provinces. Made with QGIS..... 143

Figure 11. Tree obtained by Bayesian Inference for the concatenated genes COI, cyt b, 28S, 16S and ITS-1. The numbers in the nodes represent the bootstrap values..... 143

Figure 12. Holotype of *T. sordida* described by Stål in 1859 (as *Conorhinus sordidus*) and deposited in the Zoologisches Museum, Berlin, Alemanha, A – Dorsal view; B – Lateral view. 144

LISTA DE FIGURAS – CAPÍTULO IV

Figure 1. Experimental crosses between *T. sordida* La Paz and *T. sordida sensu stricto*: A. *T. sordida sensu stricto* female (right) x *T. sordida* La Paz male (left); B. *T. sordida* La Paz female (left) x *T. sordida sensu stricto* male (right). Bar: 1 cm. 159

Figure 2. Notphied testicle of hybrid of *T. sordida* La Paz and *T. sordida sensu stricto*, demonstrating the absence of gonadal dysgenesis. A. Testicle of *T. sordida* La Paz; B. Testicle of hybrid F1 of the crosses between *T. sordida* La Paz female x *T. sordida sensu stricto* male; C. Testicle of hybrid F2 of the crosses between *T. sordida* La Paz male x *T. sordida sensu stricto* female. Bar: 10 mm. 159

Figure 3. Meiotic metaphases of hybrids F1 resulting from the experimental crosses between *T. sordida* La Paz and *T. sordida sensu stricto*. A and B. Metaphases with correct pairing of the homeologous chromosomes; A. Hybrid F1 of the crosses between *T. sordida* La Paz female x *T. sordida sensu stricto* male; B. Hybrid F1 of the crosses between *T. sordida* La Paz male x *T. sordida sensu stricto* female; X: sex chromosomes X, Y: sex chromosomes Y. Bar: 10 µm. 159

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Cruzamentos experimentais realizados na subfamília Triatominae na literatura. ...	44
Tabela 2. Localidades dos estados e biomas das populações analisadas citogeneticamente...	53
Tabela 3. Estados e municípios amostrados nas análises populacionais, número de indivíduos analisados em cada localidade (N), ambiente natural e código de identificação (<i>Voucher</i>) do espécime coletado.....	54
Tabela 4. Sequências dos <i>primers</i> dos genes analisados.	57
Tabela 5. Espécies analisadas, distribuição geográfica e número de acesso do GenBank para	66
Tabela 6. Cruzamentos experimentais “interespecíficos” e intraespecíficos realizados entre <i>T. sordida</i> provenientes do Brasil, Argentina e Bolívia.	66

LISTA DE TABELAS – CAPÍTULO I

Table 1. Geographical origin of the specimens used in the study and their corresponding biomes.....	79
--	----

LISTA DE TABELAS – CAPÍTULO II

Table 1. States and locations sampled, number of individuals analyzed in each location (N), natural environment and identification code (voucher) of the collected <i>Triatoma sordida</i> specimens.	98
Table 2. Description of cytochrome b polymorphisms identified in <i>Triatoma sordida</i> samples from Brazil.....	99
Table 3. Description of nd1 gene polymorphisms identified in <i>Triatoma sordida</i> samples from Brazil.....	100

LISTA DE TABELAS – CAPÍTULO III

Table 1. Species, geographic distribution and molecular markers used in the phylogenetic studies.	134
Table 2. Measurement averages and significance of <i>T. sordida sensu stricto</i> and <i>T. rosai</i> sp. nov. In bold we present statistically significant measurements.....	134
Table 3. Genetic distance based on cyt b mitochondrial gene. In bold we present the Genetic distance between <i>T. rosai</i> sp. nov. and <i>T. sordida sensu stricto</i>	135
Table 4. Experimental crosses performed between <i>T. sordida sensu stricto</i> and <i>T. rosai</i> sp. nov.	135

LISTA DE TABELAS – CAPÍTULO IV

Table 1. Experimental crosses performed between <i>T. sordida</i> La Paz and <i>T. sordida sensu stricto</i>	158
Table 2. Genetic distance between <i>T. sordida</i> La Paz and <i>T. sordida sensu stricto</i> for mitochondrial (Cyt B and ND1) and nuclear (ITS-1) genes.	158

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AIC	do inglês <i>Akaike information criterion</i>
AMOVA	do inglês <i>Analysis of Molecular Variance</i>
ARG	Argentina
ATP	do inglês <i>Adenosine Triphosphate</i>
BR	População de Brasília de Minas (Minas Gerais)
BLAST	do inglês <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BOL	Bolívia
BRA	Brasil
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAT	População de Catuti (Minas Gerais)
CMA3	do inglês <i>Chromomycin A3</i>
CNPQ	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COI, II, III	do inglês <i>Cytochrome c oxidase subunit I, II, III</i>
COR	População de Corumbá (Mato Grosso do Sul)
CPqRR	Centro de Pesquisas René Rachou
Cyt B	do inglês <i>Cytochrome B</i>
DAPI	do inglês <i>4',6-Diamidino-2-Phenylindole</i>
DN	Doenças negligenciadas
DNA	do inglês <i>Desoxirribonucleic Acid</i>
DNAg	DNA genômico
DNAmt	DNA mitocondrial
DNAr	DNA Ribossomal
DNAt	DNA transportador
ESS	do inglês <i>Effective Sample Size</i>
et al.	e outros, do latim <i>et al</i>
F1-F2-F3	Primeira, segunda e terceira geração
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FCFAR	Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FISH	do inglês <i>Fluorescence in situ Hybridization</i>
F	Estatística D de Wright

F_{CT}	Diferenciação entre indivíduos entre grupos
F_{SC}	Diferenciação entre populações do mesmo grupo
F_{ST}	Diferenciação entre indivíduos dentro de populações
FI	Fator de impacto
GO	População de Posse (Goiás)
GTR	do inglês <i>Generalised Time Reversible model</i>
H	Número de haplótipos
Hd	Diversidade haplotípica
HKY	do inglês <i>Hasegawa Kishino-Yano model</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
ITS	do inglês <i>Internal Transcribed Spacer</i>
K2P	Modelo Kimura-2-parâmetros
MA	População de Monte Azul (Minas Gerais)
MAC	População de Macaúbas (Bahia)
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
ML	do inglês <i>Maximum Likelihood</i>
MO	Microscopia Óptica
N	Número de indivíduos
N1-N5	Primeiro-quinto instar ninfal
ND1-6	do inglês <i>NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1-6</i>
NCBI	do inglês <i>National Center for Biotechnology Information</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
P	Ambiente peridoméstico
P.	Gênero <i>Panstrongylus</i>
PAN	População do Pantanal (Mato Grosso do Sul)
PCR	do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
POR	População de Porteirinha (Minas Gerais)
R.	Gênero <i>Rhodnius</i>
RM	População de Riacho dos Machados (Minas Gerais)
S	Sítios polimórficos ou segregantes
SEA	População de Seabra (Bahia)
SI	População de Santo Inácio (Gentio de Ouro – Bahia)

T.	Gênero <i>Triatoma</i>
TA	População de Tanhaçu (Goiás)
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
UNESP	Universidade Estadual Paulista
UV	Ultravioleta
X	Cromossomo sexual X
Y	Cromossomo sexual Y
WHO	do inglês <i>World Health Organization</i>
π	Diversidade nucleotídica
Φ (Phi)	Extensão do cálculo da estatística F de Wright
♂ ou M	Macho
♀ ou F	Fêmea
©	do inglês <i>Copyright</i>
®	Marca registrada
™	do inglês <i>Trade mark</i>
cm	Centímetro (unidade de medida: 10^{-2} metro)
ml	Mililitro (unidade de volume: 10^{-3} litro)
mm	Milímetro (unidade de medida: 10^{-3} metro)
min	Minutos
ng	Nanograma (unidade de medida: 10^{-9} grama)
pb	Pares de base
s	Segundos
V	Volt (unidade de tensão elétrica)
°C	Graus Celsius (medida de temperatura)
μL	Micro litro (unidade de volume: 10^{-6} litro)
μm	Micrômetro (unidade de medida: 10^{-6} metro)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	29
1.1. Doenças Negligenciadas e a Doença de Chagas.....	29
1.2. Aspectos gerais dos triatomíneos e da espécie em estudo	32
1.2.1. A questão taxonômica de <i>T. sordida</i>	35
1.3. Estudos genéticos.....	38
1.3.1. Delimitação de espécie com base em dados moleculares.....	38
1.3.2. Espécies Críptica	39
1.3.3. Marcadores Moleculares.....	39
1.3.4. Genética de populações	42
1.3.5. Cruzamentos Experimentais	43
2. OBJETIVOS	51
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
3.1. Obtenção do material biológico	53
3.1.1. Espécimes utilizados nas análises citogenéticas.....	53
3.1.2. Espécimes utilizados nas análises populacionais	54
3.1.3. Espécimes utilizados nos cruzamentos experimentais e nas análises filogenéticas, morfológicas e morfométricas	55
3.2. Análises Citogenéticas	55
3.2.1. Preparação Cromossômica	55
3.2.2. Bandamento C e CMA3/DAPI.....	55
3.2.3. Orceína Lacto-Acética.....	55
3.2.4. Análise do material biológico.....	56
3.3. Análises Moleculares	56
3.3.1. Extração do DNA Genômico.....	56
3.3.2. Reação de Amplificação	57
3.4. Análises populacionais.....	59
3.4.1. Análise das sequências obtidas.....	59
3.4.2. Estatística Descritiva	59

3.4.3.	Distância Genética	60
3.4.4.	Análise de Variância Molecular (AMOVA)	60
3.4.5.	Análises Filogenéticas	60
3.5.	Avaliação do status específico de <i>T. sordida</i> Argentina	61
3.5.1.	Identificação morfológica e descrição	61
3.5.2.	Análises morfológicas	62
3.5.3.	Análises morfométricas	64
3.5.4.	Reconstrução filogenética.....	64
3.6.	Cruzamentos experimentais.....	66
3.6.1.	Delineamento do estudo	66
4.	RESULTADOS.....	70
4.1.	Capítulo I - Genetic structure of Brazilian populations of <i>Triatoma sordida</i> (Stål, 1859) (Hemiptera, Triatominae) by means of chromosomal markers	70
4.2.	Capítulo II - Revisiting the genetic variability of Brazilian peridomestic populations of the Chagas disease vector <i>Triatoma sordida</i> (Stål, 1859) (Hemiptera, Triatominae).....	81
4.3.	Capítulo III - <i>Triatoma rosai</i> sp. nov. (Hemiptera, Triatominae): a new species of Argentinian Chagas disease vector described based on integrative taxonomy)	109
4.4.	Capítulo IV - <i>Triatoma sordida</i> (Stål, 1859) from La Paz, Bolivia (Hemiptera, Triatominae): an incipient species or an intraspecific chromosomal polymorphism?	146
5.	CONCLUSÕES	161
	REFERÊNCIAS	163

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doenças Negligenciadas e a Doença de Chagas

As doenças negligenciadas (DN) constituem um grupo diversificado de enfermidades que prevalecem em condições tropicais e subtropicais de 149 países, e afetam mais de um bilhão de pessoas que vivem em situação de pobreza em todo o mundo (WHO, 2020a). Atualmente, existem mais de vinte enfermidades consideradas como DN que podem ser ocasionadas por vírus (dengue, chikungunya e raiva), bactérias (úlceras de Buruli, hanseníase, tracoma e treponematoses endêmicas), parasitos (doença de Chagas, esquistossomos, dracunculíase, equinococose, trematodíases transmitidas por alimentos, doença do sono, leishmanioses, filariose linfática, oncocercose, helmintíases e teníase/cisticercose), fungos (micetoma, cromoblastomicose e outras micoses profundas), ectoparasitos (sarna) e, até mesmo, pelo envenenamento por picada de serpente (WHO, 2020a).

Além do número elevado de óbitos (cerca de meio milhão de mortes anualmente), as DN levam a diversas condições (por exemplo, incapacidades, desfiguração, prejuízos no crescimento infantil e no desenvolvimento cognitivo) que podem se intensificar com a pobreza nas regiões afetadas (WHO, 2010, 2013; HOTEZ et al., 2014). A Organização Mundial de Saúde (OMS) sugere que o controle efetivo dessas enfermidades pode ser alcançado quando diferentes abordagens de saúde pública são combinadas e aplicadas, ou seja, as ações devem ser guiadas pelo conhecimento entoepidemiológico das DN e, sobretudo, pela disponibilidade de medidas apropriadas para detectar, prevenir e controlar essas moléstias (WHO, 2020a).

A maioria das DN concentra-se nas regiões pobres da África, Ásia e América Latina (HOTEZ, 2011). Entre os países latino-americanos, o Brasil é responsável por uma grande parcela dessas doenças, a saber, 86% dos casos de hanseníase, cerca de 40% dos casos de dengue, 96% dos casos de esquistossomose, 39% dos casos de leishmaniose tegumentar, 93% dos casos de leishmaniose visceral e 25% dos casos de doença de Chagas (HOTEZ et al., 2008, 2014; LINDOSO; LINDOSO, 2009; MARTINS-MELO et al., 2016).

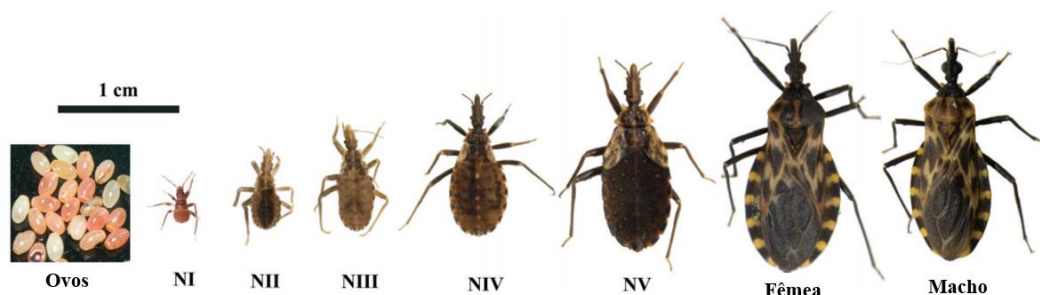
A doença de Chagas, descrita por Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, em 1909, é uma parasitose sistêmica causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) que representa um grande problema de saúde pública (NOUVELLET; CUCUNUBÁ; GOURBIÈRE, 2015). Essa doença é considerada potencialmente fatal (WHO, 2020b) e afeta, principalmente, pessoas que vivem em países em

desenvolvimento (BERMUDEZ et al., 2016). Estima-se que oito milhões de pessoas no mundo estejam infectadas pelo *T. cruzi* e, embora a maioria dos casos ocorra na América Latina, a doença se espalhou para áreas não endêmicas (WHO, 2020b), sendo relatada em diversos países, tais como Canadá, Estados Unidos, Japão, Austrália, Nova Zelândia, Suíça, Itália e Espanha (SORIANO-ARANDES et al., 2016). Nas Américas, cerca de 70 milhões de pessoas vivem em áreas de risco, sendo estimados, por ano, 30.000 novos casos de infecção e 14.000 mortes por complicações chagásicas (PAHO, 2017).

A transmissão do agente etiológico *T. cruzi* pode ocorrer de diversas maneiras como, por exemplo, por meio de transplante de órgãos de doadores infectados, acidentes laboratoriais ou ingestão de alimentos e líquidos contaminados (cana-de-açúcar, açaí e carne crua). A transmissão também pode se dar de forma congênita (verticalmente entre a mãe e a criança) ou ocorrer por meio de transfusão de sangue, sendo essas formas consideradas importantes alvos de atenção na redução da disseminação da doença, visto que estão relacionadas com a infestação em áreas urbanas e não endêmicas (ANGHEBEN et al., 2015; HOWARD et al., 2015). No entanto, o principal modo de transmissão é o vetorial, o qual ocorre por meio dos triatomíneos (Hemiptera, Triatominae) (WHO, 2020b), insetos popularmente conhecidos como “barbeiros” (DIAS; LARANJA; NOBREGA, 1945), devido ao seu hábito de picarem a face descoberta de pessoas adormecidas (TARTAROTTI; AZEREDO-OLIVEIRA; CERON, 2004).

A contaminação dos triatomíneos e a transmissão do parasita ocorrem durante a sua hematofagia, a qual é obrigatória em todas as fases da vida dos triatomíneos após a sua eclosão [ninfas de primeiro (N1) a quinto instar (N5) e adultos de ambos os sexos (Figura 1)]. Os insetos podem se contaminar ao se alimentarem do sangue de mamíferos infectados pelo *T. cruzi* e, assim, veicular o parasito desde a N1 até a fase adulta (SOARES et al., 2014; URDANETA-MORALES, 2014). Como possuem o hábito de defecar (Figura 2A, seta) e urinar (Figura 2B, seta) durante a alimentação, os triatomíneos infectados podem transmitir o protozoário a partir do contato das fezes e da urina contaminadas com a pele danificada do hospedeiro após a picada do inseto. A transmissão também pode se dar pelos os olhos, boca e por eventuais rupturas presentes na pele do indivíduo quando o mesmo, instintivamente, coça e provoca o espalhamento das fezes e da urina contaminadas (WHO, 2020b).

Figura 1. Ciclo de vida da espécie *T. carrioni*. Os estágios do desenvolvimento são ilustrados da esquerda para a direita, compreendendo os ovos (sendo a coloração rosa indicativa da probabilidade de eclosão), ninfa de primeiro ínstar (N1), segundo ínstar (N2), terceiro ínstar (N3), quarto ínstar (N4), quinto ínstar (N5), e as formas adultas fêmea e macho.



Fonte: PADILLA et al., 2019, adaptado.

Figura 2. Exemplo de triatomíneo (*Triatoma sordida*) defecando (A, seta) e urinando (B, seta) durante o repasto sanguíneo.



Fonte: OLIVEIRA, 2020.

A falta de progresso na descoberta de novas drogas no tratamento dos pacientes chagásicos ainda permanece um desafio na cura da doença de Chagas, uma vez que a terapêutica com os anti-tripanosomatídeos (Benznidazol e Nifurtimox) é ainda a única disponível desde a década de 60 (VERMELHO; RODRIGUES; SUPURAN, 2020), sendo efetiva apenas na fase aguda da doença [e, considerando-se que essa fase, geralmente, é assintomática ou com sintomas inespecíficos – como febre e mal estar, raramente resultando em chagoma (nódulo de pele) ou sinal de Romaña (edema na pálpebra) (BERN, 2015) –, o

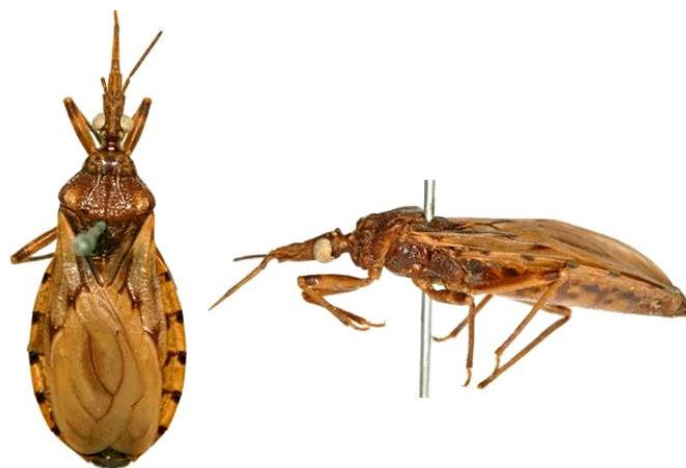
paciente só descobre que tem a Chagas quando já está na fase crônica da doença]. Dessa forma, a OMS ressalta que o controle de vetores é considerado como a principal medida para diminuir a incidência da doença de Chagas (WHO, 2020b).

1.2. Aspectos gerais dos triatomíneos e da espécie em estudo

Atualmente, existem 157 espécies descritas na subfamília Triatominae [sendo 154 espécies vivas e três espécies fósseis (*T. dominicana*, *P. hispaniolae* e *Paleotriatoma metaxytaxa*)], agrupadas em 18 gêneros e cinco tribos (ALEVI et al., 2020; GALVÃO, 2020; DALE; JUSTI; GALVÃO, 2021; ZHAO; GALVÃO; CAI, 2021). Desse total, são conhecidas 66 espécies que ocorrem no Brasil (GURGEL-GONÇALVES et al., 2017; NASCIMENTO et al., 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 são de grande importância vetorial por habitarem regiões domiciliares e apresentarem ampla distribuição geográfica no Brasil (SILVEIRA, 2011; COURA, 2015; DIAS et al., 2016)], todos os triatomíneos, de ambos os sexos e em qualquer fase do desenvolvimento após a eclosão (N1, N2, N3, N4, N5 e adultos), são considerados como potenciais vetores dessa doença (GALVÃO, 2014).

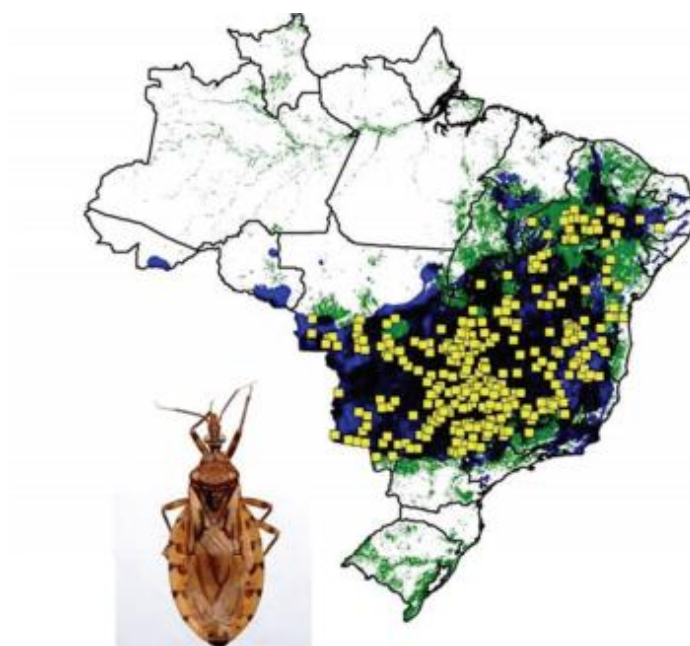
Triatoma sordida (Stål, 1859) (Figura 3) é considerada, atualmente, a espécie mais frequentemente capturada no ambiente peridomiciliar no Brasil (DIOTAIUTI et al., 1998; GALVÃO, 2014), além de ser predominante nos estados associados a regiões de cerrado, bem como sudeste, centro-oeste e áreas de transição para a Amazônia (GALVÃO, 2014). Sua distribuição inclui os estados do Acre, Bahia, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo e Tocantins (Figura 4) (GURGEL-GONÇALVES et al., 2012; RAMOS et al., 2018). Embora o cerrado brasileiro seja considerado como o centro de dispersão de *T. sordida* (FORATTINI et al., 1983), esse vetor também é encontrado em outros países da América Latina - Argentina, Bolívia, Paraguai e Uruguai (GORLA et al., 1993; GALVÃO, 2014; PANZERA et al., 2015).

Figura 3. Holótipo de *Triatoma sordida* descrito por Stål, em 1859, e depositado no Zoologisches Museum, Berlim, Alemanha.



Fonte: Imagem cedida pelo Dr. Jürgen Deckert, curador do museu.

Figura 4. Espécime de *Triatoma sordida* e sua disposição geográfica no Brasil.



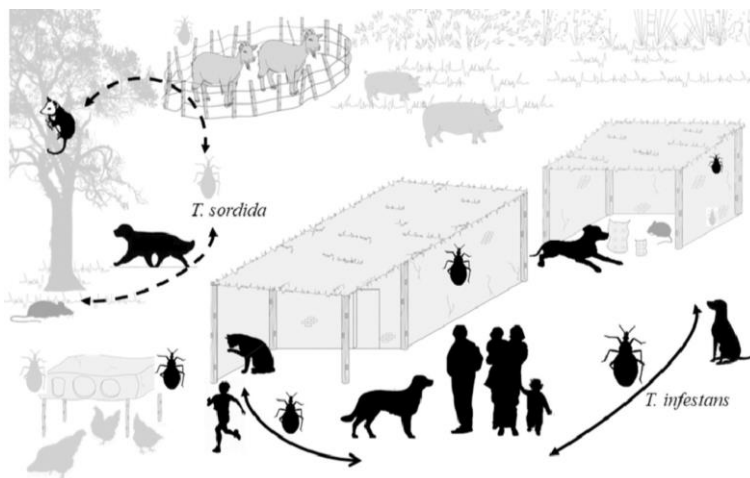
Fonte: GURGEL-GONÇALVES et al., 2012, adaptado.

T. sordida possui um amplo nicho ecológico (SILVEIRA et al., 2001), que lhe permite habitar vários ecótopos e utilizar diversas fontes alimentares (FORATTINI et al., 1975; DIOTAIUTI et al., 1993). Os principais ecótopos nos quais a espécie é encontrada estão associados com construções de madeira, como cercas, chiqueiros, currais, galinheiros, ocos de árvores, paióis, pilhas de lenha e pombais (CASTRO et al., 1997; PIRES et al., 1997; CARCAVALLO et al., 1998; DUJARDIN; SCHOFIELD; PANZERA, 2002; ROSSI;

DUARTE; GURGEL-GONÇALVES, 2015). Consequentemente, as fontes alimentares dessa espécie (que podem ser exclusivas ou combinadas) estão relacionadas a esses ecótopos, sendo notificada até o momento a sua presença em aves, cachorros, gatos, cavalos, cabras, ovelhas, vacas, porcos, além de animais silvestres associados a esses ambientes, como roedores, gambás, tatus, lagartos e sapos (LENT; WYGODZINSKY, 1979; CASTRO et al., 1997; PIRES et al., 1997; LOROSA et al., 1999a,b,c). Também existem notificações de coletas intradomiciliares de ninfas e adultos da espécie, o que evidencia sua capacidade de invasão das habitações humanas (FORATTINI et al., 1971; LENT; WYGODZINSKY, 1979; DIOTAIUTI et al., 1988; CASTRO et al., 1997; GALVÃO, 2014; ROSSI; DUARTE; GURGEL-GONÇALVES, 2015). Tal amplitude de nicho, associada à grande resistência ao jejum de *T. sordida*, facilita, portanto, sua adaptação a um número cada vez maior de ecótopos (SILVA et al., 2005).

Devido à sua elevada capacidade de disseminação (FORATTINI et al., 1975), essa espécie possui a capacidade de habitar ambientes silvestres, peridomiciliares e domiciliares (LENT; WYGODZINSKY, 1979; CASTRO et al., 1997; NOIREAU et al., 1999; SÁNCHEZ et al., 2020), incluindo-a atualmente entre as prioridades para campanhas de controle de triatomíneos no Brasil (DIOTAIUTI et al., 1995; SILVA et al., 2005; ABAD-FRANCH et al., 2013; RIBEIRO JR. et al., 2019). Os índices de captura de *T. sordida* têm preocupado as autoridades de saúde em áreas de ocupação agrícola nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Goiás (DIOTAIUTI et al. 1995; SILVA et al. 2005; OLIVEIRA; SILVA, 2007; PELLI et al. 2007). A partir da intensificação das campanhas de controle e eliminação dos focos de *T. infestans*, a infestação peridomiciliar assumiu maior importância, e a persistência das infestações neste ambiente por *T. sordida* vem sendo encarada como desafio a ser enfrentado no controle de triatomíneos (DIOTAIUTI et al. 1995). Além disso, o *T. sordida* também pode contribuir para os ciclos de transmissão peridoméstica devido à sua associação com vários mamíferos sinantrópicos, como roedores e gambás (MACCHIAVERNA et al., 2015) (Figura 5).

Figura 5. Ocupação espacial e nicho ecológico das espécies *T. sordida* e *T. infestans*.



Fonte: Rodrigues-Planez et al., 2020.

1.2.1. A questão taxonômica de *T. sordida*

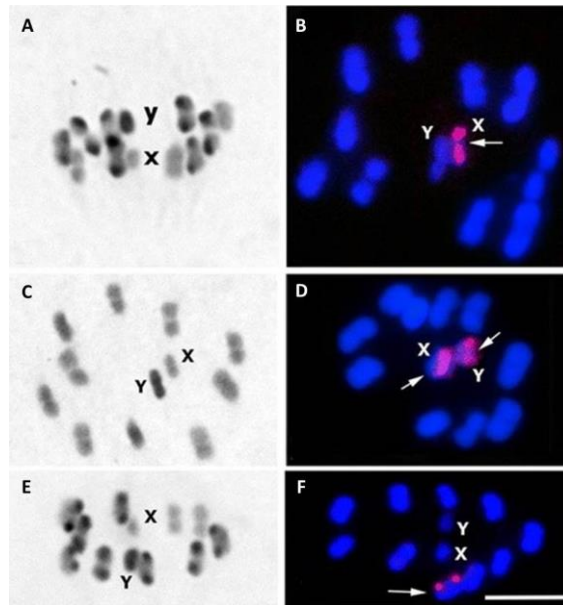
T. sordida foi a primeira espécie descrita do subcomplexo Sordida, inicialmente composto por *T. patagonica* Del Ponte, 1929, *T. guasayana* Wygodzinsky; Abalos, 1949 e *T. garciabesi* Carcavallo et al. (1967), com base em análises morfológicas e distribuição geográfica (SCHOFIELD; GALVÃO, 2009; PANZERA et al., 2015). Entretanto, essas espécies formam um grupo parafilético, pois são agrupadas filogeneticamente com espécies dos subcomplexo *T. matogrossensis* e *T. rubrovaria* (JUSTI et al., 2014; JUSTI; GALVÃO; SCHRAGO, 2016), estabelecendo o clado mais diversificado morfológicamente do complexo *T. infestans* (JUSTI et al., 2014).

Pita et al. (2016), com base em dados cromossômicos, propuseram em seu trabalho uma reorganização dos subcomplexos da América do Sul, sugerindo que o subcomplexo *T. sordida* fosse composto pelas espécies *T. garciabesi*, *T. sordida sensu stricto*, *T. sordida Argentina* (possível nova espécie), com o acréscimo das espécies *T. jurbergi* Carcavallo et al., 1998, *T. matogrossensis* Leite & Barbosa, 1953 e *T. vandae* Carcavallo et al., 2002, que pertenciam anteriormente ao subcomplexo *T. matogrossensis*, o qual foi eliminado. Além disso, os autores reagruparam as outras espécies do subcomplexo *T. sordida* (*T. guasayana* e *T. patagonica*) com *T. carcavalloi* Jurberg, Rocha & Lent, 1998, *T. circummaculata* (Stål, 1859), *T. klugi* Carcavallo et al., 2001, *T. limai* Del Ponte, 1929, *T. oliveirai* (Neiva, Pinto & Lent, 1939), *T. rubrovaria* (Blanchard, 1843) e *T. pintodiasi* Jurberg et al. (2013) no subcomplexo *T. rubrovaria* (PITA et al., 2016).

A validade taxonômica de *T. sordida* e a diferenciação de suas populações sempre foi controversa e permanece em discussão. Com exceção de *T. patagonica*, as espécies do “antigo” subcomplexo Sordida são morfologicamente muito similares (DUJARDIN; PANZERA; SCHOFIELD, 2002; PANZERA et al., 2015), com sobreposição de distribuição geográfica, podendo viver em simpatria e produzir híbridos, o que aumenta significativamente a confusão taxonômica desses vetores (PANZERA et al., 2015) o que acarretou, por exemplo, na sinonimização de *T. garciabesi* com *T. sordida* (LENT; WYGODZINSKY, 1979). No entanto, algumas metodologias mostram-se eficazes para diferenciar esses táxons, como as análises citogenéticas (PANZERA et al., 2015), isoenzimáticas (NOIREAU et al., 1998), morfológicas (LENT; WYGODZINSKY, 1979; GORLA et al., 1993), morfométricas (NATERRO et al., 2017) e moleculares (JUSTI et al., 2014; PANZERA et al., 2015; JUSTI; GALVÃO, 2016), resultando, por exemplo, na revalidação de *T. garciabesi* (JURBERG et al., 1998), após 19 anos de ser inicialmente sinonimizado como *T. sordida* (LENT; WYGODZINSKY, 1979).

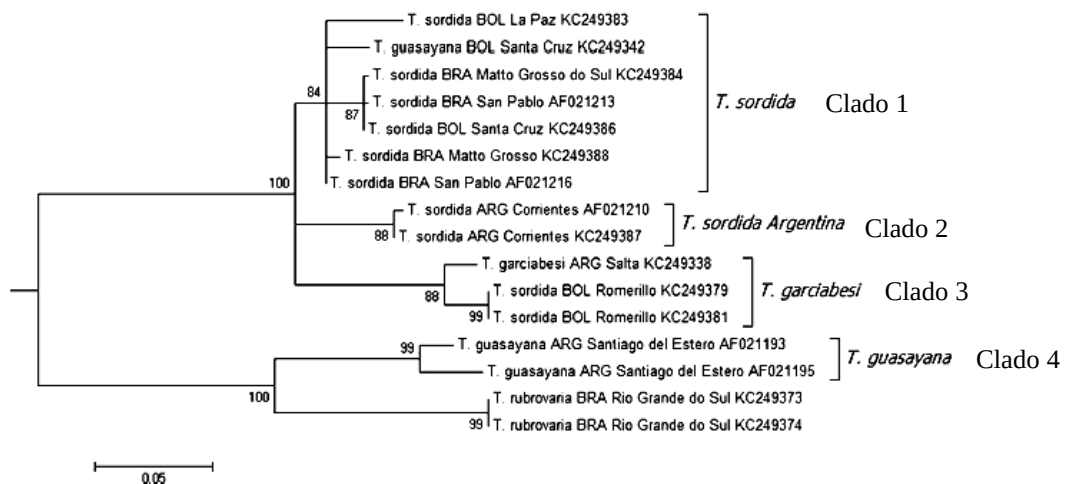
Baseando-se em dados cromossômicos (padrão de heterocromatina constitutiva e marcação por FISH da sonda ribossomal 45S) (Figura 6) e moleculares (gene mitocondrial COI) (Figura 7), Panzera et al. (2015) propuseram a existência de três táxons diferentes (citótipos) entre os exemplares classificados, até o momento, como *T. sordida*: *T. sordida sensu stricto* (I), *T. sordida La Paz* (II) e *T. sordida Argentina* (III), caracterizando o fenômeno de especiação críptica para *T. sordida*. Ainda, mais recentemente, Nattero et al. (2017) diferenciaram *T. sordida Argentina* dos exemplares provenientes do Brasil e da Bolívia a partir de dados morfométricos, ressaltando a importância de estudos adicionais, com marcadores fenotípicos, moleculares e realização de cruzamentos experimentais, para confirmar a validade específica dos táxons.

Figura 6. Padrão de heterocromatina (A, C e E) e marcação das sondas DNAr 45S (B, D e F - setas) em *T. sordida sensu stricto* (A, B), *T. sordida* Argentina (C, D) e *T. sordida* La Paz (E, F). X: cromossomo sexual X, Y: cromossomo sexual Y. Barra: 10 µm.



Fonte: Panzera et al., 2015, adaptado.

Figura 7. Árvore filogenética obtida por Máxima Verossimilhança dos citótipos de *T. sordida*, com base no gene mitocondrial COI. O Clado 1 representa o citótipo I (*T. sordida sensu stricto*) e II (*T. sordida* La Paz). O Clado 2 representa o citótipo III (*T. sordida* Argentina). O Clado 3 reúne espécimes de *T. garciabesi* com alguns erros de identificação depositados no GenBank e o Clado 4 contém exemplares de *T. guasayana*. ARG = Argentina; BOL = Bolívia; BRA = Brasil.



Fonte: Panzera et al., 2015, adaptado.

Todas as populações brasileiras analisadas citogeneticamente, até o momento, foram classificadas como *T. sordida sensu stricto* (MADEIRA et al., 2019). Embora esse citótipo de *T. sordida* seja considerado mais significativo em termos de transmissão da doença de Chagas, principalmente em ambientes domésticos e peridomésticos (PANZERA et al., 2015), estudos caracterizando a diversidade genética dessas populações no Brasil são escassos, restringindo-se à região de Minas Gerais (MONTEIRO et al., 2009; PESSOA et al., 2016).

1.3. Estudos genéticos

1.3.1. Delimitação de espécie com base em dados moleculares

A espécie é tida como uma unidade fundamental para a biologia, entretanto, existem diversos conceitos e definições, os quais consideram diferentes aspectos - biológicos, morfológicos, ecológicos, entre outros - que podem levar a diferenças na delimitação de uma determinada espécie (MAYDEN, 1997; DE QUEIROZ, 2007). Dentre os diversos conceitos existentes, alguns levam em consideração a relação de ancestralidade-descendência, como o Conceito Evolutivo de Espécie, o qual sugere que espécies são linhagens que evoluem separadamente de outras, com suas próprias tendências e histórias evolutivas (SIMPSON, 1951; WILEY, 1978; MAYDEN, 1997) e o Conceito Filogenético de Espécie, que apresenta diferentes classes, porém todas relacionadas com a sistemática filogenética ou cladística, de modo que espécies seriam resultantes de seleção natural, sendo as menores entidades biológicas que são diagnosticáveis e/ou monofiléticas (ROSEN, 1979; NELSON; PLATNICK, 1981; CRACRAFT, 1983; DONOGHUE, 1985; MISHLER, 1985; NIXON; WHEELER, 1990).

A biologia molecular tem sido considerada uma ferramenta muito utilizada em estudos de reconhecimento e delimitação de espécies, considerando aspectos genéticos e filogenéticos. Em Triatominae, diversos estudos têm permitido a separação de espécies crípticas e a determinação da diversidade de espécies, por meio de isoenzimas, citogenética molecular, genes mitocondriais e nucleares (NOIREAU et al., 1998; MARCILLA et al., 2001; PAVAN & MONTEIRO, 2007; BARGUES et al., 2008; DORN et al., 2009; ABAD-FRANCH et al., 2013; PANZERA et al., 2015).

1.3.2. Espécies Crípticas

Espécies crípticas, também conhecidas como espécies isomórficas, são espécies idênticas na sua morfologia externa, podendo diferir em características menores e não visíveis facilmente. Por meio do uso de diferentes marcadores fenotípicos e genéticos, a especiação críptica se mostrou um fenômeno amplamente disseminado pela subfamília Triatominae. A sua existência já foi descrita para diferentes grupos do gênero *Triatoma*, incluindo representantes dos subcomplexos *Brasiliensis*, *Dimidiata*, *Phyllosoma* e *Sordida* (SCHOFIELD; GALVÃO, 2009; PANZERA et al., 2015).

O fenômeno de especiação críptica foi sugerido por Noireau et al. (1998) pela primeira vez para *T. sordida* de diferentes localidades da Bolívia, com base em análises isoenzimáticas que resultaram em uma alta distância genética. Posteriormente, Panzera et al. (1997, 2015), com base em dados cromossômicos e moleculares, também corroboraram a hipótese quando compararam populações do Brasil, da Bolívia e Argentina, destacando que existem, pelo menos, duas possíveis espécies diferentes associadas a *T. sordida sensu stricto*: *T. sordida Argentina* e *T. sordida La Paz*.

Em relação à diversidade genética das populações brasileiras de *T. sordida*, só existem dois estudos na literatura até o momento que realizaram sua investigação (MONTEIRO et al., 2009; PESSOA et al., 2016), porém ambos restritos à região de Minas Gerais. Ambos os estudos reportaram que a estrutura dessas populações apresentou baixos níveis de diversidade genética, sendo inclusive a diversidade nucleotídica de isolados de *T. sordida* da Bolívia 13 vezes maior em comparação com as amostras brasileiras (PESSOA et al., 2016).

Assim, levando em consideração que espécies crípticas são espécies idênticas do ponto de vista morfológico, podendo ser diferenciadas apenas por ferramentas genéticas (SCHOFIELD; GALVÃO, 2009), sugerimos que existe a necessidade de um estudo genético em âmbito populacional entre os exemplares brasileiros de diferentes estados.

1.3.3. Marcadores Moleculares

Marcadores moleculares são proteínas ou sequências de DNA polimórficas que podem ser usados como indicadores de variação do genoma (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Atualmente, essas sequências são tidas como uma das ferramentas mais úteis para estabelecer a classificação natural da subfamília Triatominae

(MAS-COMA; BARGUES, 2009). Os sequenciamentos de DNA ribossômico (DNAr) nuclear e do DNA mitocondrial (DNAm) são considerados métodos que fornecem uma informação mais precisa acerca das características desses vetores (MONTEIRO et al., 2001). Dentre os aspectos da biologia dos triatomíneos que podem ser inferidos pelos dados das sequências de DNA estão: sistemática e taxonomia, origem, taxas e traços evolutivos, biogeografia, classificação de espécimes, caracterização de espécies crípticas, caracterização de híbridos e mudanças populacionais (BARGUES et al., 2002).

1.3.3.1. DNA nuclear

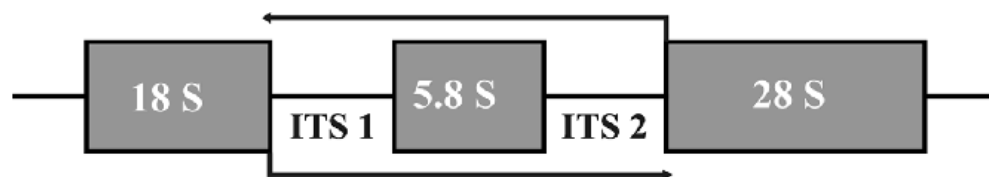
Genes nucleares são considerados como ferramentas importantes para se analisar diversidade e relações filogenéticas em nível específico (MAS-COMA; BARGUES, 2009). O complexo gênico de RNA ribossomal (RNAr) nuclear é uma unidade de repetições em tandem, com uma a muitas centenas de cópias (Figura 8). Este complexo possui muitos domínios, que evoluem a taxas variadas, possuindo, assim, diferentes utilidades filogenéticas (JORGENSEN; CLUSTER, 1988). O DNAr é uma ferramenta utilizada em estudos filogenéticos para vários níveis taxonômicos, uma vez que cópias individuais do DNAr não acumulam mutações de forma independente, pois pertencem a famílias multigênicas, o que resulta em uma importante variação intraespecífica pequena e interespecífica (ONYABE; CONN, 1999).

O DNAr, tal como os espaçadores internos transcritos ITS-1 e ITS-2 (do inglês, *Internal Transcribed Spacer*) (Figura 8), que separam os genes DNAr 18S, 5.8S e 28S (SIQUEIRA et al., 2010), podem ser informativos para análises populacionais (HILLIS et al., 1996). As regiões espaçadoras evoluem em uma proporção muito mais rápida do que as regiões codificantes, considerando que as substituições que ocorrem nessas áreas podem ser consideradas mutações neutras, sem restrições muito fortes (MAS-COMA; BARGUES, 2009). Enquanto as regiões codificadoras mostram pouca divergência entre espécies relacionadas, as regiões intragênicas apresentam um maior grau de variabilidade (JOBST et al., 1998).

A região intergênica ITS tem sido amplamente utilizada para a inferência de relacionamentos em nível de espécie, inclusive para espécies estreitamente relacionadas, subespécies ou populações. Em especial, os marcadores ITS-1 e ITS-2 são considerados os mais úteis para táxons muito próximos que divergiram relativamente recentemente (<50 milhões de anos atrás) (MAS-COMA; BARGUES, 2009), sendo a região ITS-1 menos

conservada que a região ITS-2 (BARGUES et al., 2000). A região ITS também é tida como uma importante ferramenta evolutiva a ser explorada em organismos próximos e distantes, fornecendo *insights* sobre a evolução de sequências de DNA em geral (HERSHKOVITZ; LEWIS, 1996).

Figura 8. Esquema do complexo gênico nuclear de DNA ribossomal, com os genes das subunidades do DNAr 18S, 28S e 5.8S, além dos espaços internos transcritos (ITS-1 e ITS-2). As setas indicam a posição dos iniciadores usados nas reações de PCR e a região amplificada.



Fonte: SIQUEIRA et al., 2010.

1.3.3.2. DNA mitocondrial

O DNAm_t corresponde a um genoma relativamente simples, de herança materna (sem recombinação) e que apresenta uma taxa de evolução dez vezes mais rápida que as substituições do DNA nuclear, tornando-o uma ferramenta valiosa em estudos de genética populacional, evolução molecular e relações filogenéticas (AVISE et al., 1987). Os erros de replicação e as altas concentrações de compostos de oxigênio, capazes de danificar o DNA, aliados a um sistema de reparo ineficiente, parecem ser os responsáveis pelo acúmulo de mutações no DNAm_t (AVISE et al., 1987). O uso do DNAm_t nas últimas décadas possibilitou a elucidação dos processos evolutivos e passado demográfico de populações e espécies (BALLARD; WHITLOCK, 2004).

O genoma mitocondrial constitui-se como um genoma circular de tamanho reduzido, possuindo entre 16.000 a 20.000 pares de bases (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2010). Possui genes codificadores para duas subunidades ribossômicas (12S e 16S), 22 RNAs transportadores (RNAts), três subunidades da enzima citocromo c oxidase (COI, COII e COIII), citocromo B (Cyt B), subunidades 6 e 8 de ATP F₀ sintase (ATP6 e ATP8) e sete subunidades da NADH desidrogenase (ND1-ND6 e ND4L) (MAS-COMA; BARGUES, 2009).

Embora o DNAm_t seja um marcador amplamente utilizado, seu uso também possui limitações, uma vez que o mesmo elucidar estritamente processos históricos matrilineos.

Assim, se as histórias evolutivas entre machos e fêmeas diferirem em uma espécie, este marcador não é capaz de refletir a história da espécie como um todo, mas apenas da porção feminina. Além dessa restrição, alguns autores já argumentaram recentemente que a evolução do DNAm é não-neutra, como proposto inicialmente (BALLARD; WHITLOCK, 2004).

Apesar das críticas a esse marcador, o DNAm ainda é uma ferramenta muito utilizada para estudos da subfamília Triatominae. Os estudos filogenéticos em triatomíneos com genes mitocondriais tiveram início em 1998 (GARCÍA; POWELL, 1998), e são focados, principalmente, em alguns poucos genes como COI, Cyt B e ND1, devido à dificuldade para o desenho de *primers* universais. ND1 é o gene mais conservado dentre os sete genes codificantes da NADH desidrogenase (MAS-COMA; BARGUES, 2009). Já o Cyt B (citocromo oxidase B) é um gene geralmente utilizado para comparação de espécies próximas geneticamente, devido à sua alta variabilidade na terceira posição do códon (MAS-COMA; BARGUES, 2009). Em triatomíneos, esse marcador é especialmente utilizado para estudos de inferência filogenética, estruturação populacional (PAVAN; MONTEIRO, 2007; PESSOA et al., 2016), para auxiliar a descrição de novas espécies (SOUZA et al., 2016) ou mesmo para a separação de espécies crípticas (PAVAN; MONTEIRO, 2007).

1.3.4. Genética de populações

Elucidar os processos relacionados à origem e manutenção da variabilidade genética nas populações naturais é uma das tarefas realizadas pelos biólogos que trabalham com genética de populações e evolução (LEE; MITCHELL-OLDS, 2011; RODERICK et al., 2012). A genética de populações é uma área de estudo que compreende a origem, quantidade e distribuição da variação genética presente dentro e entre populações, bem como o destino desta variação no tempo e no espaço (TEMPLETON, 2011). Sequências variantes de um mesmo segmento de DNA (ou seja, cópias homólogas) são denominadas haplótipos, podendo ser geradas por meio de mutações ou por recombinação, de modo que a variação genética pode ser estudada por meio destes polimorfismos (FUTUYMA, 2005). Já a interação entre as forças evolutivas de mutação, deriva genética, fluxo gênico e seleção natural determinam as frequências alélicas nas populações ao longo do tempo e também no espaço, sendo o agrupamento de populações diferenciadas conhecido como estrutura populacional (HARTL; CLARK, 2010; TEMPLETON, 2011).

Entretanto, os trabalhos com a utilização de ferramentas moleculares em genética

populacional de triatomíneos têm sido desenvolvidos em sua maioria em um contexto filogeográfico (MONTEIRO et al. 1999; MONTEIRO et al. 2004), sendo atualmente poucos os estudos direcionados à identificação das populações de triatomíneos que vivem em peridomicílio, com a capacidade de invadir e colonizar domicílios. No Brasil, *T. sordida* tem recebido uma atenção especial devido à sua ampla distribuição, tendência a invadir ambientes domésticos, associação com a reinfestação de ambientes tratados com inseticida (PESSOA et al., 2015) e pela sua competência vetorial (LOROSA et al., 2000). Ainda, em um recente estudo de modelamento de nicho ecológico, revelou-se a possibilidade dessa espécie ter uma distribuição ainda maior do que se imaginava, estando presente em outros biomas além do Cerrado, como Caatinga e Pantanal (GURGEL-GONÇALVES et al., 2012). Para um planejamento e execução efetivos de iniciativas de controle vetorial, é importante investigar os níveis de variação genética, a estrutura populacional e o fluxo gênico entre populações dessa espécie (PESSOA et al., 2016).

Atualmente, em Triatominae, estudos combinados de vários genes para a mesma espécie de triatomíneo são tidos como esporádicos (MAS-COMA; BARGUES, 2009; JUSTI et al., 2014; JUSTI et al., 2016). Dessa forma, a combinação de genes nucleares de DNAr como ITS-1 e ITS-2, conjuntamente com genes de DNAm, como COI, Cyt B e ND1, tem sido considerada a melhor abordagem para estudos envolvendo espécies, subespécies, híbridos e populações de triatomíneos (MAS-COMA; BARGUES, 2009).

1.3.5. Cruzamentos Experimentais

A realização de cruzamentos experimentais pode auxiliar no entendimento da taxonomia, sistemática e dos mecanismos de isolamento que limitam o fluxo gênico, assim como possibilita avaliar o papel da hibridização natural na geração de novas variantes genéticas (que podem levar à evolução adaptativa e/ou a fundação de novas linhagens evolutivas) (ARNOLD, 1997; PÉREZ et al., 2005). Diversos estudos com cruzamentos experimentais foram conduzidos em triatomíneos (MAZZOTTI; OSÓRIO, 1941, 1942; USINGER, 1944, 1966; ABALOS, 1948; RYCKMAN, 1962; CORRÊA e ESPÍNOLA, 1964; UESHIMA, 1966; ESPÍNOLA, 1971; CARVALHEIRO; BARRETTO, 1976; FRANCA-RODRÍGUEZ et al., 1979; GALÍNDEZ et al., 1994, PÉREZ et al 2005; SCHREIBER et al., 1974; CERQUEIRA, 1982; HEITZMANN-FONTENELLE, 1984; COSTA et al., 2003; MARTÍNEZ-IBARRA et al., 2005, 2008, 2011, 2016a,b; CORREIA et al., 2013; DÍAZ et al., 2014; MENDONÇA et al., 2014, 2016; CAMPOS-SOTO et al., 2016; NEVES et al., 2020)

(Tabela 1), sendo a maioria dos estudos relacionados com a análise da viabilidade dos híbridos em primeira geração (F1) ou, no máximo, em segunda geração (F2). Embora essas análises apresentem grande valor científico, principalmente para os cruzamentos resultantes em ovos inférteis (isolamento reprodutivo pré-zigótico) ou híbridos F1 inviáveis (isolamento reprodutivo pós-zigótica por inviabilidade do híbrido), conduzir os cruzamentos até, pelo menos, a terceira geração (F3) mostra-se de grande importância, pois existem diversos fatores relacionados com o isolamento reprodutivo pós-zigótico que podem inviabilizar os híbridos a partir da F2 [como, por exemplo, o desmoronamento do híbrido, descrito recentemente na subfamília Triatominae (MENDONÇA et al., 2014; ALEVI et al., 2018)] e, dessa forma, corroborar o conceito biológico de espécie, a saber, “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)” (MAYR et al., 1963; DOBZHANSKY, 1970).

Tabela 1. Cruzamentos experimentais realizados na subfamília Triatominae na literatura.

Cruzamentos experimentais				Resultado	
-	<i>Triatoma hegneri</i>	X	<i>Triatoma dimidiata</i>	-	Inférteis
-	<i>Triatoma hegneri</i>	X	<i>Triatoma dimidiata</i>	-	Férteis
♂	<i>Meccus picturatus</i>	X	<i>Meccus pallidipennis</i>	♀	F1 e F2
♂	<i>Meccus pallidipennis</i>	X	<i>Meccus picturatus</i>	♀	F1 e F2
♂	<i>Meccus picturatus</i>	X	<i>Meccus mazzottii</i>	♀	F1 e F2
♂	<i>Meccus mazzottii</i>	X	<i>Meccus picturatus</i>	♀	F1 e F2
♂	<i>Meccus picturatus</i>	X	<i>Meccus phyllosomus</i>	♀	F1 e F2
♂	<i>Meccus phyllosomus</i>	X	<i>Meccus picturatus</i>	♀	F1 e F2
♂	<i>Meccus phyllosomus</i>	X	<i>Meccus pallidipennis</i>	♀	F1 e F2
♂	<i>Meccus pallidipennis</i>	X	<i>Meccus phyllosomus</i>	♀	F1 e F2
♂	<i>Meccus mazzottii</i>	X	<i>Meccus longipennis</i>	♀	F1 e F2
♂	<i>Meccus longipennis</i>	X	<i>Meccus mazzottii</i>	♀	F1 e F2
♂	<i>Meccus mazzottii</i>	X	<i>Meccus pallidipennis</i>	♀	F1
♂	<i>Meccus pallidipennis</i>	X	<i>Meccus mazzottii</i>	♀	F1
♂	<i>Meccus mazzottii</i>	X	<i>Meccus bassolsae</i>	♀	F1
♂	<i>Meccus bassolsae</i>	X	<i>Meccus mazzottii</i>	♀	F1

♂	<i>Meccus longipennis</i>	X	<i>Meccus picturatus</i>	♀	F1
♂	<i>Meccus picturatus</i>	X	<i>Meccus longipennis</i>	♀	F1
♂	<i>Triatoma platensis</i>	X	<i>Triatoma delpontei</i>	♀	F1 e F2
♂	<i>Triatoma delpontei</i>	X	<i>Triatoma platensis</i>	♀	Inférteis
♂	<i>Triatoma platensis</i>	X	<i>Triatoma infestans</i>	♀	F1 e F2
♂	<i>Triatoma infestans</i>	X	<i>Triatoma platensis</i>	♀	F1 e F2
♂	<i>Triatoma infestans</i>	X	<i>Triatoma rubrovaria</i>	♀	F1
♂	<i>Triatoma rubrovaria</i>	X	<i>Triatoma infestans</i>	♀	F1
♂	<i>Triatoma sinaloensis</i>	X	<i>Triatoma peninsularis</i>	♀	Inférteis
♂	<i>Triatoma sinaloensis</i>	X	<i>Triatoma protracta</i>	♀	F1
-	<i>Triatoma protracta</i>	X	<i>Triatoma barberi</i>	-	F1 e F2
-	<i>Triatoma barberi</i>	X	<i>Triatoma rubida</i>	-	F1 (N5)
-	<i>Triatoma maculata</i>	X	<i>Triatoma sordida</i>	-	F1
-	<i>Triatoma maculata</i>	X	<i>Triatoma infestans</i>	-	F1
-	<i>Triatoma maculata</i>	X	<i>Triatoma brasiliensis</i>	-	F1
-	<i>Triatoma maculata</i>	X	<i>Triatoma pseudomaculata</i>	-	F1 (híbridos inférteis)
♂	<i>Triatoma pseudomaculata</i>	X	<i>Triatoma maculata</i>	♀	F1 (híbridos inférteis)
♂	<i>Triatoma pseudomaculata</i>	X	<i>Triatoma sordida</i>	♀	F1
♂	<i>Triatoma pseudomaculata</i>	X	<i>Triatoma infestans</i>	♀	F1
-	<i>Triatoma brasiliensis</i>	X	<i>Triatoma petrochiae</i>	-	F1 (1 ninfa de 1º instar)
♂	<i>Triatoma bahiensis</i>	X	<i>Triatoma lenti</i>	♀	F1
♂	<i>Triatoma lenti</i>	X	<i>Triatoma bahiensis</i>	♀	F1
♂	<i>Triatoma lenti</i>	X	<i>Triatoma sherlocki</i>	♀	F1 e F2
♂	<i>Triatoma sherlocki</i>	X	<i>Triatoma lenti</i>	♀	F1 e F2
-	<i>Rhodnius prolixus</i>	X	<i>Rhodnius neglectus</i>	-	F1
-	<i>Rhodnius prolixus</i>	X	<i>Rhodnius robustus</i>	-	F2
-	<i>Rhodnius prolixus</i>	X	<i>Rhodnius pictipes</i>	-	F1 (N3)
♂	<i>Rhodnius pallescens</i>	X	<i>Rhodnius colombiensis</i>	♀	F1
♂	<i>Rhodnius colombiensis</i>	X	<i>Rhodnius pallescens</i>	♀	Inférteis
♂	<i>Triatoma brasiliensis</i>	X	<i>Triatoma melanocephala</i>	♀	Inférteis
♂	<i>Triatoma melanocephala</i>	X	<i>Triatoma brasiliensis</i>	♀	Inférteis
♂	<i>Triatoma brasiliensis</i>	X	<i>Triatoma vitticeps</i>	♀	Inférteis
♂	<i>Triatoma vitticeps</i>	X	<i>Triatoma brasiliensis</i>	♀	Inférteis

♂	<i>Triatoma brasiliensis</i>	X	<i>Triatoma tibiamaculata</i>	♀	Inférteis
♂	<i>Triatoma tibiamaculata</i>	X	<i>Triatoma brasiliensis</i>	♀	inférteis
♂	<i>Triatoma brasiliensis</i>	X	<i>Triatoma melanica</i>	♀	F1 e F2 (2 indivíduos)
♂	<i>Triatoma melanica</i>	X	<i>Triatoma brasiliensis</i>	♀	F1 e F2
♂	<i>Triatoma brasiliensis</i>	X	<i>Triatoma b. macromelasoma</i>	♀	F1 e F2
♂	<i>Triatoma b. macromelasoma</i>	X	<i>Triatoma brasiliensis</i>	♀	F1 e F2
♂	<i>Triatoma brasiliensis</i>	X	<i>Triatoma juazeirensis</i>	♀	F1 e F2
♂	<i>Triatoma juazeirensis</i>	X	<i>Triatoma brasiliensis</i>	♀	F1 e F2
♂	<i>Triatoma b. macromelasoma</i>	X	<i>Triatoma melanica</i>	♀	F1 e F2
♂	<i>Triatoma melanica</i>	X	<i>Triatoma b. macromelasoma</i>	♀	F1 e F2
♂	<i>Triatoma melanica</i>	X	<i>Triatoma juazeirensis</i>	♀	F1 e F2
♂	<i>Triatoma juazeirensis</i>	X	<i>Triatoma melanica</i>	♀	F1 e F2
♂	<i>Triatoma b. macromelasoma</i>	X	<i>Triatoma juazeirensis</i>	♀	F1 e F2
♂	<i>Triatoma juazeirensis</i>	X	<i>Triatoma b. macromelasoma</i>	♀	F1 e F2
♂	<i>Triatoma sherlocki</i>	X	<i>Triatoma juazeirensis</i>	♀	F1
♂	<i>Triatoma juazeirensis</i>	X	<i>Triatoma sherlocki</i>	♀	F1
♂	<i>Triatoma sherlocki</i>	X	<i>Triatoma brasiliensis</i>	♀	F1
♂	<i>Triatoma brasiliensis</i>	X	<i>Triatoma sherlocki</i>	♀	F1
♂	<i>Triatoma melanica</i>	X	<i>Triatoma sherlocki</i>	♀	F1

F1: primeira geração híbrida, F2: segunda geração híbrida, N3: ninfa de terceiro instar, N5: ninfa de quinto instar. ♂: macho, ♀: fêmea. Fonte: Ravazi, 2019.

Cruzamentos híbridos foram realizados para espécies que, assim como *T. sordida*, apresentam variação intraespecífica, e resultaram em ausência (PANZERA et al., 2004; DIAS et al., 2014) e presença (GARCÍA et al., 2013) de isolamento reprodutivo: cruzamentos de *T. infentans* proveniente de regiões Andinas e não Andinas, por exemplo, não apresentaram barreiras de isolamento reprodutivo e alteração na meiose (PANZERA et al., 2004); cruzamentos de *R. nasutus* (*dark*) com o padrão típico de *R. nasutus* também não apresentaram barreiras que inviabilizassem a prole desses triatomíneos (DIAS et al., 2014). Todavia, *T. dimidiata* de diferentes localidades foram cruzados e observou-se barreiras reprodutivas (GARCÍA et al., 2013), sendo que, recentemente, duas novas espécies foram descritas a partir dos polimorfismos de *T. dimidiata* que apresentavam barreiras reprodutivas: *T. mopan* Dorn et al. (2018) e *T. huehuetenanguensis* Lima-Cordón et al. (2019) (DORN et al., 2018; LIMA-CORDÓN et al., 2019).

1.3.5.1. Mecanismos de isolamento reprodutivo pré-zigóticos

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 - *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; 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 entre os cruzamentos experimentais, sobretudo, na maioria das vezes, 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, o que ressalta a importância de análises morfológicas para a caracterização das genitálias no caso de inviabilidade dos ovos nos cruzamentos interespecífica.

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* Sherlock & Serafim, 1967 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. Dessa forma, destacamos a importância dessas análises para os cruzamentos que não resultam em F1.

1.3.5.2. Mecanismos de isolamento reprodutivo pós-zigóticos

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 F1. Esse fenômeno evolutivo pode ser representado pelo cruzamento entre *T. mexicana* (Herrich-Schaeffer, 1848) e as seis espécies de *Meccus* spp. (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* (PINTO, 1927; HYPISA et al., 2002)].

b) Esterilidade do híbrido

Nesse caso, os híbridos em F1 chegam até a fase adulta, mas são incapazes de produzir 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 apresentaram ausência de pareamento ou pareamento trivalente entre os cromossomos homeólogos) (PÉREZ et al., 2005), assim como para os híbridos do cruzamento entre *T. sordida* e *T. pseudomaculata* (SCHREIBER et al., 1974) (que apresentaram espermátides e espermatozoides gigantes e anômalos).

c) Desmoronamento do híbrido

Como já mencionado anteriormente, esse tipo de isolamento pós-zigótico foi recentemente descrito para os triatomíneos e está relacionado com a inviabilidade híbrida a partir da F2, ressaltando, mais uma vez, a importância das análises da viabilidade híbrida até, pelo menos, a segunda geração. 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).

O conceito de especiação críptica apontado para *T. sordida* por Noireau et al. (1998) está pautado em espécies morfológicamente indistinguíveis que foram classificadas dentro de apenas um táxon nominal (BICKFORD et al., 2007). Esse conceito já foi erroneamente considerado como sinônimo de espécies irmãs, as quais conotam ancestralidade comum e não necessariamente relação morfológica (SÁEZ; LOZANO, 2005; BICKFORD et al., 2007). Além disso, espécie críptica também foi associada de forma errada com eventos recentes de especiação que ainda não resultaram na fixação de diferenças morfológicas (KNOWLTON, 1993; GUSTAFSSON et al., 2014; STRUCK et al., 2018).

Do ponto de vista cromossômico, molecular, izoensimático e pelo padrão de hidrocarbonetos cuticulares, *T. sordida* se diferencia em mais de um táxon (PANZERA et al., 1997, 2015; NOIREAU et al., 1998; CALDERÓN-FERNÁNDEZ e JUÁREZ, 2013). Contudo, embora todos os autores assumam que a variação intraespecífica observada em *T. sordida* seja resultado de especiação críptica, estudos morfológicos são necessários para comprovar esse evento evolutivo (uma vez que divergências morfológicas derrubam a hipótese de especiação críptica), pois a única comparação morfológica realizada em *T. sordida* proveniente de diferentes países (Brasil, Bolívia e Argentina) foi realizada por Nattero et al. (2017) que diferenciaram *T. sordida* da Argentina dos exemplares provenientes do Brasil e da Bolívia a partir de dados morfométricos da asa, ressaltando a importância de estudos adicionais para confirmar a validade específica do(s) novo(s) táxon(s). Além disso, com base na diferenciação fenotípica de *T. sordida* da Argentina quando comparada às outras localidades, Nattero et al. (2017) sugerem que a(s) nova(s) espécie(s) putativa(s) de *T. sordida* pode(m) não ser críptica(s).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Com base na sua importância epidemiológica e, diante da necessidade de se expandir o conhecimento acerca da questão taxonômica de *T. sordida*, o presente estudo teve como objetivo realizar uma análise multidisciplinar e integrada de aspectos evolutivos dessa espécie com ênfase no fenômeno de especiação críptica, por meio de análises envolvendo genética de populações, sistemática filogenética e a realização de cruzamentos experimentais interespecíficos.

2.2. Objetivos Específicos

- a) Caracterizar, por meio de marcadores citogenéticos, as populações brasileiras de *T. sordida*, representando a diversidade de diferentes biomas;
- b) Utilizar marcadores mitocondriais (CytB e ND1) para inferir a estruturação populacional, a distância genética, e determinar as variantes genéticas das populações de diferentes localidades brasileiras, por meio da identificação e quantificação de sítios polimórficos, diversidade e diferenças nucleotídicas e haplotípicas;
- c) Utilizar sequências inéditas de marcadores nuclear (ITS-1) e mitocondriais (Cyt B e ND1), combinados com sequências disponíveis no GenBank, para uma análise filogenética dos exemplares de *T. sordida* provenientes do Brasil, Argentina e Bolívia, a fim de se estabelecer as relações evolutivas entre os mesmos;
- d) Realizar cruzamentos experimentais intraespecíficos entre exemplares de *T. sordida* do Brasil, Argentina e Bolívia, e avaliar a sua dinâmica evolutiva, por meio da análise da cópula intraespecífica, da oviposição, da taxa de eclosão dos ovos e da viabilidade dos híbridos resultantes;
- e) Analisar a viabilidade reprodutiva dos híbridos, por meio de análises citogenéticas da espermatogênese e do padrão de pareamento entre os cromossomos homeólogos de machos adultos, bem como por meio da análise morfológica das gônadas masculinas, com ênfase na disgenesia gonadal;
- f) Analisar o padrão de segregação das características fenotípicas dos parentais e híbridos experimentais, por meio da morfologia externa, morfometria geométrica e caracterização das genitálias masculina e feminina por microscopia de varredura.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção do material biológico

Os indivíduos da espécie estudada foram cedidos pelo “Insetário de Triatominae”, instalado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Câmpus de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – FCFAR-UNESP, sob a coordenação do Prof. Dr. João Aristeu da Rosa, bem como pelos insetários da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) do Rio de Janeiro, sob coordenação do Dr. Cleber Galvão, e da FIOCRUZ de Minas Gerais, sob coordenação da Dra. Liléia Diotaiuti.

3.1.1. Espécimes utilizados nas análises citogenéticas

Para as análises citogenéticas, os espécimes foram provenientes de pelo menos 19 municípios distribuídos em sete estados brasileiros, representando diferentes biomas (Tabela 2). Foram analisados em torno de 100 adultos machos provenientes dos municípios descritos, com pelo menos três exemplares de cada localidade.

Vale ressaltar que esses indivíduos já se encontravam fixados e armazenados no Laboratório de Biologia Celular (IBILCE/UNESP), porém, uma vez que sua fixação tinha inicialmente uma finalidade citogenética (solução de 3 ml de metanol para 1 ml de ácido acético), os mesmos não puderam ser aproveitados para as análises moleculares, resultando assim em uma maior amostragem para as análises citogenéticas, e envolvendo também uma amostragem de localidades distintas.

Tabela 2. Localidades dos estados e biomas das populações analisadas citogeneticamente.

Estados	Localidades amostradas	Biomas
Bahia	Seabra, Macaúbas e Boquira	Caatinga
Goiás	Posse	Cerrado
Goiás	São Luiz dos Montes Belos	Cerrado
	Guarani do Goiás	Cerrado
Mato Grosso	Rondonópolis	Cerrado
Mato Grosso do Sul	Rio Verde de Mato Grosso	Cerrado e Pantanal
	Corumbá	Pantanal
	Brasilândia	Mata Atlântica e Cerrado

Minas Gerais	Matias Cardoso e Monte Azul	Cerrado e Caatinga
	Itinga	Mata Atlântica
	Lontra	Cerrado
Rio Grande do Sul	São Francisco de Assis	Pampas e Mata Atlântica
São Paulo	Mirassol e Guaira	Mata Atlântica e Cerrado
	São Paulo e Castilho	Mata Atlântica

Fonte: Elaborada pela autora.

3.1.2. Espécimes utilizados nas análises populacionais

Em relação às análises populacionais envolvendo os marcadores mitocondriais Cyt B e ND1, os espécimes foram provenientes de nove localidades diferentes, abrangendo quatro estados brasileiros, de acordo com a disponibilidade dos insetários colaboradores. Além disso, também foram utilizadas sequências do gene Cyt B disponíveis no GenBank de mais três localidades: Seabra – BA (número de acesso: MH054940), Monte Azul – MG (MH054941) e Pantanal – MS (KC249292) (Tabela 3).

Tabela 3. Estados e municípios amostrados nas análises populacionais, número de indivíduos analisados em cada localidade (N), ambiente natural e código de identificação (*Voucher*) do espécime coletado.

Estados	Localidades	N	Ambiente	Voucher
Bahia (BA)	Gentio de Ouro	3	P	SI1, SI2, SI3
	Macaúbas	5	P	MAC1, MAC2, MAC3, MAC4, MAC7, MAC8, MAC9
	Seabra*	1	P	SEA1
	Tanhaçu	6	P	TA1, TA2, TA3, TA4, TA5, TA6
Goiás (GO)	Posse	6	P	GO1, GO2, GO3, GO4, GO5, GO6
Minas Gerais (MG)	Brasília de Minas	3	P	BR1, BR2, BR3
	Catuti	6	P	CAT1, CAT2, CAT3, CAT4, CAT5, CAT6
	Monte Azul*	1	P	MA1
	Porteirinha	3	P	POR1, POR2, POR3

	Riacho dos Machados	7	P	RM1, RM2, RM3, RM4, RM6, RM8, RM10
Mato Grosso do Sul (MS)	Corumbá	7	P	COR1, COR2, COR3, COR4, COR5, COR6, COR7
	Pantanal*	1	P	PAN1

*Localidades de sequências depositadas no GenBank; P – Ambiente peridoméstico.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.1.3. Espécimes utilizados nos cruzamentos experimentais e nas análises filogenéticas, morfológicas e morfométricas

Para as análises filogenéticas com os genes mitocondriais Cyt B e ND1 e nuclear ITS-1, análises morfológicas e morfométricas, e a realização dos cruzamentos experimentais intraespecíficos, os exemplares foram obtidos das seguintes procedências - *T. sordida* Argentina: San Miguel (Província de Corrientes) [representando *T. sordida* Argentina de acordo com Panzera et al. (2015)], *T. sordida* Brasil: Corumbá – Mato Grosso do Sul [representando *T. sordida sensu stricto* de acordo com Panzera et al. (2015)] e *T. sordida* Bolívia: La Paz – Apolo [representando *T. sordida La Paz* de acordo com Panzera et al. (2015)].

3.2. Análises Citogenéticas

3.2.1. Preparação Cromossômica

Para as preparações citológicas, os testículos foram removidos dos insetos adultos ainda vivos, e então fixados em etanol-ácido acético (3:1) e estocados em freezer a -20°C. Foi então realizado o esmagamento celular do material, com uma gota de ácido acético 50%. A lamínula foi retirada após o congelamento do material em nitrogênio líquido para fixação do mesmo. As lâminas foram secas em temperatura ambiente e, então, armazenadas em geladeira a 4°C.

3.2.2. Bandamento C e CMA3/DAPI

O protocolo de bandamento-C foi realizado de acordo com Sumner et al. (1972) para a caracterização da heterocromatina constitutiva. O bandamento CMA3/DAPI foi feito segundo

Schmid (1980), com modificações em acordo com Severi-Aguiar et al. (2006) para a diferenciação de regiões heterocromáticas ricas em AT (DAPI⁺) e CG (CMA3⁺).

3.2.3. Orceína Lacto-Acética

O protocolo da técnica de coloração com Orceína Lacto-Acética foi realizado de acordo com De Vaio et al. (1985), com modificações de acordo com Alevi et al. (2012), com ênfase no pareamento entre os cromossomos homeólogos [com base nos estudos de Pérez et al. (2005) e Mendonça et al. (2014)].

3.2.4. Análise do material biológico

Pelo menos 50 células em fase de prófase meiótica (para análise da cromatina) e 50 em metáfase meiótica (para análise dos cromossomos) de *T. sordida* de cada localidade foram analisadas. A análise das preparações pela técnica de Bandeamento-C e Orceína Lacto-Acética foram realizadas por meio de um microscópio de luz Jenaval (ZEISS) acoplado a uma câmera digital e um analisador de imagens Axion Vision LE 4.8 (Copyright 2006–2009 Carl Zeiss Imaging Solutions Gmb H). Já a análise dos preparados com bandeamento CMA3/DAPI foi feita por meio de microscopia de fluorescência (ZEISS-AXIOSKOP e OLYMPUS BX-FLA).

3.3. Análises Moleculares

3.3.1. Extração do DNA Genômico

Para a obtenção da amostra de DNA genômico total, o material genético foi extraído das gônadas, preferencialmente, ou das pernas, quando necessário, de exemplares adultos. As partes dissecadas foram depositadas em microtubos com etanol absoluto e armazenadas em freezer, a -20°C.

O DNA genômico das espécies foi extraído utilizando-se o kit *DNeasy Blood and Tissue* (QIAGEN[®]), de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração, o DNA foi quantificado no espectrofotômetro ND-1000 *NanoDrop* (Uniscience[®]), para determinação de sua concentração e qualidade. Em seguida, 2 µL de cada amostra de DNA genômico foi aplicada em um gel de agarose a 1% para verificar a integridade desse material, o qual foi armazenado em alíquotas de 25 µL a 100 ng/µL, em freezer a -20°C.

3.3.2. Reação de Amplificação

A amplificação dos fragmentos se deu por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), sendo os *primers* utilizados (*Sigma-Aldrich*[®]) dos genes mitocondriais Cyt B e ND1, e da região espaçadora intergênica (ITS-1) descritos na Tabela 4. As reações de amplificação foram realizadas no Laboratório de Citogenética e Molecular de Insetos, sob coordenação da Profa. Dra. Mary Massumi Itoyama, em um termociclador *Veriti Thermal Cycler* (*Applied Biosystems*[®]).

Tabela 4. Sequências dos *primers* dos genes analisados.

Gene	Primers	Comprimento (pb)	Referência
Cyt B	F: 5'- GGACGWGGWATTTATTATGGATC-3' R: 5'- ATTACTCCTCCTAGCTTATTAGGAATTG-3'	~500 pb	MONTEIRO et al., 2004
ND1	F: 5'- TCTGATTCACCCTCAGCAAA - 3' R: 5'- GGAGCGTARGGKTTRRGTTAT - 3'	~ 600 pb	GUERRA, 2016
ITS-1	F: 5'-CGACGCAAGAAGTAGCTG-3' R: 5'-CGTAACAAGGTTTCCGTAGG-3'	~800 pb	TARTAROTTI; CERON, 2005

Fonte: Elaborada pela autora.

As condições padronizadas para as reações de amplificação desses genes foram as seguintes:

- **Cyt B**

- Desnaturação inicial do DNA a 94°C, por 5 minutos;
- Desnaturação (94°C, por 30 segundos)
- Anelamento (45-50°C, por 30 segundos),
- Extensão (72°C, por 2 minutos),
- Extensão final com um ciclo de 7 minutos a 72°C.

} 35 ciclos

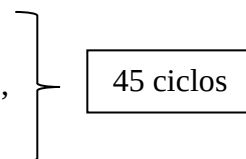
- **ITS-1**

- Desnaturação inicial do DNA a 95°C, por 2 minutos;
- Desnaturação (95°C, por 60 segundos),
- Anelamento (49°C, por 60 segundos),
- Extensão (72°C, por 60 segundos),
- Extensão final com um ciclo de 4 minutos a 72°C.

} 35 ciclos

- **ND1**

- Desnaturação inicial do DNA a 95°C, por 2 minutos;
- Desnaturação (95°C, por 15 segundos)
- Anelamento (50-56°C, por 30 segundos),
- Extensão (72°C, por 90 segundos),
- Extensão final com um ciclo de 5 minutos a 72°C.



Para a reação de amplificação dos fragmentos dos genes mitocondriais, utilizou-se 6,5 µL de GoTaq® Colorless Master Mix (Promega®), 1,0 µL de solução tampão de Cloreto de Magnésio, 0,5 µL de cada um dos *primers forward* e *reverse*, 2,5 µL de DNAg e 14,0 µL de água deionizada para completar o volume final de mix para 25 µL.

Em relação à amplificação do gene nuclear ITS-1, foram realizadas algumas modificações para sua otimização, sendo então utilizados 6,5 µL de GoTaq® Colorless Master Mix (Promega®), 0,75 µL de solução tampão de Cloreto de Magnésio, 2,0 µL de cada um dos *primers forward* e *reverse*, 2,5 µL de DNAg e 11,25 µL de água deionizada para completar o volume final de mix para 25 µL.

Após a amplificação dos genes, os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (D1 AGAROSE LOW EOO – Laboratórios CONDA). Para o gene nuclear ITS-1, a separação se deu em gel de agarose a 1,5%, a uma voltagem de 90V, por cerca de 120 minutos. Já para os genes mitocondriais, a corrida se deu em gel de agarose a 1,0%, a uma voltagem de 90V, por 60 minutos. Ambos os géis foram corados com o agente intercalante brometo de etídio (*Sigma-Aldrich*®) a fim de confirmar a amplificação, sendo visualizados em um transluminador UV e digitalizados. Para análise do peso molecular dos fragmentos obtidos, foi utilizado como marcador de peso molecular a *DNA Ladder 1KB Plus* (*Invitrogen*®).

Posteriormente, os fragmentos separados pela eletroforese foram purificados utilizando-se o Kit *GFX PCR DNA & Gel Band* (*GE Healthcare and Life Technology*®), de acordo com as instruções do fabricante. Realizou-se a quantificação dessas amostras e esse material foi, então, submetido para sequenciamento direto no sequenciador ABI 3730 DNA Analyser (Life Technologies – Applied Biosystems), do Centro de Pesquisa sobre Genoma Humano e Células-Tronco da Universidade de São Paulo/Brasil, conforme realizado por Guerra (2016).

3.4. Análises populacionais

3.4.1. Análise das sequências obtidas

Para a análise do sequenciamento e verificação da validade das sequências obtidas, foi realizada a edição das sequências no software *BioEdit Alignment Editor* 7.0.5.3 (HALL, 1999), e também foi feito o alinhamento múltiplo por meio da ferramenta *ClustalW Multiple Alignment* (THOMPSON et al., 1994), seguido de inspeção manual. A busca por identidade das sequências semelhantes às obtidas neste trabalho foi realizada no banco de dados do NCBI *GenBank* (*National Center for Biotechnology Information*), utilizando-se a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).

Como grupo externo (*outgroup*) para as análises populacionais e para fins de calibração das árvores filogenéticas, foram utilizadas sequências disponíveis no *GenBank* de *T. infestans* para o gene Cyt B (AY702023), e de *T. brasiliensis* para o gene ND1 (AM980619), uma vez que estas já se mostraram eficientes para alguns estudos filogenéticos na subfamília Triatominae (MAS-COMA; BARGUES, 2009; MENDONÇA et al., 2009; GARDIM et al, 2014).

3.4.2. Estatística Descritiva

As análises de estatística descritiva, que visam quantificar a variação presente nas sequências de DNA, foram realizadas pelo programa DnaSP v. 6.12.01 (ROZAS et al., 2017). Para tal, foram estimados os seguintes parâmetros: quantidade de sítios polimórficos ou segregantes (S) – número de sítios que mostram variação entre as sequências amostradas e os sítios monomórficos; número de haplótipos (H) - número de combinações de um grupo de alelos de loci adjacentes, que fazem parte do mesmo cromossomo, geralmente herdados como uma unidade; diversidade haplotípica (Hd) – medida da variação genética considerando o número real de mudanças de base entre as sequências; diversidade nucleotídica (π) – número médio de diferenças nucleotídicas por sítio entre duas sequências; número médio de diferenças nucleotídicas (k) – média das diferenças nucleotídicas entre pares de sequências tomadas ao acaso na amostra; e o número total de mutações encontradas (η ou Eta) - número total de mudanças na sequência de nucleotídeos do material genético amostrado

Por meio do software MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) v.6 (TAMURA et al., 2013) foi estimada a porcentagem média de cada uma das bases

nitrogenadas (A, T, C e G) na composição das sequências de mtDNA dos indivíduos amostrados.

3.4.3. Distância Genética

As matrizes de distância genética entre os espécimes das diferentes localidades foram obtidas com o auxílio do programa MEGA v.6 (TAMURA et al., 2013), utilizando-se o modelo de correção Kimura-2-parâmetros (K2P) (KIMURA, 1980).

3.4.4. Análise de Variância Molecular (AMOVA)

Por meio do programa Arlequin v.5.2.2 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010) foi realizada a Análise de Variância Molecular (AMOVA), construída a partir da análise hierárquica da variância por meio da estatística F ou estatística F de Wright, que estabelece uma partição da variação total em componentes de covariância, devido à diferença entre indivíduos dentro de populações (F_{ST}), entre populações do mesmo grupo (F_{SC}) e entre grupos (F_{CT}). Especificamente, o valor de F_{ST} indica o grau de endogamia devido à diferenciação entre subpopulações em relação à população total. Se há altas taxas de fluxo gênico entre os grupos analisados, o valor de F_{ST} é baixo, enquanto que baixas taxas de fluxo gênico podem levar a um aumento na endogamia, tornando o valor de F_{ST} alto.

Para a realização da análise hierárquica, foi necessário agrupar as populações, atribuindo números diferentes para cada grupo (EXCOFFIER et al., 1992). Para ambos os genes, foi analisado o mesmo agrupamento, estabelecido pelos seguintes critérios: formação de três grupos de populações, de acordo com a região ou estado – Grupo 1: indivíduos das localidades de Minas Gerais e Goiás (Brasília de Minas, Catuti, Monte Azul, Porteirinha, Riacho dos Machados e Posse); Grupo 2: indivíduos das localidades da Bahia (Gentio do Ouro, Macaúbas, Seabra e Tanhaçu); e Grupo 3: indivíduos das localidades de Mato Grosso do Sul (Corumbá e Pantanal).

3.4.5. Análises Filogenéticas

As análises filogenéticas foram realizadas por meio do critério de Inferência Bayesiana. Os métodos bayesianos partem do mesmo arcabouço matemático da estimativa de Máxima Verossimilhança [do inglês, *Maximum Likelihood* (ML)]. Entretanto, enquanto nos

métodos ML os parâmetros são considerados constantes desconhecidas fixas, nas análises Bayesianas os parâmetros do modelo são considerados como variáveis aleatórias com distribuições estatísticas. Antes da análise dos dados, são atribuídos aos parâmetros uma distribuição *a priori*, que é, então, combinada com os dados (ou suas verossimilhanças) para gerar a distribuição *a posteriori*, que serve de base para as inferências sobre os parâmetros que devem ser estimados (WHELAN et al., 2001; YANG; RANNALA, 2012).

A análise de Inferência Bayesiana foi realizada no software MrBayes v.3.2.2. (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003). A escolha do melhor modelo de substituição nucleotídica se deu por meio do *software jModelTest* (DARRIBA et al., 2012), calculado por meio do critério de informação Akaike (AIC). Utilizou-se o modelo *Generalised Time-Reversible* com sítios invariáveis (GTR + I) para o gene Cyt B e o modelo *Hasegawa-Kishino-Yano* com taxa de distribuição gama e uma proporção de sítios invariáveis (HKY + G + I) para o gene ND1. O suporte dos ramos foi estimado utilizando a análise de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985), calculada em 1000 réplicas. As cadeias de Markov foram iniciadas com uma árvore aleatória e o número de gerações foi de 20.000.000, amostradas a cada 2.000 gerações. Os primeiros 25% das árvores foram descartadas. O *software Tracer* v. 1.6.0 (RAMBAUT et al., 2013) foi utilizado para verificar o momento de estabilização (valores de ESS acima de 200) das amostragens das árvores. A visualização e edição da árvore gerada foi realizada com o auxílio do programa *FigTree* v.1.4.3. (RAMBAUT, 2016).

3.5. Avaliação do status específico de *T. sordida* Argentina

3.5.1. Identificação morfológica e descrição

A descrição de *T. rosai* sp. nov incluiu a utilização de 14 exemplares adultos (sete machos e sete fêmeas), provenientes da localidade de San Miguel - Província de Corrientes/Argentina, anteriormente caracterizados como *T. sordida* com base na chave dicotômica de Lent e Wygodzinsky (1979). A comparação de *T. rosai* sp. nov. foi realizada com nove espécimes machos e nove espécimes fêmeas de *T. sordida* provenientes do município de Riacho dos Machados - Minas Gerais (MG)/Brasil.

3.5.2. Análises morfológicas

3.5.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura

Para a caracterização morfológica dos insetos no Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) [de acordo com Rosa et al. (2012)], quatro indivíduos de cada localidade (dois machos e duas fêmeas) foram utilizados, com ênfase ao estudo do pronoto, escutelo (Figura 9), bem como da genitália externa feminina (Figura 10). Para esse estudo, as amostras foram limpas em aparelho de ultrassom, desidratadas em série alcoólica, secas em estufa a 45° por 20 min e, em seguida, fixadas em pequenos cilindros de alumínio com esmalte incolor. Posteriormente, foram metalizadas por “sputtering” durante dois minutos com potência de 10mA em aparelho da marca “Sputter” SCD 050. Após o processo de metalização, as amostras foram analisadas e fotodocumentadas em MEV Topcon SM-300.

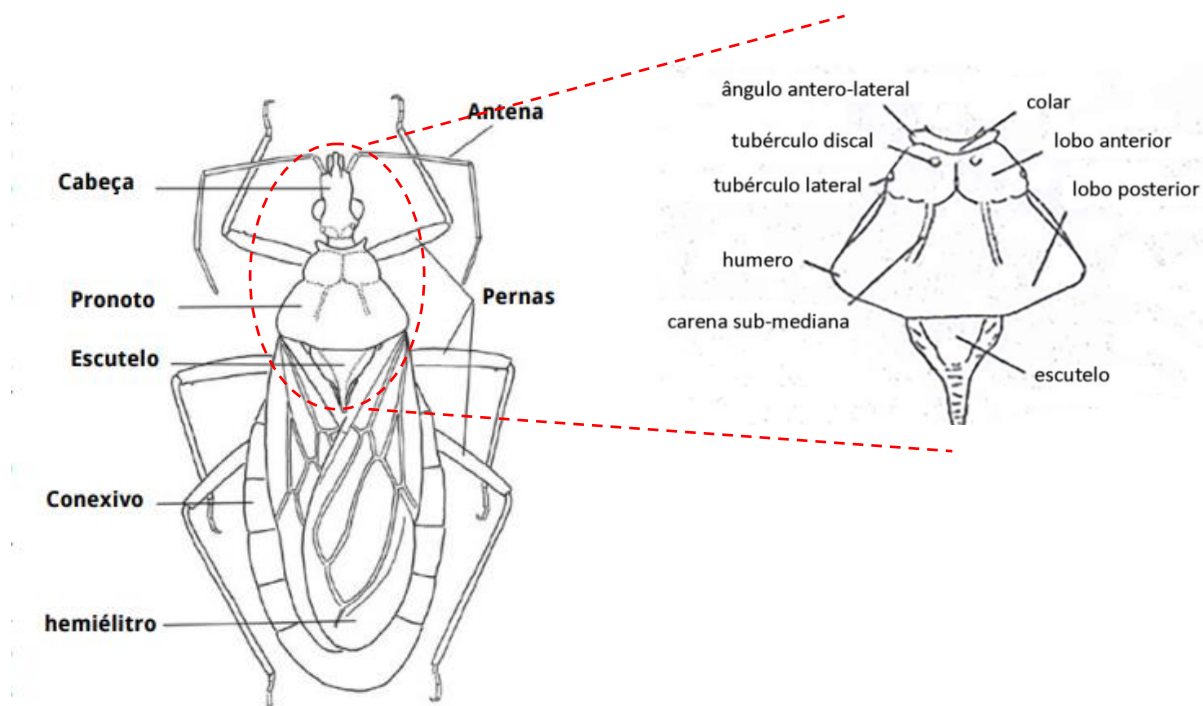
3.5.2.2. Microscopia de Luz

Para a caracterização morfológica no Microscópio de Luz (ML), foram utilizados seis indivíduos de cada localidade (três machos e três fêmeas), sendo utilizadas imagens da cabeça do macho, pronoto (Figura 9) e das genitálias (Figura 10). As análises fenotípicas foram realizadas em microscópio estereoscópio Leica MZ APO, com sistema de análise de imagem Motic Advanced 3.2 plus acoplado.

3.5.2.3. Morfologia interna

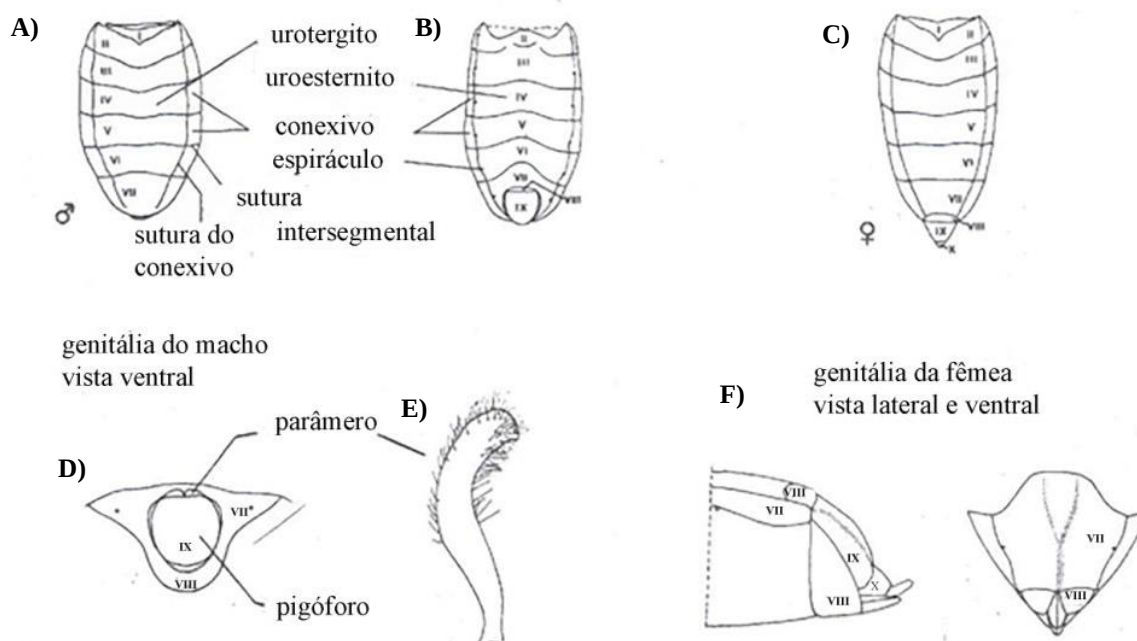
Assim como realizado por Almeida e Carareto (2002) para híbridos de *Drosophila*, a morfologia das gônadas dos híbridos resultantes dos cruzamentos experimentais entre os espécimes dos citótipos *T. sordida sensu stricto* e *T. sordida* La Paz foi analisada e fotodocumentada em microscópio estereoscópio Leica MZ APO com sistema de análise de imagem Motic Advanced 3.2 plus, para avaliar a presença do fenômeno de disgenesia gonadal (que pode ser uni ou bilateral). Para isso, foram utilizados, pelo menos, cinco exemplares machos adultos de cada geração, que foram dissecados e tiveram suas gônadas analisadas. Como grupo controle, as gônadas de, pelo menos, cinco parentais machos também foram dissecadas e caracterizadas para fins de comparação.

Figura 9. Morfologia geral de um barbeiro, com pronoto e escutelo em detalhes.



Fonte: Adaptada de Galvão, 2014.

Figura 10. Morfologia de *Triatoma rubrofasciata*. Abdômen do macho: A – vista dorsal, B – ventral; Abdômen da fêmea: C – dorsal, D – genitália do macho, E – parâmero em detalhe, F – genitália da fêmea, vista lateral e ventral.



Fonte: Adaptado de Lent e Wygodzinsky (1979).

3.5.3. Análises morfométricas

Para as análises de mensuração, foram utilizados 14 espécimes adultos de *T. rosai* sp. nov. (sete machos e sete fêmeas) e 18 de *T. sordida* (MG/Brasil) (nove machos e nove fêmeas). As medidas da cabeça, tórax, abdômen, pronoto e do escutelo foram realizadas com microscópio estereoscópio Leica MZ APO com sistema de análise de imagem Motic Advanced 3.2 plus acoplado. Os dados obtidos foram organizados em uma planilha no programa Excel 2007® e apresentados na forma de tabela. As medidas dos parâmetros tórax e abdômen foram analisadas estatisticamente no software GraphPad Prism version 7.00 para Windows, utilizando-se o teste-t de Welch. O teste-t de Welch é uma adaptação do teste t de Student mais confiável quando as duas amostras possuem variâncias e tamanhos de amostra desiguais.

3.5.4. Reconstrução filogenética

Para a reconstrução da árvore filogenética dos exemplares de *T. sordida* provenientes da Argentina, Brasil e Bolívia, sequências inéditas dos genes analisados (Cyt B, ND1 e ITS-1) foram combinadas com sequências disponíveis no GenBank. Como grupo externo para polarização da árvore, foram utilizadas sequências da espécie *Panstrongylus megistus*. Além disso, para garantir que os representantes de *T. sordida* Argentina não eram *T. garciabesi* ou *T. guasayana* identificados incorretamente pela sua morfologia semelhante, sequências desses triatomíneos também foram utilizadas para confirmação (Tabela 5).

As sequências foram alinhadas por meio do programa MEGA X, utilizando-se o método *Muscle*. Os alinhamentos foram então submetidos ao programa *jModeltest2* para avaliação do melhor modelo de substituição de nucleotídeos. Pelo teste AIC, os melhores modelos para os genes 16S, 28S, COI, Cyt B e ITS-1 foram HKY + G, GTR, GTR + G, HKY + I + G e HKY, respectivamente. Posteriormente, as sequências foram concatenadas pelo nome com o auxílio do programa *SeaView 4* e submetidas ao programa MrBayes 3.2 para obtenção da filogenia de Inferência Bayesiana. Uma análise particionada foi realizada com um total de 100 milhões de gerações, sendo a amostragem das árvores a cada 1000 gerações, em duas corridas independentes, com burn-in definido para 25% das amostras. O software *Tracer* v. 1.6.0 foi utilizado para verificar o momento de estabilização (valores de ESS acima de 200) das amostragens das árvores. A visualização e edição da árvore gerada foi realizada novamente com o auxílio do programa *FigTree* v.1.4.3.

Tabela 5. Espécies analisadas, distribuição geográfica e número de acesso do GenBank para cada marcador molecular utilizado.

Espécies	Origem geográfica	Marcadores moleculares				
		COI	Cyt B	28S	16S	ITS-1
<i>T. sordida</i>	Seabra, BA, Brasil	MH029692	MH054940	MG417085	-	*
<i>T. sordida</i>	Posses, GO, Brasil	MH029695	*	MH059640	-	-
<i>T. sordida</i>	Monte Azul, MG, Brasil	MH029693	MH054941	MG417086	-	-
<i>T. sordida</i>	Pantanal, MS, Brasil	MH029694	KC249292	KC249210	KC249075	-
<i>T. sordida</i>	San Miguel, Corrientes-Argentina	MH029697	*	MG417088	-	*
<i>T. sordida</i>	San Miguel, Corrientes-Argentina	KC249387	KC249295	KC249213	KC249078	-
<i>T. sordida</i>	Apolo, La Paz-Bolívia	MH029696	MH054942	MH059641	-	*
<i>T. garciabesi</i>	Rivadavia, Salta-Argentina	MH029698	MH054943	MG417089	-	-
<i>T. garciabesi</i>	Rivadavia, Salta-Argentina	KC249338	KC249249	KC249158	KC249006	-
<i>T. guasayana</i>	Santa Cruz, Bolívia	KC249343	KC249252	KC249162	KC249011	-
<i>P. megistus</i>	Nova Prata, RS, Brasil	KC249308	KC249228	KC249136	KC248970	AM949580

*sequências inéditas; - sequências indisponíveis.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.6. Cruzamentos experimentais

3.6.1. Delineamento do estudo

A escolha da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCFAR/UNESP, Câmpus de Araraquara) como sede para o estudo se deu em função da unidade apresentar o maior insetário de triatomíneos vivos do mundo (com mais de 180 colônias distribuídas entre mais de 40 espécies), sob coordenação do Prof. Dr. João Aristeu da Rosa. O insetário foi recentemente reestruturado com recurso da FAPESP (Auxílio FAPESP/Programa de Infraestrutura nº 2009/54911-9) e apresenta toda a infraestrutura e biossegurança necessárias para a realização dos cruzamentos experimentais e manutenção dos híbridos.

Os cruzamentos experimentais entre *T. sordida* provenientes do Brasil, Argentina e Bolívia foram realizados em ambas as direções, e cruzamentos entre os parentais provenientes do mesmo país também foram realizados e utilizados como parâmetro de comparação (grupo controle) (Tabela 6) (MARTINEZ-IBARRA et al., 2008). Para garantir que toda a prole seja resultante do cruzamento experimental, foram utilizadas ninfas de quinto instar 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.

Tabela 6. Cruzamentos experimentais “interespecíficos” e intraespecíficos realizados entre *T. sordida* provenientes do Brasil, Argentina e Bolívia.

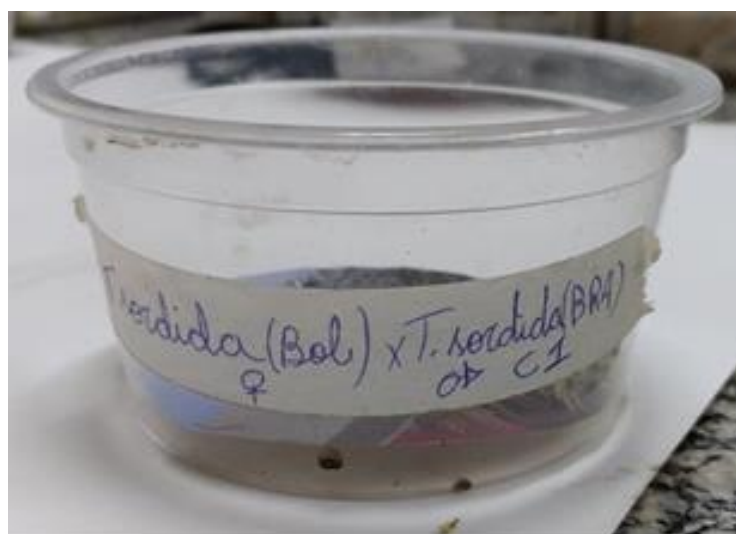
Cruzamentos Experimentais				
Cruzamento 1				
♀	<i>T. sordida</i> Brasil	X	<i>T. sordida</i> Argentina	♂
♀	<i>T. sordida</i> Argentina	X	<i>T. sordida</i> Brasil	♂
Cruzamento 2				
♀	<i>T. sordida</i> Brasil	X	<i>T. sordida</i> Bolívia	♂
♀	<i>T. sordida</i> Bolívia	X	<i>T. sordida</i> Brasil	♂
Cruzamento 3				
♀	<i>T. sordida</i> Argentina	X	<i>T. sordida</i> Bolívia	♂
♀	<i>T. sordida</i> Bolívia	X	<i>T. sordida</i> Argentina	♂
Cruzamentos intraespecíficos				

♀	<i>T. sordida</i> Bolívia	X	<i>T. sordida</i> Bolívia	♂
♀	<i>T. sordida</i> Argentina	X	<i>T. sordida</i> Argentina	♂
♀	<i>T. sordida</i> Brasil	X	<i>T. sordida</i> Brasil	♂

Fonte: Elaborada pela autora.

Para garantir a viabilidade dos cruzamentos e aumentar a confiabilidade dos resultados, pelo menos seis casais “interespecíficos”, entre localidades (sendo três réplicas para cada direção) e três casais intraespecíficos (parentais) foram formados. 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) (Figura 11), em temperatura ambiente e foram alimentados semanalmente com sangue de pato, uma vez que as aves são refratárias à infecção pelo *T. cruzi* (RASSI JR; RASSI; MARCONDES DE REZENDE, 2012).

Figura 11. Exemplo de recipientes em que os cruzamentos experimentais foram realizados.



Fonte: Imagem cedida pelo Prof. Dr. Kaio Cesar Chaboli Alevis.

Os casais foram acompanhados rotineiramente para análise e possível fotodocumentação das cópulas, assim como realizado por Campos-Soto et al. (2016). Semanalmente, os ovos foram coletados, contabilizados e separados em um novo recipiente para avaliar a taxa de eclosão, sendo que os ovos foram observados por, pelo menos, 25 dias após a oviposição, conforme sugerido por Martinez-Ibarra et al. (2008). Após a eclosão das ninfas “híbridas”, o desenvolvimento (N1 até N5) e a taxa de mortalidade também foram

contabilizadas semanalmente (BELISÁRIO et al., 2007). Ao atingirem o quinto instar (N5), novamente três casais de ninfas “híbridas” F1 resultantes de cada cruzamento interespecífico foram separados para formação de novos cruzamentos, sendo os mesmos parâmetros descritos acima utilizados novamente na avaliação (e assim sucessivamente, até chegar em F3, com o intuito de avaliar o desmoronamento do híbrido). Justificamos que, para todos os dados quantitativos coletados, a frequência relativa (%) foi calculada.

4. RESULTADOS

Os resultados serão apresentados na forma de quatro artigos científicos.

4.1. Capítulo I (Artigo científico publicado na revista *The American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, FI: 2,453)

MADEIRA, F. F.; REIS, Y. V.; BITTINELLI, I. F.; DELGADO, L. M. G.; OLIVEIRA, J.; MENDONÇA, V. J.; MOREIRA, F. F. F.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V.; ROSA, J. A.; ALEVI, K. C. C. Genetic structure of Brazilian populations of *Triatoma sordida* (Stål, 1859) (Hemiptera, Triatominae) by means of chromosomal markers. **The American Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, Arlington, v. 100, n. 4, p. 907-910, 2019. DOI: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0336>. Disponível em: <https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/100/4/article-p907.xml>. Acesso em: 14 set. 2021.

Genetic structure of Brazilian populations of *Triatoma sordida* (Stål, 1859) (Hemiptera, Triatominae) by means of chromosomal markers

Abstract

Triatoma sordida is among the main Brazilian species considered as Chagas disease vectors. The genetic studies are directed mainly to phylogenetic questions, because these species possibly has suffered cryptic speciation. Furthermore, there are few studies that analyzed the structure and genetic variability of specimens from Brazil and that showed low genetic diversity and strong genetic structuring of the population samples. Therefore, due to great epidemiological importance of *T. sordida* and mainly the restriction of genetic characterization of this vector only for populations of Minas Gerais state, this paper performs a genetic analysis of the *T. sordida* from seven different Brazilian states (representing different biomes), by means of cytogenetic markers. All analyzed specimens presents the same cytogenetic characteristics: early meiotic prophase with several heterochromatic bodies dispersed in the nucleus (CG-rich), being one of them formed by the associated sex chromosomes surrounded by some autosomal heterochromatic regions, meiotic metaphase with most autosomal pairs exhibiting a C-heterochromatic block in one chromosomal end

(CG-rich), Y sex chromosome fully heterochromatin (AT-rich) and X chromosome may present a small C-block (CG-rich). These results are important because the chromosomal markers enable to confirm and expand the low genetic diversity for all Brazilian states occupied by *T. sordida*, suggesting that all Brazilian populations were originated from a small ancestral population and possibly dispersed to other biomes by founder effect. In addition, we suggest that *T. sordida* from Brazil are not suffering cryptic speciation and we confirm the classification of all Brazilian examples as *T. sordida sensu stricto*.

Keywords: population genetics; cytogenetic markers; cryptic speciation; Triatominae subfamily; Chagas Disease.

1. Introduction

The Chagas disease is a neglected disease considered as a potentially life-threatening illness caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909), distributed mainly in endemic areas of 21 Latin American countries, where it is mostly vector-borne transmitted to humans by contact with feces of triatomines.¹ It is estimated that about 8 million people are infected worldwide, mostly in Latin America where Chagas disease is endemic.¹

Presently, there are 154 species of triatomines, distributed in 18 genera and five tribes, being all species considered as potential vector of Chagas disease.²⁻⁴ In Brazil, there are 68 species distributed throughout the country's 27 states, and 64% of them are endemic species.⁵⁻⁸ *Triatoma infestans* (Klug, 1834), *T. brasiliensis* Neiva, 1911, *T. pseudomaculata* Corrêa and Espínola, 1964, *T. sordida* (Stål, 1859) and *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) are the main species of triatomines related to the domestic transmission of Chagas disease.^{5,9}

Triatoma sordida is distributed in 14 Brazilian states (Acre, Bahia, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Maranhão, Minas Gerais, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo and Tocantins)^{5,10,11}, being considered the species with the highest frequency of domiciliary captures in Brazil.⁵ Although *T. sordida* exhibits endemism centered in the Cerrado, this species is also prevalent in Bahia and the states of the Southeast and Midwest regions of Brazil, including transition areas to the Amazon,^{5,11} occupying thus other biomes besides the Cerrado: Pantanal, Atlantic forest and Caatinga.¹⁰

The epidemiological importance of *T. sordida* is increasing due to its tendency to invade houses, particularly in areas where *T. infestans* has been controlled,¹²⁻¹⁴ being thus considered as “semi-domestic”.¹⁵ The anthropic activities have influence in the richness of

this species, because the areas of higher occurrence of *T. sordida* are the ones related to the agricultural activities in the past, what could explain its presence in areas that suffered ecologic impact due to significant loss of vegetation.¹⁶ Furthermore, *T. sordida* also is associated with the reinfestation of dwellings treated with insecticides.¹⁷

Although *T. sordida* exhibits wide geographic distribution in Brazil^{5,10,11} genetic studies are directed mainly to phylogenetic questions¹⁸⁻²², because this species is also found in Argentina, Bolivia, Paraguay and Uruguay⁵, and possibly has suffered cryptic speciation.¹⁹⁻²¹ Furthermore, there are exact studies that analyzed the genetic structure and genetic variability of specimens from Minas Gerais, Brazil that showed low genetic diversity and strong genetic structuring of the population samples.^{22,23}

Recently, Pessoa et al.²³ related to low genetic diversity and strong genetic structuring of the population samples of *T. sordida* with five possible factors: possible geographical isolation due to an obstacle to Triatominae flow between neighboring localities, focal distribution of insects in small colonies usually comprised of a few individuals, thereby limiting gene flow between them; the low dispersal capacity of *T. sordida*, the long Triatominae life cycle, which ensures that contributions from young adults able to reproduce (and consequently exchange genetic material) occurs over long intervals that differ among triatomine species and continuous pressure from insecticides used since the 1950s to triatomines control.

As Chagas disease has no cure and treatment with benznidazole and nifurtimox are more effective in the acute phase of the disease (which is often asymptomatic)¹, vector control is the most effective method of preventing this neglected disease¹ and all knowledge about these hematophagous insects is important and can generate subsidies to assist the vector control programs. Thus, due to great epidemiological importance of *T. sordida* in Brazil and mainly the restriction of genetic characterization of this vector only for populations of Minas Gerais state, this paper performs a genetic analysis of the *T. sordida* from seven different Brazilian states representing different biomes, by means of cytogenetic markers.

2. Material and Methods

2.1 Material

One hundred adult males coming from the municipalities described in Table 1 (at a minimum three copies of each locality) were used in the study (males were utilized because spermatogenesis is continued in adulthood, allowing the visualization of chromatin and

chromosomes). The triatomines were provided by the insectariums of FCFAR/UNESP, Araraquara, SP, Brazil, of IOC/FIOCRUZ, Rio de Janeiro RJ, Brazil and of CPqRR/FIOCRUZ, Belo Horizonte, MG, Brazil. The characterization of biomes was performed according to the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE).²⁴

2.2 Chromosome preparation

For cytological preparations, testes were removed from adult insects alive, fixed in an ethanol–acetic acid (3:1) and stored at -20°C. Squashes were made in a 50% acetic acid drop, coverslips were removed after freezing in liquid nitrogen and the slides were air dried and then stored at 4°C.

2.3 C and CMA₃/DAPI banding

C-banding was performed according to Sumner et al.²⁵ for the characterization of constitutive heterochromatin and CMA₃/DAPI banding was performed according to Schmid²⁶, with modifications according to Severi-Aguiar et al.²⁷, for differentiating the regions of heterochromatin rich in AT (DAPI⁺) and CG (CMA₃⁺).

2.4 Analysis of biological material

At least 50 cells in prophase (for analysis of the chromatin) and 50 in metaphase (for analysis of the chromosomes) of *T. sordida* from each location were analyzed. The analysis of C-banding preparations was made using a Jenaval light microscope (Zeiss) attached to a digital camera and an Axio Vision LE 4.8 image analyzer (Copyright 2006–2009 Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH) and of CMA₃/DAPI banding preparation was analyzed using in fluorescence microscopy Zeiss-Axioskop and Olympus BX-FLA.

3. Results

All analyzed specimens, regardless the locality (Table 1) presents the same cytogenetic characteristic: C-Banding: during early meiotic prophase, several heterochromatic bodies are observed, being one of them formed by the associated sex chromosomes surrounded by some autosomal heterochromatic regions (Fig 1A, *); Furthermore, during the meiotic metaphase the most autosomal pairs present a C-heterochromatic block in one chromosomal end and X chromosome may present a small C-block (Fig 1B) (Y sex

chromosome is heterochromatin in all species of triatomine); CMA₃/DAPI Banding: several bodies CG-rich dispersed in the nucleus of early meiotic prophase, being one of them formed by the association of the X sex chromosome surrounded by some autosomal (Fig 1C, *) and Y sex chromosome AT-rich DNA (Fig 1D).

4. Discussion

Cytogenetic markers have been used because initially Panzera et al.¹⁹ differentiated *T. sordida* from Brazil and Argentina by the pattern of heterochromatin. Recently Panzera et al.²¹ and Bardella et al.²⁸ recognized three chromosomal taxa for *T. sordida* (*T. sordida sensu stricto*, *T. sordida Argentina* and *T. sordida La Paz*). Panzera et al.²¹ analyzed Brazilian representatives from Minas Gerais, Piauí and Mato Grosso with C-banding and observed the same results that we observed for all analyzed specimens. Beyond that, we characterized the composition of DNA rich in AT and CG in chromatin of these vectors and all the specimens of *T. sordida* analyzed showed the same disposition in chromatin and chromosomes.

These results are important because the chromosomal markers enable confirm and expand the results described by Pessoa et al.²³ and Monteiro et al.²² for all Brazilian states occupied by *T. sordida*. In addition, the low genetic diversity can also be confirmed by the low genetic distance observed between *T. sordida* from different Brazilian states [for example, 0.011 among populations of Mato Grosso (Pocotó) and Mato Grosso do Sul (Pantanal) with the cytochrome oxidase I gene; 0.007 among populations of Mato Grosso (Rondonópolis) and Mato Grosso do Sul (Pantanal) with cytochrome oxidase II gene; and 0.006 among populations from municipalities in the state of Mato Grosso (Rondonópolis and Pocotó), and 0.004 and 0.002 distance observed between Rondonópolis and Pantanal and Pocotó and Pantanal, respectively, both with the 16S rDNA gene]²⁹ and by the low variability of the wing geometry of *T. sordida* observed recently among populations from Brazil.³⁰

Some authors suggest that *T. sordida* probably have originated in the Brazilian Cerrado^{16,18,31} and as a consequence of deforestation and *T. infestans* control strategies, it has dispersed towards the south.^{13,14,32} Our results also suggest that all Brazilian populations originated from a small ancestral population (possibly in the Cerrado, as suggested above) and dispersed to other biomes by founder effect (possibly by active dispersal by flight³³ or passive dispersion nymphs associated with bird feathers³⁴). However, since there are evidences that genetic diversity of *T. infestans* is reduced in areas treated with insecticides due to bottleneck events^{35,36}, we cannot also dismiss this hypothesis for *T. sordida*.

Noireau et al.²⁰ reported for the first time the presence of cryptic speciation to *T. sordida* specimens from Bolivia. Monteiro et al.²² analyzed this phenomenon for four populations from Minas Gerais, Brazil and found no cryptic speciation. Our results demonstrate that *T. sordida* Brazilians are not suffering cryptic speciation, because if this evolutionary event was taking place, the results with chromosomal markers would demonstrate differences, as well as were recently observed for specimens of Bolivia.²¹

Besides its importance for the genetic and evolutionary characterization of Brazilian *T. sordida*, cytogenetic analysis confirms that all triatomine present in Brazilian insectariums, initially classified as *T. sordida* by morphology, exhibit the same chromosome pattern characterized by Panzera et al.²¹ as *T. sordida sensu stricto*, assisting directly in the taxonomy of these vectors. In addition, for the first time, *T. sordida* specimens from several Brazilian biomes and mainly representing areas of peridomicile (Rondonópolis and Guaira chicken coops), intradomicile (Mirassol and Miranda's houses) and wild (Corumbá, associated with bird nests) had the genetic diversity analyzed. The low genetic variability observed for *T. sordida* can be an important tool for the control of this species by the vectors programs.

Thus, by means of the cytogenetics study of Brazilian *T. sordida* was observed that this vector species although widely distributed in Brazil has extremely low genetic diversity. Moreover, we confirm the classification of all Brazilian examples as *T. sordida sensu stricto*. Our results are important to direct further studies (such as phylogeography) and, especially, to assist in developing tools for the control of this vector species by vector control programs.

Acknowledgments

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Process number 2013/19764-0 and 2017/05015-7), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

References

1. World Health Organization, 2018. Chagas Disease (American Trypanosomiasis). Available at: <http://www.who.int/chagas/en/>. Accessed April 18, 2018.
2. Oliveira J, Alevi KCC, 2017. Taxonomic status of *Panstrongylus herreri* Wygodzinsky, 1948 and the number of Chagas disease vectors. *Rev Soc Brasil Med Trop* 50: 434–435.

3. 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). *J Vector Ecol* 43: 148–157.
4. Dorn PL, Just 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.
5. Galvão C, 2014. Vetores da doença de chagas no Brasil. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia.
6. 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.
7. Souza ES, Atzinger NCBV, Furtado MB, Oliveira J, Damieli JN, Vendramini DP, Gardim S, Rosa JA, 2016. Description of *Rhodnius marabaensis* sp. N. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from Pará State, Brazil. *Zookeys* 621: 45–62.
8. Rosa JA, Justino HHG, Nascimento JD, Mendonça VJ, Rocha CS, Carvalho DB, Falcone R, Azeredo-Oliveira MTV, Alevi KCC, Oliveira J, 2017. A new species of *Rhodnius* from Brazil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *ZooKeys* 675: 1–25.
9. Silveira AC, Rezende DF, 1984. Epidemiologia e controle da transmissão vetorial da doença de Chagas no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 27: 11–22.
10. Gurgel-Gonçalves R, Galvão C, Costa J, Peterson AT, 2012. Geographic distribution of chagas disease vectors in Brasil based on ecological niche modeling. *J Trop Med* 2012: 1–15.
11. Ramos LJ, Souza JL, Souza CR, Oliveira J, Rosa JA, Camargo LMA, Cunha RM, Meneguetti DUO, 2018. First report of *Triatoma sordida* Stål, 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) in the State of Acre and Brazilian Western Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop* 51: 77–79.
12. Forattini OW, Rabello EX, Ferreira OA, Rocha e Silva EO, Santos JLF, 1984. Aspectos ecológicos da Tripanossomíase americana. XXI. Comportamento de espécies triatomíneas silvestres na reinfestação do intra e peridomicílio. *Rev Saude Publica* 18: 185–208.
13. Diotaiuti L, 1995. Potencial vetorial do *Triatoma sordida*. *Rev Soc Bras Med Trop* 28: 38–41.
14. Diotaiuti L, de Paula OR, Falcão PÇ, Pinto Dias JC, 1995. Avaliação de programa de controle vetorial da doença de Chagas em Minas Gerais, Brasil, com referencia especial ao *Triatoma sordida*. *Bol Ojicina Sanit Panam* 118: 11–219.
15. Coura JR, 1993. O falso dilema sobre a luta antivetorial e as perspectivas de controle da Doença de Chagas no Brasil. *Cad Saude Publica* 9: 514–518.

16. Forattini OP, 1980. Biogeography, origin and distribution of Triatominae domicile dispersal in Brazil. *Rev Saude Publica* 14: 265–299.
17. Pessoa GCD, Obara MT, Rezende JC, de Mello BV, Ferraz ML, Diotaiuti L, 2015. Deltamethrin toxicological profile of peridomestic *Triatoma sordida* in the North of Minas Gerais, Brazil. *Paras Vect* 8: 263–269.
18. Gorla DE, Jurberg J, Catala S, Schofield CJ, 1993. Systematics of *Triatoma sordida*, *T. guasayana* and *T. patagonica* (Hemiptera - Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 88: 379–385.
19. Panzera F, Hornos S, Pereira J, Cestau R, Canale D, Diotaiuti L, Dujardin JP, Prrez R, 1997. Genetic variability and geographic differentiation among three species of triatomine bugs (Hemiptera: Reduviidae). *Am J Trop Med Hyg* 57: 732–739.
20. Noireau F, Gutierrez T, Zegarra M, Flores R, Brenière F, Cardozo L, Dujardin JP, 1998. Cryptic speciation in *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) from the Bolivian Chaco. *Trop Med Int Health* 3: 364–372.
21. Panzera F, Pita S, Nattero J, Panzera Y, Galvão C, Chavez T, Rojas de Arias A, Cardozo Tellez L, Noireau F, 2015. Cryptic speciation in the *Triatoma sordida* subcomplex (Hemiptera, Reduviidae) revealed by chromosomal markers. *Paras Vect* 8: 495–504.
22. Monteiro FA, Jurberg J, Lazoski C, 2009. Very low levels of genetic variation in natural peridomestic populations of the Chagas disease vector *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) in Southeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 81: 223–227.
23. Pessoa GCA, Sousa TN, Sonoda IV, Diotaiuti L, 2016. Assessing the mitochondrial DNA diversity of the Chagas disease vector *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 111: 322–329.
24. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, 2016. Cidades. Available at: <https://cidades.ibge.gov.br/>. Accessed April 18, 2018.
25. Sumner AT, 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res* 75: 305–306.
26. Schmid M, 1980. Chromosome banding in amphibia IV. Differentiation of GC and AT rich regions in Anura. *Chromosoma* 77: 83–103.
27. Severi-Aguiar GD, Lourenço LB, Bicudo HE, Azeredo-Oliveira MTV, 2006. Meiosis aspects and nucleolar activity in *Triatoma vitticeps* (Triatominae, Heteroptera). *Genetica* 126: 141–151.
28. Bardella VB, Pita S, Vanzela ALL, Galvão C, Panzera F, 2016. Heterochromatin base pair composition and diversification in holocentric chromosomes of kissing bugs (Hemiptera, Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 111: 614–624.
29. Justi SA, Russo CAM, Mallet JRS, Obara MT, Galvão C, 2014. Molecular phylogeny of Triatomini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Paras Vect* 7: 149.

30. Vendramini DP, Obara MT, Gurgel-Gonçalves R, Ceretti-Junior W, Marrelli MT, 2017. Wing geometry of *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) populations from Brazil. *Infect Gen Evol* 49: 17–20.
31. Forattini OP, Barata JMS, Santos JLF, Silveira AC, 1982. Hábitos alimentares, infecção natural e distribuição de triatomíneos domiciliados na região central do Brasil. *Rev Saude Pública* 16: 171–204.
32. Dias JCP, 1988. Controle de vetores da doença de Chagas no Brasil e risco de reinvasão domiciliar por vetores secundários. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 83: 387–397.
33. Schofield CJ, Lehane MJ, McEwan P, Catalá SS, Gorla DE, 1991. Dispersive flight by *Triatoma sordida*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 85: 676–678.
34. Forattini OP, Rocha e Silva EO, Ferreira OA, Rabello EX, Pattoli DG, 1971. Ecological aspects of trypanosomiasis. 3. Local dispersion of Triatominae with special reference to *Triatoma sordida*. *Rev Saude Publica* 5: 193–205.
35. Pérez de Rosas AR, Segura EL, Fichera L, Garcia BA, 2008. Macrogeographic and microgeographic genetic structure of the Chagas disease vector *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Catamarca, Argentina. *Genetica* 133: 247–260.
36. Pérez de Rosas AR, Segura EL, García BA, 2007. Microsatellite analysis of genetic structure in natural *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) populations from Argentina: its implication in assessing the effectiveness of Chagas disease vector control programmes. *Mol Ecol* 16: 1401–1412.

Table 1. Geographical origin of the specimens used in the study and their corresponding biomes.

<i>Triatoma sordida</i> collection sites		
Brazilian states	Municipalities	Brazilian biomes
Mato Grosso	Rondonópolis	Cerrado
Goiás	Posse	Cerrado
	São Luiz dos Montes Belos	Cerrado
	Guarani dos Goiás	Cerrado
Minas Gerais	Matias Cardoso and Monte Azul	Cerrado and Caatinga
	Itinga	Atlantic Forest
Bahia	Seabra and Macaúbas	Caatinga
Rio Grande do Sul	São Francisco de Assis	Pampa and Atlantic Forest
São Paulo	Mirassol and Guaíra	Atlantic Forest and Cerrado
	São Paulo	Atlantic Forest
Mato Grosso do Sul	Rio Verde de Mato Grosso	Cerrado and Pantanal
	Corumbá	Pantanal
	Brasilândia	Atlantic Forest and Cerrado

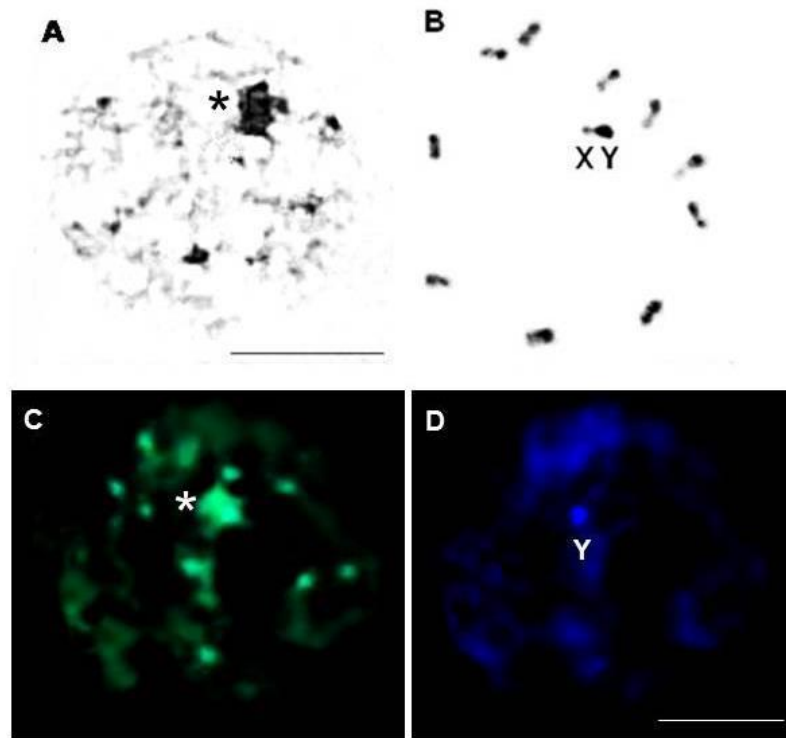


Figure 1. Constitutive heterochromatin pattern and composition of AT-rich and CG-rich DNA observed in *T. sordida* Brazilians. (A) Early meiotic prophase prepared with C-banding. Note the several heterochromatic bodies dispersed in the nucleus, being one of them formed by the associated sex chromosomes surrounded by some autosomal heterochromatic regions (*). (B) Meiotic metaphase prepared with C-banding. Note the most autosomal pairs presents a C-heterochromatic block in one chromosomal end, Y sex chromosome is fully heterochromatin and X chromosome may present a small C-block. (C and D) Early meiotic prophase prepared with CMA₃/DAPI banding. (C) Note the several bodies CG-rich dispersed in the nucleus, being one of them formed by the associated X sex chromosome surrounded by some autosomal (*). (D) Note that only the Y sex chromosome is AT-rich. X: X sex chromosome Y: Y sex chromosome. Bar = 10 μ m.

4.2. Capítulo II (Artigo científico publicado na revista *Infection, Genetics and Evolution*; FI: 2,773)

MADEIRA, F. F.; DELGADO, L. M. G.; BITTINELLI, I. F.; SARTORI, R. Q.; OLIVEIRA, J.; ROSA, J. A.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V.; ALEVI, K. C. C. Revisiting the genetic variability of Brazilian peridomestic populations of the Chagas disease vector *Triatoma sordida* (Stål, 1859) (Hemiptera, Triatominae). **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 85, n. e104568, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104568>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134820303993>. Acesso em: 14 set. 2021.

Revisiting the genetic variability of Brazilian peridomestic populations of the Chagas disease vector *Triatoma sordida* (Stål, 1859) (Hemiptera, Triatominae)

Abstract

Triatoma sordida is an endemic species to South America, currently considered the species most frequently found in the peridomestic environment in Brazil. This triatomine has a wide ecological tolerability that allows it to inhabit several ecotopes and use different food sources. Although the species is considered predominantly peridomestic, it is also capable of colonizing households and forming numerous intra-household colonies, leading to its inclusion among the priorities for triatomine control campaigns in Brazil. All Brazilian populations of *T. sordida* are considered as *T. sordida sensu stricto* by chromosomal analyses (which highlights their epidemiological importance), although molecular studies that characterize the genetic diversity of these populations are scarce, being restricted only to the region of Minas Gerais. Thus, several populations of this vector distributed in the states of Bahia, Goiás, Mato Grosso do Sul, and Minas Gerais were analyzed using mitochondrial markers (cyt b and nd1). Low nucleotide diversity, high haplotypic diversity, low genetic distance, and high F_{ST} value were observed, as well as the formation of a monophyletic clade of the Brazilian populations of *T. sordida*, which confirms that this species has low genetic variability, with all specimens in Brazil grouped in *T. sordida sensu stricto*. In addition to the genetic and evolutionary importance for the knowledge of the biology of these vectors, these results are important from an epidemiological point of view, thus being able to direct vector control programs.

Keywords: Chagas diseases vectors; *Triatoma sordida*; population genetics; mitochondrial markers.

1. Introduction

Triatomines (Hemiptera, Triatominae) are hematophagous insects of great epidemiological importance, since they are considered as the main form of transmission of the protozoan *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), the etiological agent of Chagas disease (WHO, 2020). This neglected disease has no cure, affects about eight million people, and places approximately 25 million people worldwide at risk of infection. Treatment with anti-trypanosomatids (Benznidazole and Nifurtimox) is effective only in the acute phase of the disease which, in most cases, is asymptomatic (WHO, 2020). Thus, the control of vector populations is considered as the main way of minimizing the incidence of new cases of Chagas disease, and studies related to triatomines are extremely important for public health, since they can generate subsidies to help programs of vector control in the prophylaxis of Chagas disease.

Currently, there are 154 species of triatomines described (Galvão, 2014; Oliveira and Alevi, 2017; Dorn et al., 2018; Olivera et al., 2018; Lima-Cordón et al., 2019; Poinar, 2019, Nascimento et al., 2019). Of this total, 66 species are known to occur in Brazil (Gurgel-Gonçalves et al., 2017; Nascimento et al., 2019). Although there are species with a greater or lesser degree of importance in the transmission of Chagas disease, all triatomines, of both sexes, and at any stage of development after hatching, are considered as potential vectors of this disease (Galvão, 2014).

Triatoma sordida is an endemic species to South America, currently considered the species most frequently found in the peridomestic environment in Brazil (Galvão, 2014). Its distribution covers 53.85% of the Brazilian territory (considering the 26 states and the Federal District), including the states of Acre, Bahia, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo, and Tocantins (Galvão, 2014; Ramos et al., 2018). In addition, outside of Brazil the species is found in Argentina, Bolivia, Paraguay, and Uruguay (Galvão, 2014).

Triatoma sordida has a wide ecological niche that allows it to inhabit several ecotopes and use different food sources (Forattini et al., 1975; Diotaiuti et al., 1993). Although the species is considered predominantly peridomiciliar, *T. sordida* is also capable of colonizing households and forming numerous intra-household colonies, leading to its inclusion among the priorities for triatomine control campaigns in Brazil (Diotaiuti et al.

1995; Silva et al. 2005; Abad-Franch et al. 2013; Ribeiro Jr. et al. 2019). *Triatoma sordida* capture rates have been of concern to health authorities in areas of agricultural occupation in the states of São Paulo, Minas Gerais, and Goiás (Diotaiuti et al. 1995; Silva et al. 2005; Oliveira and Silva, 2007; Pelli et al. 2007). With the intensification of campaigns to control and eliminate the foci of *T. infestans*, peridomestic infestation has assumed greater importance, and the persistence of *T. sordida* infestations in these environments has been seen as a challenge to be faced in the control of triatomines (Diotaiuti et al. 1995).

Triatoma sordida was the first species described of the Sordida subcomplex (Stål, 1859), initially composed of *T. sordida*, *T. patagonica* Del Ponte, 1929, *T. guasayana* Wygodzinsky; Abalos, 1949, and *T. garciabesi* Carcavallo et al. (1967), based on morphological analysis and geographic distribution (Schofield and Galvão, 2009). Currently, based on chromosomal data, this subcomplex is composed of the species *T. garciabesi*, *T. sordida sensu stricto*, *T. sordida* Argentina [considered as a possible new species (Panzer et al., 2015)], *T. jurbergi* Carcavallo et al., 1998, *T. matogrossensis* Leite & Barbosa, 1953, and *T. vanda* Carcavallo et al., 2002 (Pita et al., 2016).

The taxonomic validity of the species grouped in the Sordida complex proposed by Schofield and Galvão (2009) has always been controversial and remains under discussion, because with the exception of *T. patagonica*, the species in this subcomplex are morphologically very similar and have geographic range overlap (with species living in sympatry in many regions) (Panzer et al., 2015), which makes species differentiation difficult. *T. garciabesi*, for example, was initially synonymized in 1979 with *T. sordida* (Lent and Wygodzinsky, 1979) and, after 19 years, the species-specific status was revalidated through morphological, isoenzymatic, and chromosomal analyses (Jurberg et al., 1998). In addition, based on chromosomal (C-heterochromatin distribution and 45S ribosomal genes) and molecular (COI mitochondrial gene) data, Panzer et al. (2015) proposed the existence of three different taxa (cytotypes) among the specimens classified, until now, as *T. sordida*: *T. sordida* Argentina, *T. sordida* La Paz, and *T. sordida sensu stricto*, characterizing the phenomenon of cryptic speciation for *T. sordida*.

Panzer et al. (2015) suggest that all Brazilian populations of this species are characterized as *T. sordida sensu stricto*. Cytogenetic analyses performed on specimens from seven Brazilian states confirmed the classification of these insects as *T. sordida sensu stricto* (Madeira et al., 2019). Although this cytotype of *T. sordida* is considered more significant in terms of transmission of Chagas disease, especially in domestic and peridomestic environments (Panzer et al., 2015), studies characterizing the genetic diversity

of these populations in Brazil are scarce, being restricted only to the Minas Gerais region (Monteiro et al., 2009; Pessoa et al., 2016).

Thus, based on the epidemiological importance and given the need to expand knowledge about the genetic diversity of the populations of *T. sordida* in Brazil, we analyzed several populations of this vector distributed in the states of Bahia, Goiás, Mato Grosso do Sul, and Minas Gerais, using mitochondrial markers (cyt b and nd1).

2. Material and Methods

2.1 Origins of the insects - The studied populations came from colonies kept in the Triatominae insectary of the School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University (UNESP), Araraquara, São Paulo, Brazil (Table 1) (Figure 1). Although the sample size used was relatively small (ranging from three to seven specimens) (Table 1), based on studies of genetic population structure in other triatomines that also used small samples (Pacheco et al., 2007; Monsalve et al., 2016), this factor does not preclude our analyses.

2.2 DNA extraction, amplification, and sequencing – Genomic DNA extraction from gonads of adult specimens or nymphs in the fifth instar was performed using the DNeasy Blood and Tissue kit (QIAGEN®), according to the manufacturer's instructions. The samples were subjected to polymerase chain reaction (PCR) using primers targeting the cyt b gene: CYT B F-5' GGACGWGGWATTATTATGGATC 3' and CYT B R-5' ATTACTCCTCCTAGCTTATTAGGAATTG 3' (Monteiro et al., 1999), and nd1 gene: ND1 F-5' TCTGATTCACCCTCAGCAAA 3' and ND1 R-5' GGAGCGTARGGTTTTRRGTTAT 3' (Guerra, 2016). All PCR reactions were performed in 25 µL volumes containing: 6.5 µL of GoTaq® Colorless Master Mix (Promega®), 1.0 µL of magnesium chloride buffer solution, 0.5 µL of each of the forward and reverse primers, 2.5 µL of DNAg, and 14.0 µL of deionized water to complete the final volume of mix. Amplifications were carried out in a Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems®) using the following reaction conditions for each gene: cyt b – an initial denaturation at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles comprising denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 45-50°C for 30 s, extension at 72°C for 2 min, and a final extension step at 72°C for 7 min; nd1: an initial denaturation at 95°C for 2 min, followed by 45 cycles comprising denaturation at 95°C for 15 s, annealing at 56°C for 30 s, extension at 72°C for 90 s, and a final extension step at 72°C for 5 min. After electrophoresis, the amplified PCR products were purified using a GFX PCR DNA & Gel Band Kit (GE Healthcare and Life Technology®) according to the manufacturer's instructions. The purified

products were sent to the Research Center on the Human Genome and Stem Cells, USP/São Paulo, Brazil, and directly sequenced on an ABI 3730xl 96-capillary DNA analyzer (Life Technologies – Applied Biosystems).

2.3 Sequence analysis - The sequences of all individuals were analyzed by using BioEdit Alignment Editor v.7.0.5.3 (Hall, 1999) and a consensus sequence was obtained for each DNA segment. The sequences were aligned using the ClustalW Multiple Alignment tool (Thompson et al., 1994). The descriptive statistical analyses, which aim to quantify the variation present in the DNA sequences, were performed by the program DnaSP v. 6.12.01 (Rozas et al., 2017). For this, the following parameters were estimated: number of polymorphic or segregating sites (S); number of haplotypes (H); haplotypic diversity (Hd); nucleotide diversity (π); average number of nucleotide differences (k); and total number of mutations found (η or Eta). Using MEGA software (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) v.6 (Tamura et al., 2013) the average percentage of each of the nitrogenous bases in the composition of the mtDNA sequences of the sampled individuals was estimated. Subsequently, we also used MEGA v.6 software for constructing a genetic distance matrix using the Kimura-2 parameter distance model for estimation of evolutionary divergence between sequences.

Through the Arlequin 5.2.2 software (Excoffier and Lischer, 2010) the Analysis of Molecular Variance (AMOVA) was performed, built from the hierarchical analysis of variance using the F statistics of Wright (Wright, 1951). For both genes, the same grouping was analyzed, established by the following criteria: formation of three groups of populations, according to the region or state - Group 1: individuals from the localities of Minas Gerais (MG) and Goiás (GO) (Brasília de Minas, Catuti, Monte Azul, Porteirinha, Riacho dos Machados, and Posse); Group 2: individuals from the localities of Bahia (BA) (Gentio do Ouro, Macaúbas, Seabra, and Tanhaçu); and Group 3: individuals from the populations of the state of Mato Grosso do Sul (MS) (Corumbá and Pantanal).

Phylogenetic trees were reconstructed by the Bayesian inference method in *MrBayes* v.3.2.2. Software (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) using the Generalised Time-Reversible with invariable sites parameters (GTR + I) model for the cyt b sequences, and the Hasegawa-Kishino-Yano model with gamma distributed rate variation among sites and proportion of invariable sites (HKY + G + I) for the nd1 sequences. The jModeltest tool was used to assess the best fit model of nucleotide substitution (Darriba et al., 2012). The reliability of clustering patterns in trees was assessed by 1,000 bootstrap replicates (Felsenstein, 1985). Tracer v.

1.6.0 (Rambaut et al., 2013) was used to verify the stabilization moment (ESS values above 200) of the tree samples. The generated tree was visualized and edited with the aid of the FigTree v.1.4.3 program. (Rambaut, 2016). We used the cyt b sequences of *T. infestans* (GenBank accession number: AY702023) and nd1 sequences of *T. brasiliensis* (AM980619) as outgroups. In addition, for analyses involving the cyt b gene, sequences available on the GenBank of *T. sordida* specimens from other populations were also used: Monte Azul - MG (accession number: MH054941), Pantanal - MS (KC249292), and Seabra - BA (MH054940).

3. Results

3.1 cyt b results

3.1.1 Nucleotide and haplotype diversity of cyt b among Brazilian samples – We sequenced a fragment consisting of 554 bp of the cyt b gene from 49 samples of *T. sordida*, originating from 12 different areas, comprising 4 states in the midwest and southeast regions of Brazil (Table 1). In total, 16 polymorphic sites (S) were found (Table 2). The nucleotide diversity (π) found was 0.00613 and the average number of nucleotide differences (k) was 3.396. Regarding the nucleotide composition of the mtDNA sequences obtained, it was observed that, on average, 28.2% correspond to the thymine base (T), 28.9% correspond to the cytosine base (C), 29.3% correspond to the adenine base (A), and 13.6% correspond to the guanine base (G).

The polymorphisms obtained were arranged in 11 haplotypes (Table 2, Figure 2), corresponding to a mean haplotype diversity of 0.871, considered elevated. Among these haplotypes, three (H2, H3, and H7) presented frequencies below twenty percent. Two haplotypes (H1 and H10) were predominant in the samples where they occurred (Seabra, Gentio de Ouro, Monte Azul, and Pantanal). The haplotypes H2, H4, and H11 were the most frequent haplotypes in the areas where they occurred (Figure 2). Curiously, the three specimens sampled from the population of Porteirinha/MG presented three distinct haplotypes, in contrast to the results for the three specimens from Gentil de Ouro/BA that presented a single haplotype (Figure 2).

3.1.2 Genetic distance - Comparative analyses of genetic variability between populations of *T. sordida* from the 12 Brazilian locations showed low nucleotide diversity among all the locations analyzed, with most individuals from the other locations having a genetic distance of less than 1% when compared pairwise, ranging from 0-1.6%. The overall average was

0.006 or 0.6%. The distance between all locations and the outgroup was approximately 19.9 to 20.9% (Supplementary material 1).

3.1.3 Analysis of Molecular Variance - The F_{SC} (0.83) and F_{ST} (0.88) fixation index values were significant ($p < 0.05$), showing high genetic differentiation between individuals within populations and between populations. The highest percentages of variation were found between populations within groups (60.3%), with little variation between groups (27.8%) and within populations (11.9%). In addition, the high F_{ST} value (> 0.25) is indicative of the effect of population structure.

3.1.4 Phylogenetic analysis - The phylogenetic relationships among *T. sordida* isolates from different areas of Brazil and one sample from San Miguel (Corrientes) – Argentina were inferred from the cyt b sequences (Figure 3A). All the Brazilian locations fell into a group of samples separated from the Argentina clade with maximum support (bootstrap value of 100%), confirming the difference between the two cytotypes and, mainly, that the specimens from Brazil are grouped in a single cytotype (*T. sordida sensu stricto*).

3.2 nd1 results

3.2.1 Nucleotide and haplotype diversity of nd1 gene among Brazilian samples – We sequenced a fragment consisting of 508 bp of the cytb gene from 40 samples of *T. sordida* originating from 9 different locations, comprising 4 states in the midwest and southeast regions of Brazil (Table 1). In total, 12 polymorphic sites (S) were found (Table 3). The nucleotide diversity (π) found was 0.00739 and the average number of nucleotide differences (k) was 3.392. Regarding the nucleotide composition of the mtDNA sequences obtained, it was observed that, on average, 17.5% correspond to the thymine base (T), 22% correspond to the cytosine base (C), 50.1% correspond to the adenine base (A), and 10.5% correspond to the guanine base (G).

The polymorphisms obtained were arranged in 10 haplotypes (Table 2, Figure 4), corresponding to a mean haplotype diversity of 0.849, considered elevated. Among the haplotypes, only one (H2) was predominant (100%) in the samples where they occurred (Gentio de Ouro and Macaúbas). Aside from these exceptions, all the other localities were represented by two haplotypes. None of the haplotypes presented frequencies above twenty percent (Figure 4).

3.2.2 Genetic distance - Comparative analyses of genetic variability between populations of *T. sordida* from the 9 Brazilian areas also showed low nucleotide diversity among all the locations analyzed for the nd1 gene, ranging from 0-2%. The distance between all locations and the outgroup was approximately 9.2 to 10%. The overall average was 0.7% (Supplementary material 2).

3.2.3 Analysis of Molecular Variance – Similar to what occurred for the cyt b gene, the F_{SC} (0.77) and F_{ST} (0.81) fixation index values for the nd1 gene sequences were significant ($p < 0.05$), corroborating the high genetic differentiation between individuals within populations and between populations. Likewise, the highest percentages of variation were found between populations within groups (63.9%), with little variation within populations (18.6%) and between groups (17.5%). Once again, the high F_{ST} value (> 0.25) was indicative of the effect of population structure.

3.2.4 Phylogenetic analysis - The phylogenetic relationships among *T. sordida* isolates from different areas of Brazil and one sample from San Miguel (Corrientes) - Argentina were inferred from the nd1 sequences (Figure 3B). As occurred for cyt b sequences, all the Brazilian locations fell into a group of samples separated from the Argentina clade with maximum support (bootstrap value of 100%).

4. Discussion

To date, only two studies in the literature have investigated the genetic diversity of the Brazilian populations of *T. sordida* (Monteiro et al., 2009; Pessoa et al., 2016), however both are restricted to municipalities in the state of Minas Gerais, Brazil. Monteiro et al. (2009) analyzed the population structure of 181 specimens collected in four municipalities (Espinosa, Mamonas, Januária and Corinto), evaluating 28 allozyme loci. Likewise, more recently, Pessoa et al. (2016) corroborated this study by analyzing sequences of a polymorphic region of the cyt b gene of 126 samples from 14 areas distributed in six municipalities in Minas Gerais, Brazil (Buonópolis, Coração de Jesus, Monte Azul, Bocaiúva, Monjolos and Presidente Jucelino). Both studies reported that the structure of these populations showed low levels of genetic diversity, including that the nucleotide diversity of *T. sordida* isolates from Bolivia was 13 times greater compared to Brazilian samples (Pessoa et al., 2016), which supports the suggestion of the existence of the cryptic speciation phenomena proposed by Panzera et al. (2015).

Cryptic species, also known as isomorphic species, are identical species in their external morphology, and may differ in minor characteristics which are not easily visible. Through the use of different phenotypic and genetic markers, the cryptic speciation proved to be a phenomenon widely disseminated in the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Schofield and Galvão, 2009; Abad-Franch et al., 2013). Its existence has already been described for different groups of the genus *Triatoma* Laporte, 1832, including representatives of the subcomplexes *Brasiliensis*, *Dimidiata*, *Phyllosoma*, and *Sordida* (Schofield and Galvão, 2009). Most of the species that composed the *Sordida* subcomplex characterized by Schofield and Galvão (2009) have similar phenotypes and, in some cases, habitat overlap, which can result in the formation of possible natural hybrids (Panzera et al., 2015). All of these factors can result in taxonomic errors, requiring high specialization of the vector control team for correct identification (Panzera et al., 2015). Thus, the use of molecular analyses associated with morphological characters is of great importance for the correct classification of species of this subcomplex.

The mitochondrial genes *cyt b* and *nd1* showed similar results: 11 and 10 haplotypes, respectively, with haplotypic diversity for *cyt b* ($H_d = 0.871$) and *nd1* ($H_d = 0.849$) considered elevated. The haplotypic diversity is considered a descriptor of the number of different existing haplotypes, and, in the case of nucleotide sequences, any difference in one or more nucleotides represents a new haplotype (Carvalho, 2011). On the other hand, the nucleotide diversity for both genes was quite low, being $\pi = 0.00613$ for *cyt b* and $\pi = 0.00739$ for *nd1*. These data (high haplotypic diversity and low nucleotide diversity) are indicative of populations that have undergone recent territorial expansion (Grand and Bowen, 1998). According to Grand and Bowen (1998), nucleotide diversity values below 0.5 and haplotypic diversity values above 0.5 are indications that the population experienced a population bottleneck followed by fast growth and an accumulation of mutations, as observed for the Brazilian populations of *T. sordida*.

As an expected characteristic for insect genomes, the percentage of A-T bases was higher than the percentage of C-G bases for both mtDNA sequences obtained. In addition, the A-T percentage of 57.4% is within the expected values for the *cyt b* gene in the Triatomini Tribe (55-67%) (Mas-Coma and Bargues, 2009). In addition, the A-T percentage of 67.6% is close to that expected for the *nd1* gene in the Triatomini tribe (63-73%) (Mas-Coma and Bargues, 2009).

Phylogenetic analyses with mitochondrial genes showed that all *T. sordida* specimens sampled in Brazil form a distinct monophyletic group from *T. sordida Argentina* [confirming

the hypothesis that this taxon represents a new species (Panzer et al., 2015)]. These data, together with the genetic distance analyses (genetic distance overall average of 0.6% divergence for the cyt b gene and 0.7% for the nd1 gene) corroborated the low genetic variability of the Brazilian populations of *T. sordida* proposed by Monteiro et al. (2009), Pessoa et al. (2016), and Madeira et al. (2019), which confirms that *T. sordida* populations in Brazil can be considered as *T. sordida sensu stricto* (Panzer et al., 2015).

Analysis of Molecular Variance (AMOVA) is a statistical model that makes it possible to test hypotheses related to population genetic structure. These tests are based on statistics, Φ (Phi), an extension of Wright's *F* calculation (Wright, 1978) for nucleotide sequences. Their calculations are based on a distance matrix involving the nucleotide diversity of the haplotypes. The distribution of this diversity among populations and their individuals then reveals the structuring of the species (Carvalho, 2011). For the hierarchical constructions performed by region for both cyt b and nd1 genes, only the F_{SC} and F_{ST} fixation indices were significant ($p < 0.05$), with the highest percentage of genetic variation found between populations within groups formed for both markers. Specifically in relation to the F_{ST} index, the very high values obtained for both genes (> 0.25) indicate a high degree of inbreeding due to the differentiation between subpopulations in relation to the total population (Sethuraman, 2013). Thus, if there are high rates of gene flow among the groups analyzed, the value of F_{ST} is low, while low rates of gene flow can lead to an increase in inbreeding, making the value of F_{ST} higher (Kraaijeveld-Smit et al., 2005), corroborating the evolutionary event of population bottleneck for *T. sordida* from Brazil, signaled above by the high haplotypic diversity and low nucleotide diversity, as well as by the cytogenetic data (Madeira et al., 2019).

Thus, based on the extremely low genetic distance and the possible occurrence of a bottleneck, evidenced by the high haplotypic diversity, low nucleotide diversity, and a high F_{ST} value, it is possible to suggest low genetic diversity of the Brazilian sampled populations, which could be related to several factors, alone or in combination: possible geographic isolation due to an obstacle to the flow of triatomines between neighboring locations (Noireau et al., 1998; González -Brítez, 2013, 2014); focal distribution of specimens in small colonies formed by few individuals, limiting gene flow between them; the low dispersion capacity of the species *T. sordida* (Monteiro et al., 2009); and/or the long life cycle of the subfamily Triatominae, which ensures that the contributions of young adults capable of reproducing (and consequently exchanging genetic material) occur at long intervals, which can differ between species (Forattini et al., 1974). Furthermore, the possible effect of insecticides used in vector control programs must also be considered, since there is already evidence, due to bottleneck

events, of a reduction in genetic variability in populations in areas treated with insecticides in comparison to those living in untreated areas (Pérez De Rosas et al., 2007, 2008; Pessoa et al., 2016). Thus, the analyzed *T. sordida* populations may have been formed from surviving specimens, founders of new colonies, with reduced genetic variability.

Population-level studies require information about a large sample of the population to allow formulation of robust inferences of its population structure, and the very low levels of variation reported here may represent a clear limitation in this regard [as also notified by Monteiro et al. (2009)]. Furthermore, Tajima (1989) indicated that the number of segregating sites is influenced by the size of the sampled population more strongly than the average number of nucleotide differences (k). We found 16 polymorphic sites for the *cyt b* gene and 12 for the *nd1* gene. These results are in line with the 12 polymorphic sites identified by Pessoa et al. (2016) for the sampled areas of Minas Gerais state. Although the apparently low levels of genetic variation in the populations analyzed might be attributed to the small sample sizes available of the specimens, our results are in agreement with other studies that indicate reduced genetic variability and strong genetic structuring obtained for *T. sordida* populations (Monteiro et al., 2009; Pessoa et al., 2016).

Based on the low nucleotide diversity, high haplotype diversity, low genetic distance, and high F_{ST} value, as well as the formation of the monophyletic clade of the Brazilian populations sampled of *T. sordida*, we confirm that this species has low genetic variability, with all specimens from Brazil grouped in *T. sordida sensu stricto*. In addition to the genetic and evolutionary importance for understanding the biology of vectors, these results are important from an epidemiological point of view, since this cytotype has great significance in the domestic and peridomestic transmission of Chagas disease (Panzera et al., 2015), thus being able to direct vector control programs.

Ethical Standards

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

Author Contributions

Fernanda Fernandez Madeira: Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing-Original Draft Preparation.

Luiza Maria Grzyb Delgado: Methodology, Investigation and Data Curation.

Isadora de Freitas Bittinelli: Methodology, Investigation and Data Curation.

Ricardo Quitério Sartori: Data Curatio and Writing - Review & Editing.

Jader de Oliveira: Methodology, Investigation, Data Curation and Writing - Original Draft Preparation.

João Aristeu da Rosa: Formal analysis, Resources and Writing - Review & Editing.

Maria Tercília Vilela de Azeredo-Oliveira: Conceptualization, Formal analysis, Resources, Writing - Review & Editing, Supervision, Project administration and Funding acquisition.

Kaio Cesar Chaboli Alevi: Conceptualization, Validation, Formal analysis, Writing - Original Draft Preparation, Writing - Review & Editing, Visualization, Supervision, Project administration and Funding acquisition.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Process number 2017/05015-7 and 2017/18046-8), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

References

1. Abad-Franch, F., Pavan, M.G., Jaramillo, N., Palomeque, F.S., Dale, C., Chaverra, D., Monteiro, F.A., 2013. *Rhodnius barretti*, a new species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) from western Amazonia. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 108, 92-99. <https://doi.org/10.1590/0074-0276130434>.
2. Carvalho, P.H., 2011. Análises filogenéticas e filogeográficas do complexo de espécies *Hypostomus ancistroides* (Siluriformes: Loricariidae). <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/41/41131/tde-23092011-112658/pt-br.php>. Accessed date: 18 April 2020.
3. Darriba, D., Taboada, G., Doallo, R., Posada, D., 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nat Methods 9, 772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>.
4. Diotaiuti, L., Loiola, C.F., Falcão, P.L., Dias, J.C.P., 1993. The ecology of *Triatoma sordida* in natural environments in two different regions of the state of Minas Gerais, Brazil. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo 35(3), 237-245. <https://doi.org/10.1590/S0036-46651993000300004>.

5. Diotaiuti, L., Pereira, A.S., Loiola, C. F., Fernandes, A.J., Schofield, J.C., Dujardin, J. P., Dias, J.C.P., Chiari, E., 1995. Inter-relation of sylvatic and domestic transmission of *Trypanosoma cruzi* in areas with and without domestic vectorial transmission in Minas Gerais, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 90(4), 443-448. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761995000400002>.
6. 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://doi.org/10.3897/zookeys.775.22553>.
7. Excoffier, L., Lischer, H.E.L., 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Mol Ecol Resour 10, 564-567. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>.
8. Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using bootstrap. Evolution 39, 783–791. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>.
9. Forattini, O.P., Ferreira, O.A., Rocha e Silva, E.O., Rabello, E.X., 1974. Ecological aspects of South American Tripanosomiasis, VI. Permanence of *Triatoma sordida* after environmental alteration and its possibles relation to dispersion Rev. Saúde públ., S. Paulo, 265-282. <https://www.scielo.org/article/rsp/1974.v8n3/265-282/pt/>.
10. Forattini, O.P., Ferreira, O.A., Rocha e Silva, E.O., Rabello, E.X., 1975. Ecological aspects of South American Tripanosomiasis. VII. Permanence and mobility of *Triatoma sordida* with relation to artificial ecotopes. Rev. Saúde públ., S. Paulo 9, 467-476. <https://www.scielo.org/article/rsp/1975.v9n4/467-476/>.
11. Galvão, C., Gurgel-Gonçalves, R., 2014. Vetores conhecidos no Brasil. In: Galvão, C. (Org.), Vetores da doença de Chagas no Brasil [online], Chapter 8, Sociedade Brasileira de Zoologia, pp. 88–170. <https://doi.org/10.7476/9788598203096>.
12. González-Brítez, N., Carrasco, H.J., Purroy, C.E.M., Feliciangeli, M.D., Maldonado, M., López, E., Segovia, M.J., Arias, A.R., 2014. Genetic and morphometric variability of *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) from the eastern and western areas of Paraguay. Front. Public Health 2 (149), 1-9. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2014.00149>.
13. González-Brítez, N., 2013. Population dynamics of triatomines (Hemiptera: Reduviidae) related to *Trypanosoma cruzi* in Paraguay with emphasis on *Triatoma sordida*. Mem. Inst. Invest. Cienc. Health 11 (2), 105-11, 2013. http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1812-95282013000200012&lng=en&nrm=iso.
14. Grand, W.S., Bowen, B.W., 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. J. Hered. 89, 415-426. <https://doi.org/10.1093/jhered/89.5.415>.
15. Guerra, A.L., 2016. Análise molecular do subcomplexo Brasiliensis (Hemiptera, Triatominae). <http://repositorio.unesp.br/handle/11449/136463>. Accessed date: 18 March 2020.

16. Gurgel-Gonçalves, R., Galvão, C., Costa, J., Peterson, A.T., 2012. Geographic distribution of Chagas disease vectors in Brazil based on ecological niche modeling. *J. Trop. Med.* ID 705326, 15. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/705326>.
17. Gurgel-Gonçalves, R., Komp, E., Campbell, L.P., Khalighifar, A., Mellenbruch, J., Mendonça, V.J., Owens, H.L., de la Cruz Felix, K., Peterson, A.T., Ramsey, J.M., 2017. Automated identification of insect vectors of Chagas disease in Brazil and Mexico: the Virtual Vector Lab. *PeerJ*. 5:e3040. <https://doi.org/10.7717/peerj.3040>.
18. Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41, 95–98. <http://www.academia.edu/download/29520866/1999hall1.pdf>.
19. Jurberg, J., Galvão, C., Lent, H., Monteiro, F., Lopes, M.C., Panzera, F., Pérez, R., 1998. Revalidacao de *Triatoma garciabesi* Carcavallo, Martinez, Cichero, Prosen & Ronderos, 1967 (Hemiptera: Reduviidae). *Entomol. Vectores* 5 (3), 107–122. [http://refhub.elsevier.com/S1567-1348\(20\)30399-3/rf6000](http://refhub.elsevier.com/S1567-1348(20)30399-3/rf6000).
20. Kraaijeveld-Smit, F.J.L., Beebe, T.J.C., Griffiths, R.A., Moore, R.D., Schley, L., 2005. Low gene flow but high genetic diversity in the threatened Mallorcan midwife toad *Alytes muletensis*. *Mol Eco.l* 14 (11), 3307-3315. <https://doi:10.1111/j.1365-294x.2005.02614.x>
21. 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.
22. 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>.
23. Madeira, F.F., Reis, Y.V., Bittinelli, I.F., Delgado, L.M.G., Oliveira, J., Mendonça, V.J., Moreira, F.F.F., Azeredo-Oliveira, M.T.V., Alevi, K.C.C., 2019. Genetic structure of Brazilian populations of *Triatoma sordida* (Stål, 1859) (Hemiptera, Triatominae) by means of chromosomal markers. *Am. J Trop. Med. Hyg.* 100, 907-910. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0336>.
24. Mas-Coma, S., Bargues, M.D., 2009. Populations, hybrids and the systematic concepts of species and subspecies in Chagas disease triatomine vectors inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA. *Acta Trop.* 110, 112-136. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.10.013>.
25. Monteiro, F.A., Jurberg, J., Lazoski, C., 2009. Very Low Levels of Genetic Variation in Natural Peridomestic Populations of the Chagas Disease Vector *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) in Southeastern Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 81(2), 223-227. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2009.81.223>.

26. Monteiro, F.A., Perez, R., Panzera, F., Dujardin, J.P., Galvão, C., Rocha, D., Noireau, F., Schofield, C.J., Beard, C.B., 1999. Mitochondrial DNA variation of *Triatoma infestans* populations and its implication on the specific status of *T. melanosoma*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 94, 229–238. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761999000700037>.
27. 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>.
28. Noireau, F., Gutierrez, T., Zegarra, M., Flores, R., Brenière, F., Cardozo, L., Dujardin, J.P., 1998. Cryptic speciation in *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) from the bolivian Chaco. Trop. Med. Int. Health 3(5), 364-372. http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/pleins_textes_7/b_fdi_51-52/010015981.pdf.
29. 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. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0125-2017>.
30. 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>.
31. Oliveira, A.W.S., Silva, I.G., 2007. Distribuição geográfica e indicadores entomológicos de triatomíneos sinantrópicos capturados no Estado de Goiás. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 40(2), 204-208. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822007000200011>.
32. Panzera, F., Pita, S., Nattero, J., Panzera, Y., Galvão, C., Chavez, T., Rojas De Arias, A., Cardozo Téllez, L., Noireau, F., 2015. Cryptic speciation in the *Triatoma sordida* subcomplex (Hemiptera, Reduviidae) revealed by chromosomal markers. Parasit. Vectors. 8, 495. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1109-6>.
33. Pelli, A., Silva, M.A., Sarmiento, F.R., Martins, E., Mata, S.A., Domingues, M.A., Ramirez, L.E., 2007. Population parameters for *Triatoma sordida* Stal, 1859: the most frequent vector for Chagas disease in the Triangulo Mineiro (Heteroptera, Triatominae). Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 40, 25-28. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822007000100005>.
34. Pérez De Rosas, A.R., Segura, E.L., Fichera, L., Garcia, B.A., 2008. Macrogeographic and microgeographic genetic structure of the Chagas disease vector *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Catamarca, Argentina. Genetica 133 (3), 247-260. <https://doi.org/10.1007/s10709-007-9208-8>.

-
35. Perez de Rosas, A.R., Segura, E.L., Garcia, B.A., 2007. Microsatellite analysis of genetic structure in natural *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) populations from Argentina: its implication in assessing the effectiveness of Chagas' disease vector control programmes. *Mol. Ecol.* 16, 1401–1412. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03251.x>.
36. Pessoa, G.C.D.A., Sousa, T.N., Sonoda, I.V., Diotaiuti, L., 2016. Assessing the mitochondrial DNA diversity of the Chagas disease vector *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 111(5), 322–329. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150429>.
37. Pita, S., Lorite, P., Nattero, J., Galvão, C., Alevi, K.C.C., Teves, S.C., Azeredo-Oliveira, M.T.V., Panzera, 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>.
38. Poinar, G., 2019. A primitive triatomine bug, *Paleotriatoma metaxytaxa* gen. et sp. nov. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), in mid-Cretaceous amber from northern Myanmar. *Cretac. Res.* 93, 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.cretres.2018.09.004>.
39. Rambaut, A., 2016. FigTree – Tree Figure Drawing Tool Version v.1.4.3. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh. <http://tree.bio.ed.ac.uk/>.
40. Rambaut, A., Suchard, M.A., Xie, W., Drummond, A.J., 2013. Tracer – MCMC Trace Analysis Tool Version v. 1.6.0. <http://beast.bio.ed.ac.uk/>.
41. Ramos, L.J., Souza, J.L., Souza, C.R., Oliveira, J., Rosa, J.A., Camargo, L.M.A., Cunha, R.M., Meneguetti, D.U.O., 2018. First report of *Triatoma sordida* Stål, 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) in the State of Acre and Brazilian Western Amazon. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 51(1), 77–79. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0161-2017>.
42. Ribeiro Jr, G., Santos, C.G.S., Lanza, F., Reis, J., Vaccarezza, F., Diniz, C., Miranda, D.L.P., Araújo, R.F., Cunha, G.M., Carvalho, C.M.M., Fonseca, E.O.L., Santos, R.F., Sousa, O.M. F., Reis, R.B., Araújo, W.N., Gurgel-Gonçalves, R., Reis, M.G. 2019. Wide distribution of *Trypanosoma cruzi*-infected triatomines in the State of Bahia, Brazil. *Parasit. Vectors* 12, 604. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3849-1>.
43. Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19(12), 1572–1574. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>.
44. Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-Delbarrio, J.C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S.E., Sánchez-Gracia, A. 2017. Dna SP v6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. *Mol Biol Evol* 34, 3299–3302. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>.
45. 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>.

-
46. Sethuraman, A. 2013. On inferring and interpreting genetic population structure - applications to conservation, and the estimation of pairwise genetic relatedness. Graduate Theses and Dissertations (Bioinformatics and Computational Biology, PhD). Iowa State University. <https://doi.org/10.31274/etd-180810-4295>. Accessed date: 12 May 2020.
 47. Silva, R.A., Scandar, S.A., Pauliqu vis-Júnior, C., Sampaio, S.M., Rodrigues, V.L., 2005. Ampliação de raio de pesquisa de triatomíneos na atividade de atendimento às notificações em área de *Triatoma sordida* (St l, 1859) no Estado de São Paulo. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 38(4), 339-43. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822005000400012>.
 48. St l, C., 1859. Monographie der Gattung *Conorhinus* und Verwandten. Berliner Entomologische Zeitschrift 3, 99-117. <https://doi.org/10.1002/mmnd.18590030202>.
 49. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA 6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol. Biol. Evol. 30, 2725-2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>.
 50. Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL-W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22, 4673-4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>.
 51. Wright, S., 1978. Evolution and the genetics of populations: a treatise in four volumes, fourth vol.: Variability within and among natural populations. The University of Chicago Press. Chicago and London.
 52. Wright, S., 1951. The genetical structure of populations. Ann. Eugen. 15, 323-354.
 53. WHO (World Health Organization), 2020. Chagas Disease (American Trypanosomiasis). World Health Organization. <https://www.who.int/chagas/disease/en/>, Accessed date: 30 April 2020.

Table 1. States and locations sampled, number of individuals analyzed in each location (N), natural environment and identification code (voucher) of the collected *Triatoma sordida* specimens.

States	Municipalities	Year of collecting	N	Environment	Voucher
Bahia	Gentio de Ouro	2018	3	P	SI1, SI2, SI3
	Macaúbas	2012	5	P	MAC1, MAC2, MAC3, MAC4, MAC7, MAC8, MAC9
	Seabra*	2014	1	P	SEA1
	Tanhaçu	2017	6	P	TA1, TA2, TA3, TA4, TA5, TA6
Goiás	Posse	1998	6	P	GO1, GO2, GO3, GO4, GO5, GO6
Minas Gerais	Brasília de Minas	2018	3	P	BR1, BR2, BR3
	Catuti	2017	6	P	CAT1, CAT2, CAT3, CAT4, CAT5, CAT6
	Monte Azul*	2016	1	P	MA1
	Porteirinha	2017	3	P	POR1, POR2, POR3
	Riacho dos Machados	2017	7	P	RM1, RM2, RM3, RM4, RM6, RM8, RM10
Mato Grosso do Sul	Corumbá	2016	7	P	COR1, COR2, COR3, COR4, COR5, COR6, COR7
	Pantanal*	2016	1	P	PAN1

*GenBank sequences; P - peridomestic.

Table 2. Description of cytochrome b polymorphisms identified in *Triatoma sordida* samples from Brazil.

Nucleotide ^a	9	26	33	38	54	62	86	161	167	182	218	302	443	473	482	551
<i>T. sordida</i>	<u>GAC</u> ^c	TAA	<u>GAA</u>	<u>GAG</u>	<u>TCG</u>	<u>TAG</u>	TTC	GTA	AGC	<u>TAT</u>	<u>CGC</u>	GTT	<u>GAG</u>	<u>CGC</u>	<u>CTC</u>	AAC
	(D/D) ^d	(*/*)	(E/E)	(E/G)	(S/S)	(*/W)	(F/S)	(V/G)	(S/N)	(Y/C)	(R/H)	(V/A)	(E/G)	(A/H)	(L/P)	(N/S)
1 (3) ^b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2 (10)	T	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G
3 (3)	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	G
4 (5)	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	A	-	G
5 (7)	T	-	-	G	-	G	C	G	A	-	A	-	-	-	-	G
6 (2)	T	-	-	G	-	G	C	G	A	G	A	-	-	-	-	G
7 (2)	T	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G
8 (12)	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G
9 (1)	T	-	-	G	-	-	C	G	A	-	A	-	-	-	-	G
10 (2)	T	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	G
11 (2)	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	G

a: nucleotide numbers according to sequence of *T. sordida* from Pantanal – MS used as reference in this study (GenBank accession number MH029694); b: the number of Brazilian isolates characterised by the haplotype is indicated in parenthesis; c: the codon position and the nucleotide substitution are shown in underlined text; * indicate stop codons. Dashes indicate identical nucleotides of the reference sequence; d: the first amino acid corresponds to the sequence of the reference isolate, while the second is the polymorphic amino acid obtained from the Brazilian haplotypes.

Table 3. Description of nd1 gene polymorphisms identified in *Triatoma sordida* samples from Brazil.

Nucleotide ^a	20	75	130	182	190	265	268	337	338	406	451	466
<i>T. sordida</i>	<u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> ^c	<u>A</u> <u>A</u> <u>A</u>	<u>C</u> <u>A</u> <u>A</u>	<u>A</u> <u>G</u> <u>T</u>	<u>C</u> <u>A</u> <u>C</u>	<u>C</u> <u>C</u> <u>A</u>	<u>G</u> <u>C</u> <u>C</u>	<u>A</u> <u>A</u> <u>C</u>	<u>G</u> <u>A</u> <u>C</u>	<u>A</u> <u>A</u> <u>T</u>	<u>A</u> <u>A</u> <u>A</u>	<u>A</u> <u>C</u> <u>C</u>
	(E/G) ^d	(K/K)	(Q/R)	(S/N)	(H/Y)	(P/L)	(A/T)	(N/D)	(D/E)	(N/S)	(K/E)	(T/P)
1 (1) ^b	-	-	G	A	T	T	A	-	-	G	G	C
2 (11)	-	-	G	A	T	T	A	G	-	G	G	-
3 (9)	G	-	G	A	T	T	A	G	-	G	G	-
4 (1)	G	-	G	A	T	T	A	G	-	G	-	-
5 (6)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6 (1)	-	-	G	A	T	T	A	G	G	G	G	-
7 (3)	-	-	G	-	T	-	A	G	-	G	-	-
8 (3)	-	-	G	-	T	-	A	G	-	G	-	-
9 (4)	-	-	G	A	T	T	A	G	G	G	G	-
10 (1)	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

a: nucleotide numbers according to sequence of *T. sordida* from Corumbá – MS (H5) used as reference in this study (unpublished sequence); b: the number of Brazilian isolates characterised by the haplotype is indicated in parenthesis; c: the codon position and the nucleotide substitution are shown in underlined text; * indicate stop codons. Dashes indicate identical nucleotides of the reference sequence; d: the first amino acid corresponds to the sequence of the reference isolate, while the second is the polymorphic amino acid obtained from the Brazilian haplotypes.

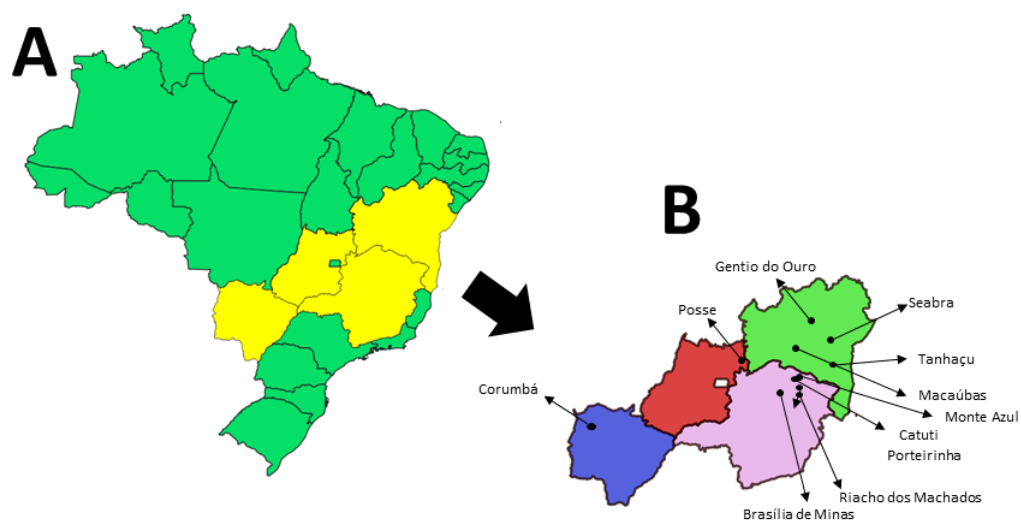


Figure 1. Map of Brazil showing the study sample areas for *Triatoma sordida* populations.

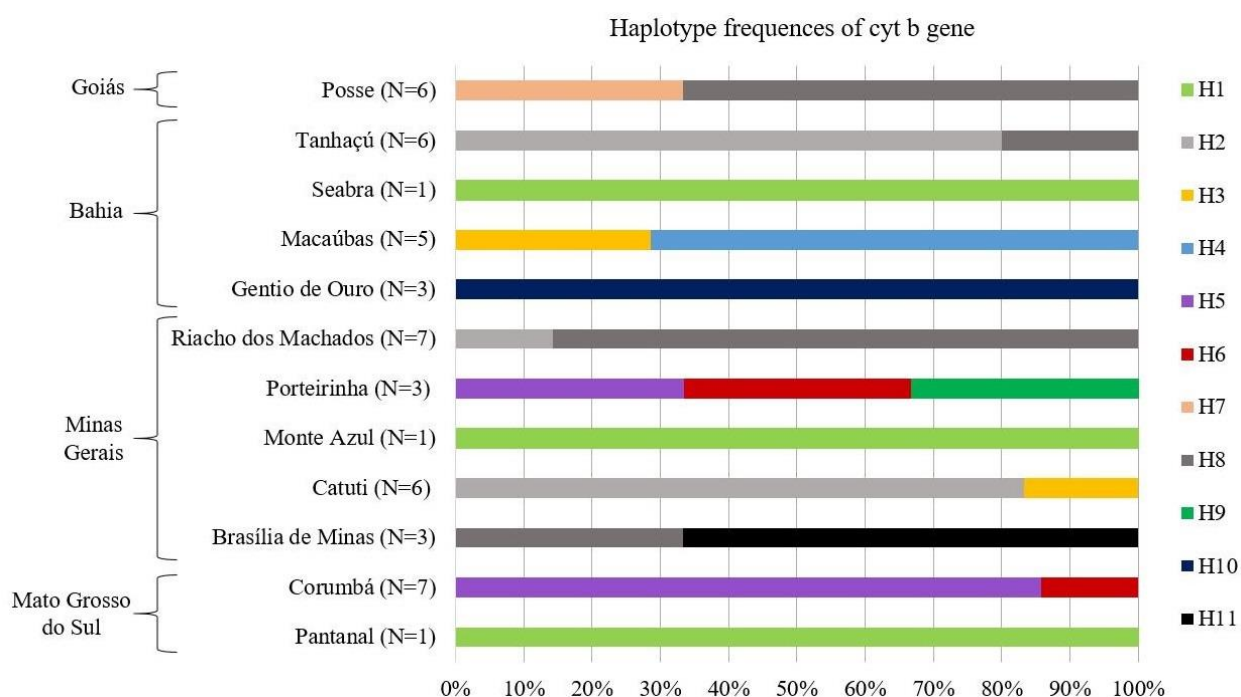


Figure 2. Haplotype frequencies of cytochrome b in Brazilian samples. The scale bar shows the percentage of each haplotype per location indicated in the horizontal boxes.

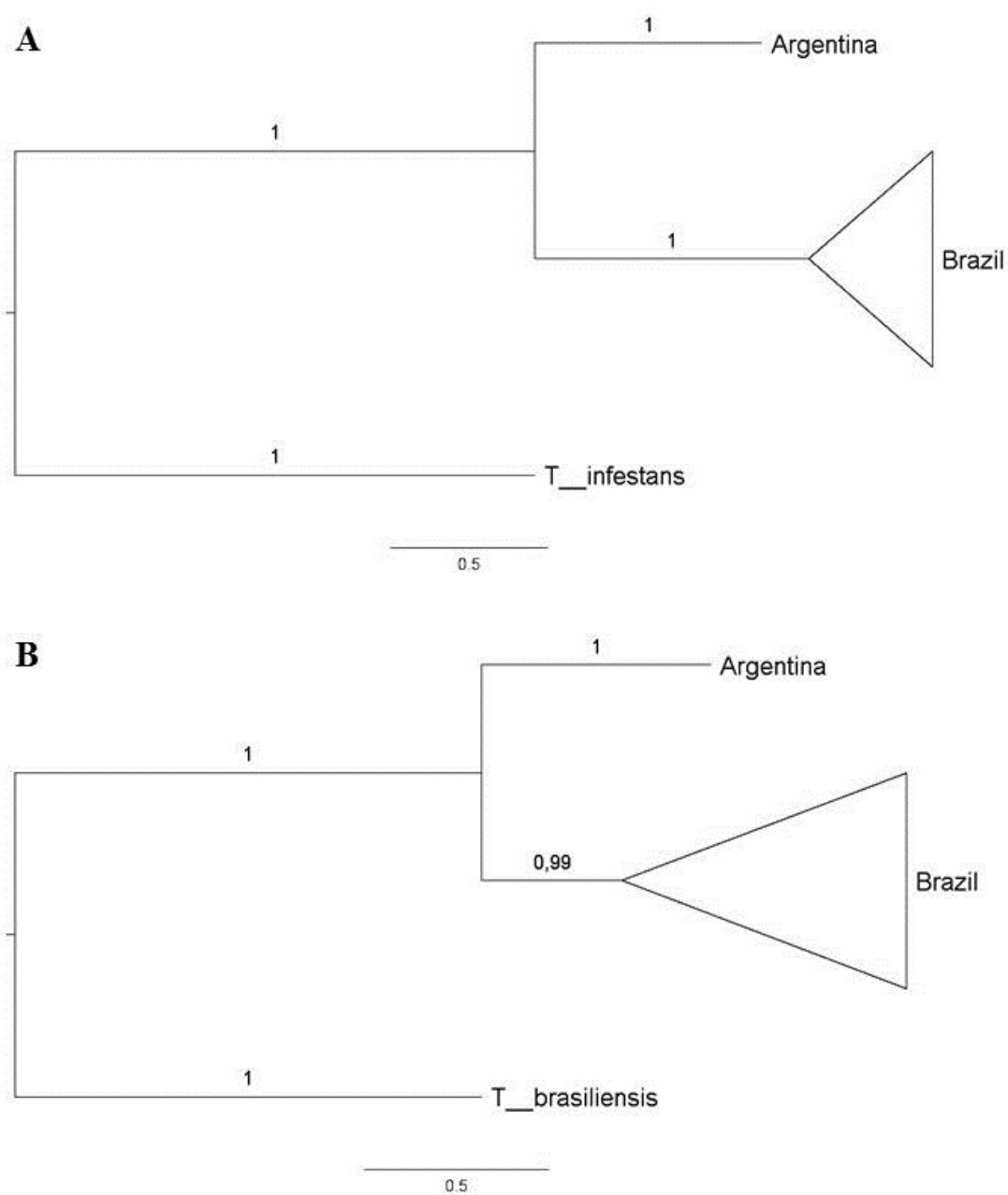


Figure 3. Bayesian inference trees reconstructed from cyt b (A) and nd1 (B) sequences. The numbers above the branches represent clade support higher than 70. A cytochrome b sequence of *Triatoma infestans* and an nd1 sequence of *T. brasiliensis* were used as outgroups, respectively.

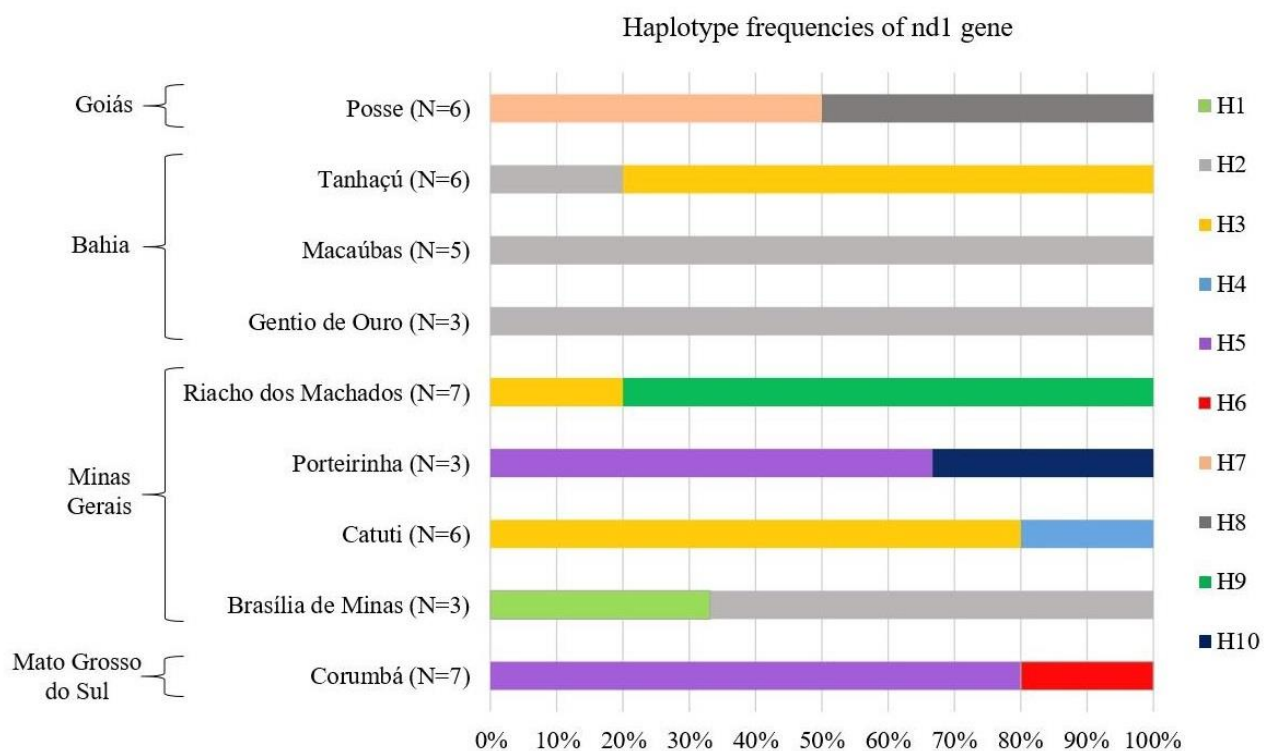


Figure 4. Haplotype frequencies of nd1 gene in Brazilian samples. The scale bar shows the percentage of each haplotype per location indicated in the horizontal boxes.

Supplementary material 1. Estimates of evolutionary divergence between sequences of cyt b gene.

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)	(16)	(17)	(18)	(19)	(20)	(21)	(22)	(23)	(24)
(1) GE1																								
(2) GE2	0,000																							
(3) MAC1	0,007	0,007																						
(4) MAC2	0,007	0,007	0,000																					
(5) MAC3	0,007	0,007	0,000	0,000																				
(6) MAC4	0,005	0,005	0,002	0,002	0,002																			
(7) MAC7	0,005	0,005	0,002	0,002	0,002	0,000																		
(8) MAC8	0,007	0,007	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002																	
(9) MAC9	0,007	0,007	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002	0,000																
(10) SEA1	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,005	0,005	0,007	0,007															
(11) TA1	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,004	0,004	0,005	0,005	0,005	0,005													
(12) TA2	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,004	0,004	0,005	0,005	0,005	0,000													
(13) TA3	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,004	0,004	0,005	0,005	0,005	0,000	0,000												
(14) TA4	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,002	0,002	0,004	0,004	0,004	0,002	0,002	0,002											
(15) TA5	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,004	0,004	0,005	0,005	0,005	0,000	0,000	0,000	0,002										
(16) GO1	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,004	0,004	0,005	0,005	0,005	0,004	0,004	0,004	0,002	0,004									
(17) GO2	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,004	0,004	0,005	0,005	0,005	0,004	0,004	0,004	0,002	0,004	0,000								
(18) GO3	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,002	0,002	0,004	0,004	0,004	0,002	0,002	0,002	0,000	0,002	0,002	0,002							
(19) GO4	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,002	0,002	0,004	0,004	0,004	0,002	0,002	0,002	0,000	0,002	0,002	0,002	0,000						
(20) GO5	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,002	0,002	0,004	0,004	0,004	0,002	0,002	0,002	0,000	0,002	0,002	0,002	0,000	0,000					
(21) GO6	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,002	0,002	0,004	0,004	0,004	0,002	0,002	0,002	0,000	0,002	0,002	0,002	0,000	0,000	0,000				
(22) BR1	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,002	0,002	0,004	0,004	0,004	0,002	0,002	0,002	0,000	0,002	0,002	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000			
(23) BR2	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,004	0,004	0,005	0,005	0,005	0,004	0,004	0,004	0,002	0,004	0,004	0,004	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002		
(24) BR3	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,004	0,004	0,005	0,005	0,005	0,004	0,004	0,004	0,002	0,004	0,004	0,004	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,000	
(25) CAT1	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,004	0,004	0,005	0,005	0,005	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,004	0,004	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,004	0,004
(26) CAT2	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,004	0,004	0,005	0,005	0,005	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,004	0,004	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,004	0,004
(27) CAT3	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,004	0,004	0,005	0,005	0,005	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,004	0,004	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,004	0,004
(28) CAT4	0,005	0,005	0,002	0,002	0,002	0,000	0,000	0,002	0,002	0,005	0,004	0,004	0,004	0,002	0,004	0,004	0,004	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,004	0,004
(29) CAT5	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,004	0,004	0,005	0,005	0,005	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,004	0,004	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,004	0,004
(30) CAT6	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,004	0,004	0,005	0,005	0,005	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,004	0,004	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,004	0,004
(31) MA1	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,005	0,005	0,007	0,007	0,000	0,005	0,005	0,005	0,004	0,005	0,005	0,005	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,005	0,005
(32) POR1	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,011	0,011	0,013	0,013	0,013	0,011	0,011	0,011	0,009	0,011	0,011	0,011	0,009	0,009	0,009	0,009	0,011	0,011	0,011
(33) POR2	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,013	0,013	0,015	0,015	0,015	0,013	0,013	0,013	0,011	0,013	0,013	0,013	0,011	0,011	0,011	0,011	0,013	0,013	0,013
(34) POR3	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,015	0,015	0,016	0,016	0,016	0,015	0,015	0,015	0,013	0,015	0,015	0,015	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,015	0,015
(35) RM1	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,002	0,002	0,004	0,004	0,004	0,002	0,002	0,002	0,000	0,002	0,002	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002

[illegible]

	(25)	(26)	(27)	(28)	(29)	(30)	(31)	(32)	(33)	(34)	(35)	(36)	(37)	(38)	(39)	(40)	(41)	(42)	(43)	(44)	(45)	(46)	(47)	(48)	(49)	(50)
(26) CAT2	0,000																									
(27) CAT3	0,000	0,000																								
(28) CAT4	0,004	0,004	0,004																							
(29) CAT5	0,000	0,000	0,000	0,004																						
(30) CAT6	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000																					
(31) MA1	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005																				
(32) POR1	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,013																			
(33) POR2	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,015	0,002																		
(34) POR3	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,016	0,004	0,002																	
(35) RM1	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,004	0,009	0,011	0,013																
(36) RM2	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,004	0,009	0,011	0,013	0,000															
(37) RM3	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,004	0,009	0,011	0,013	0,000	0,000														
(38) RM4	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,004	0,009	0,011	0,013	0,000	0,000	0,000													
(39) RM6	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,005	0,011	0,013	0,015	0,002	0,002	0,002	0,002												
(40) RM8	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,004	0,009	0,011	0,013	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002											
(41) RM10	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,004	0,009	0,011	0,013	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000										
(42) COR1	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,015	0,002	0,000	0,002	0,011	0,011	0,011	0,011	0,013	0,011	0,011									
(43) COR2	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,016	0,004	0,002	0,000	0,013	0,013	0,013	0,013	0,015	0,013	0,013	0,002								
(44) COR3	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,015	0,002	0,000	0,002	0,011	0,011	0,011	0,011	0,013	0,011	0,011	0,000	0,002							
(45) COR4	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,015	0,002	0,000	0,002	0,011	0,011	0,011	0,011	0,013	0,011	0,011	0,000	0,002	0,000						
(46) COR5	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,015	0,002	0,000	0,002	0,011	0,011	0,011	0,011	0,013	0,011	0,011	0,000	0,002	0,000	0,000					
(47) COR6	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,015	0,002	0,000	0,002	0,011	0,011	0,011	0,011	0,013	0,011	0,011	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000				
(48) COR7	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,015	0,002	0,000	0,002	0,011	0,011	0,011	0,011	0,013	0,011	0,011	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000			
(49) PAN1	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,000	0,013	0,015	0,016	0,004	0,004	0,004	0,004	0,005	0,004	0,004	0,015	0,016	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	
(50) OUT	0,206	0,206	0,206	0,209	0,206	0,206	0,206	0,199	0,199	0,203	0,206	0,206	0,206	0,206	0,206	0,206	0,206	0,199	0,203	0,199	0,199	0,199	0,199	0,199	0,199	0,206

Supplementary material 2. Estimates of evolutionary divergence between sequences of nd1 gene.

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)	(16)	(17)	(18)	(19)	(20)	(21)	(22)	(23)	(24)
(1) GE1																								
(2) GE2	0,000																							
(3) MAC1	0,002	0,000																						
(4) MAC2	0,002	0,000	0,000																					
(5) MAC5	0,000	0,000	0,000	0,000																				
(6) MAC7	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000																			
(7) MAC8	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000																		
(8) MAC9	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000																	
(9) TA1	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002																
(10) TA2	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,000															
(11) TA3	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,000	0,000														
(12) TA4	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002	0,002													
(13) TA5	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,000	0,000	0,000	0,002												
(14) GO1	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,010	0,010	0,010	0,008	0,010											
(15) GO2	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,010	0,010	0,010	0,008	0,010	0,000										
(16) GO3	0,006	0,006	0,008	0,008	0,006	0,006	0,006	0,006	0,008	0,008	0,008	0,006	0,008	0,002	0,002									
(17) GO4	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,010	0,010	0,010	0,008	0,010	0,000	0,000	0,002								
(18) GO5	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,008	0,008	0,008	0,006	0,008	0,002	0,002	0,000	0,002							
(19) GO6	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,008	0,008	0,008	0,006	0,008	0,002	0,002	0,000	0,002	0,000						
(20) BR1	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,006	0,006	0,006	0,004	0,006	0,012	0,012	0,010	0,012	0,010	0,010					
(21) BR2	0,000	0,000	0,002	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002	0,002	0,000	0,002	0,008	0,008	0,006	0,008	0,006	0,006	0,004				
(22) BR3	0,000	0,000	0,002	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002	0,002	0,000	0,002	0,008	0,008	0,006	0,008	0,006	0,006	0,004	0,000			
(23) CAT1	0,002	0,002	0,004	0,004	0,002	0,002	0,002	0,002	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,010	0,010	0,008	0,010	0,008	0,008	0,006	0,002	0,002		
(24) CAT2	0,004	0,004	0,006	0,006	0,004	0,004	0,004	0,004	0,002	0,002	0,002	0,004	0,002	0,008	0,008	0,006	0,008	0,006	0,006	0,008	0,004	0,004	0,002	
(25) CAT3	0,002	0,002	0,004	0,004	0,002	0,002	0,002	0,002	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,010	0,010	0,008	0,010	0,008	0,008	0,006	0,002	0,002	0,000	0,002
(26) CAT5	0,002	0,002	0,004	0,004	0,002	0,002	0,002	0,002	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,010	0,010	0,008	0,010	0,008	0,008	0,006	0,002	0,002	0,000	0,002
(27) CAT6	0,002	0,002	0,004	0,004	0,002	0,002	0,002	0,002	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,010	0,010	0,008	0,010	0,008	0,008	0,006	0,002	0,002	0,000	0,002
(28) POR1	0,018	0,018	0,018	0,018	0,018	0,018	0,018	0,018	0,020	0,020	0,020	0,018	0,020	0,014	0,014	0,012	0,014	0,012	0,012	0,018	0,018	0,018	0,020	0,018
(29) POR2	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,018	0,018	0,018	0,016	0,018	0,012	0,012	0,010	0,012	0,010	0,010	0,016	0,016	0,016	0,018	0,016
(30) POR3	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,018	0,018	0,018	0,016	0,018	0,012	0,012	0,010	0,012	0,010	0,010	0,016	0,016	0,016	0,018	0,016
(31) RM1	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,004	0,004	0,004	0,002	0,004	0,006	0,006	0,008	0,006	0,008	0,008	0,006	0,002	0,002	0,004	0,006

(32) RM2	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,004	0,004	0,004	0,002	0,004	0,006	0,006	0,008	0,006	0,008	0,008	0,006	0,002	0,002	0,004	0,006
(33) RM3	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,004	0,004	0,004	0,002	0,004	0,006	0,006	0,008	0,006	0,008	0,008	0,006	0,002	0,002	0,004	0,006
(34) RM4	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,004	0,004	0,004	0,002	0,004	0,006	0,006	0,008	0,006	0,008	0,008	0,006	0,002	0,002	0,004	0,006
(35) RM6	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,010	0,010	0,008	0,010	0,008	0,008	0,006	0,002	0,002	0,000	0,002
(36) COR2	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,018	0,018	0,018	0,016	0,018	0,012	0,012	0,010	0,012	0,010	0,010	0,016	0,016	0,016	0,018	0,016
(37) COR3	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,018	0,018	0,018	0,016	0,018	0,012	0,012	0,010	0,012	0,010	0,010	0,016	0,016	0,016	0,018	0,016
(38) COR4	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,018	0,018	0,018	0,016	0,018	0,012	0,012	0,010	0,012	0,010	0,010	0,016	0,016	0,016	0,018	0,016
(39) COR5	0,016	0,016	0,018	0,018	0,016	0,016	0,016	0,016	0,018	0,018	0,018	0,016	0,018	0,012	0,012	0,010	0,012	0,010	0,010	0,016	0,016	0,016	0,018	0,016
(40) COR6	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,004	0,004	0,004	0,002	0,004	0,010	0,010	0,008	0,010	0,008	0,008	0,006	0,002	0,002	0,004	0,006
(41) OUT	0,103	0,103	0,105	0,105	0,103	0,103	0,103	0,103	0,105	0,105	0,105	0,103	0,105	0,103	0,103	0,101	0,103	0,100	0,100	0,103	0,102	0,102	0,105	0,102

	(25)	(26)	(27)	(28)	(29)	(30)	(31)	(32)	(33)	(34)	(35)	(36)	(37)	(38)	(39)	(40)	(41)
(26) CAT5	0,000																
(27) CAT6	0,000	0,000															
(28) POR1	0,020	0,020	0,020														
(29) POR2	0,018	0,018	0,018	0,002													
(30) POR3	0,018	0,018	0,018	0,002	0,000												
(31) RM1	0,004	0,004	0,004	0,020	0,018	0,018											
(32) RM2	0,004	0,004	0,004	0,020	0,018	0,018	0,000										
(33) RM3	0,004	0,004	0,004	0,020	0,018	0,018	0,000	0,000									
(34) RM4	0,004	0,004	0,004	0,020	0,018	0,018	0,000	0,000	0,000								
(35) RM6	0,000	0,000	0,000	0,020	0,018	0,018	0,004	0,004	0,004	0,004							
(36) COR2	0,018	0,018	0,018	0,002	0,000	0,000	0,018	0,018	0,018	0,018	0,018						
(37) COR3	0,018	0,018	0,018	0,002	0,000	0,000	0,018	0,018	0,018	0,018	0,018	0,000					
(38) COR4	0,018	0,018	0,018	0,002	0,000	0,000	0,018	0,018	0,018	0,018	0,018	0,000	0,000				
(39) COR5	0,018	0,018	0,018	0,002	0,000	0,000	0,018	0,018	0,018	0,018	0,018	0,000	0,000	0,000			
(40) COR6	0,004	0,004	0,004	0,016	0,014	0,014	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,014	0,014	0,014	0,014		
(41) OUT	0,105	0,105	0,105	0,096	0,093	0,093	0,105	0,105	0,106	0,105	0,105	0,093	0,093	0,093	0,094	0,105	

4.3. Capítulo III (Artigo científico publicado na revista *Insects*, FI: 2,220)

ALEVI, K. C. C.; OLIVEIRA, J.; GARCIA, A. C. C.; CRISTAL, D. C.; DELGADO, L. M. G.; BITTINELLI, I. F.; REIS, Y. V.; RAVAZI, A.; OLIVEIRA, A. B. B.; GALVÃO, C.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V.; MADEIRA, F. F. *Triatoma rosai* sp. nov. (Hemiptera, Triatominae): a new species of Argentinian Chagas disease vector described based on integrative taxonomy. *Insects*, Basel, v. 11, n. 12, p. 830, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/insects11120830>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2075-4450/11/12/830>. Acesso em: 14 set. 2021.

***Triatoma rosai* sp. nov. (Hemiptera, Triatominae): a new species of Argentinian Chagas disease vector described based on integrative taxonomy**

Simple Summary: Although all triatomines are potential vectors of Chagas' disease, there are species with greater or lesser vectorial importance. Therefore, the correct identification of triatomines species is essential for the vector control programs. In general, triatomines are identified by external morphological characters. However, there are species that are very similar or even morphologically identical, being important the use of complementary analyses for the correct identification of species. For this reason, this study focused on the use of morphological, morphometric, molecular data and experimental crosses to describe *Triatoma rosai* sp. nov., a new species of Argentinian Chagas disease vector. Significant morphological and morphometric differences, associated with phylogenetic support and high mortality rate of the hybrids made it possible to confirm the specific *status* of *T. rosai* sp. nov., emphasizing the importance of integrative analyses for the taxonomy of triatomines.

Abstract: Chagas disease is the most prevalent neglected tropical disease in the Americas and makes an important contribution to morbidity and mortality rates in countries where it is endemic since 30 to 40% of patients develop cardiac diseases, gastrointestinal disorders, or both. In this paper, a new species of the genus *Triatoma* is described based on specimens collected in the Department San Miguel, Province of Corrientes, Argentina. *Triatoma rosai* sp. nov. is closely related to *T. sordida* (Stål, 1859), and was characterized based on integrative taxonomy using morphological, morphometric, molecular data and experimental crosses. These analyses, combined with data from the literature (cytogenetics, electrophoresis pattern, molecular analyses, cuticular hydrocarbons pattern, geometric morphometry, cycle,

and average time of life as well as geographic distribution) confirm the specific *status* of *T. rosai* sp. nov. Natural *Trypanosoma cruzi* infection, coupled with its presence mostly in peridomestic habitats, indicates that this species can be considered as an important Chagas disease vector from Argentina.

Keywords: triatomines; morphology; morphometry; molecular; experimental crosses; Chagas disease.

1. Introduction

Chagas disease is the most prevalent neglected tropical disease in the Americas [1] and makes an important contribution to morbidity and mortality rates in countries where it is endemic [2,3] since 30 to 40% of patients develop cardiac diseases, gastrointestinal disorders, or both [2]. It is estimated that 8 million people worldwide are infected by *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) (etiologic agent of Chagas disease) [3] and about 70 million people are living in areas with contamination risk [4], causing incapacity in infected individuals and more than 10 000 deaths per year [3,4].

Although there are several forms of contamination – organ transplantation of an infected donor, laboratory accidents, ingestion of contaminated food or liquids (sugarcane, acai and raw meat), congenital (vertically between mother and child) or can happen through blood transfusion [5] – vectorial transmission by triatomines (Hemiptera, Triatominae) is the most important from the epidemiological point of view [3]. Thus, vector control remains the most useful method to prevent the infection [3].

Currently, there are 154 species of triatomines described, grouped into 18 genera and five tribes [6]. Although there are species with a greater or lesser degree of importance in the transmission of Chagas disease, all triatomines, of both sexes and at any stage of development after hatching, are considered as potential vectors of this disease described more than 110 years ago [7,8].

Triatoma sordida (Stål, 1859) (Hemiptera, Triatominae) is an endemic species in South America, distributed in Brazil, Argentina, Bolivia, Paraguay and Uruguay, in the Atlantic Forest, Caatinga, Cerrado, Chaco, and Pantanal biomes [9-11]. The taxonomic history of this species has been discussed since the 1960s when Abalos and Wygodzinsky [12] observed morphological variation among *T. sordida* populations from Santiago del Estero (northeastern Argentina). Subsequently, Actis et al. [13] evaluated the electrophoretic

profiles of hemolymph proteins among Argentinean sylvatic samples with domestic specimens from Brazil and significant differences were observed. However, these wild populations of *T. sordida* from Argentina were described as *T. garciabesi* Carcavallo et al., 1967 [14]. After 12 years, this species was synonymized with *T. sordida* [8] and based on differences in their morphology, isoenzymes and chromosomal characteristics, was once again validated as *T. garciabesi* [15]. Noireau et al. [16] also observed a high genetic distance between *T. sordida* from Bolivia and considered the occurrence of the phenomenon of cryptic speciation for the first time. However, Panzera et al. [17] showed that one of the populations used by Noireau et al. [16] was *T. garciabesi* and not *T. sordida*.

Although these cases of “intraspecific variation” (which were interspecific [17]) have been performed incorrectly, intraspecific polymorphisms have been reported among populations of *T. sordida* from Brazil, Argentina and Bolivia: Panzera et al. [17,18] based on chromosomal (constitutive heterochromatin pattern and FISH with a 45S rDNA probe) and molecular data (mitochondrial gene COI) observed differences between these populations and suggested the existence of at least two possible different species associated with *T. sordida* (*T. sordida sensu stricto*), namely *T. sordida* Argentina and *T. sordida* La Paz (differences confirmed by the cuticular hydrocarbons pattern [19]). Also, morphometric analyses also differentiated *T. sordida* from Argentina of the specimens from Brazil and Bolivia and emphasized the importance of additional studies to confirm the specific validity of the new taxon(s) [20].

Thus, based on several analyses based on integrative taxonomy (morphological, morphometric, molecular data and experimental crosses), as well as information from the literature (cytogenetics, electrophoresis pattern, molecular analyses, cuticular hydrocarbons pattern, geometric morphometry, cycle and average time of life as well as geographic distribution) that support the specific *status* of *T. sordida* from Argentina as a new taxon, we describe *Triatoma rosai* sp. nov.

2. Materials and Methods

2.1. Sampling

We examined specimens from Department San Miguel, Province of Corrientes, Argentina, characterized initially as *T. sordida* using the taxonomic key for the genus *Triatoma* Laporte, 1832 published by Lent and Wygodzinsky [8]. All studied species were

kept alive at the Triatominae Insectarium of the São Paulo State University “Julio de Mesquita Filho”, School of Pharmaceutical Sciences, Araraquara, São Paulo, Brazil.

2.2. Morphological identification and description

The description of *T. rosai* sp. nov. included 7 males and 7 females previously characterized as *T. sordida* (based on the dichotomous key by Lent and Wygodzinsky [8]). *Triatoma rosai* sp. nov. was compared with 9 males and 9 females specimens of *T. sordida* from Riacho dos Machados, Minas Gerais, Brazil (MG/Brazil) deposited in the Dr. Jose Maria Soares Barata Triatominae Collection (CTJMSB) of the São Paulo State University “Julio de Mesquita Filho”, School of Pharmaceutical Sciences, Araraquara, São Paulo, Brazil.

2.3. Morphological studies in Scanning Electron Microscopy

For the comparative morphological study, 2 males and 2 females of *T. rosai* sp. nov. and 2 males and 2 females of *T. sordida* (MG/Brazil) from Araraquara Triatominae Colony (CTA) were used. For morphological characterization of the triatomines in Scanning Electron Microscope (SEM) (according to Rosa et al. [21]), four individuals of each locality were used, emphasizing the study of the pronotum, scutellum, as well as female external genitalia. For this study, the insects were cleaned in ultrasonic devices, dehydrated in graded series of alcohol, oven dried at 45° for 20 minutes, and then fixed in small aluminum cylinders with colorless enamel. Afterward, they were metalized by sputtering for two minutes with 10mA of power. After the metallization process, the samples were analysed and photographed on the Topcon SM-300 SEM (Digital, Hasunuma-cho, Tokyo, Japan).

2.4. Morphological studies in Optical Microscopy

For the comparative morphological study of *T. rosai* sp. nov. and *T. sordida* we used images of the male's head, pronotum, and genitalia. For optical microscopy (OM), adult specimens of *T. rosai* sp. nov. (3 males and 3 females) and of *T. sordida* (MG/Brazil) (3 males and 3 females) were used. The analyses were performed using the Leica MZ APO Stereoscope Microscope (Digital, Wetzlar, Germany) with the Motic Images Advanced 3.2 plus image analysis system coupled.

2.5. Morphometric studies

For measurement analyses, adult specimens of *T. rosai* sp. nov. (7 males and 7 females), and *T. sordida* (MG/Brazil) (9 males and 9 females) were used. The measurements

of the head, thorax, abdomen, pronotum, and scutellum were performed using the Leica MZ APO Stereoscope Microscope with the Motic Images Advanced 3.2 plus image analysis system coupled. The data obtained were organized in the Excel 2007[®] spreadsheet software and presented as a table. The measurements of the thorax and abdomen parameters were statistically analysed in the GraphPad Prism program version 7 for Windows, using the Welch's t-test.

2.6. Molecular phylogeny and genetic distance

Five specimens of *T. sordida* (*T. sordida sensu stricto*) (Brazil: Posse/Goiás and Seabra/Bahia), *T. sordida* La Paz (Bolivia: La Paz), and *T. rosai* sp. nov., were used for molecular analyses. For DNA extraction, using the DNeasy Blood and Tissue kit (QIAGEN[®], Hilden, Germany), one or two legs were placed in a 1.5 mL microtube, dipped into liquid nitrogen, and ground to powder. A 561-bp fragment of the mitochondrial (mt) cytochrome b gene (cyt b) and a 798-pb fragment of the nuclear Internal Transcribed Spacer-1 gene (ITS-1) were polymerase chain reaction (PCR) amplified as described in Monteiro et al. [22] and Tartarotti and Ceron [23], respectively. Amplicons were purified using a GFX PCR DNA & Gel Band kit (GE Healthcare and Life Technology[®], Chicago, IL, USA) and both strands were subjected to Sanger sequencing reactions (ABI Prism[®] BigDye[®] Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and run on an ABI 3730 sequencer. The sequences of all individuals were analyzed by using BioEdit Alignment Editor 7.0.5.3 [24] and a consensus sequence was obtained for each DNA segment. Sequences from other Brazilian localities (MG and MS), *T. garciabesi*, *T. guasayana* Wygodzinsky and Abalos, 1949 and *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) available on GenBank were also added to the alignment (Table 1). The sequences were aligned using the ClustalW Multiple Alignment tool [25]. Using the MEGA software (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) v.6 [26] we constructed a genetic distance matrix using the Kimura-2 parameter distance model for estimation of evolutionary divergence between sequences of the cyt b gene.

For the Bayesian inference, we combined unpublished and GenBank sequences (Table 1). All sequences used were submitted to the MEGA X program [27] and aligned by the Muscle method [28]. The alignments of each molecular marker (COI, Cyt b, 28S, 16S, and ITS-1) were concatenated by name using Seaview 4 software [29], posteriorly being converted on Mesquite program [30]. The data were partitioned for each marker, with the best-fit models of nucleotide substitution (lowest Akaike Information Criterion value) for the

phylogenetic reconstruction determined by jModelTest 2 program [31], for each of them: HKY + G for 16S, HKY + I + G for Cyt b, HKY for ITS-1, GTR for 28S, and GTR + G for COI. A Bayesian phylogenetic tree for the complete data set of concatenated sequences was inferred in MrBayes 3.2 [32]. The trees were sampled every 1,000 generations, for a total of 100 million generations, in two independent runs and with a burn-in of 25%. The reliability of clustering patterns in trees was assessed by 1,000 bootstrap replicates [33]. Tracer v. 7.0 [34] was used to verify the stabilization moment (ESS values above 200) of the tree samples. The generated tree was visualized and edited in FigTree v.1.4.3 program [35].

2.7. Experimental Crosses

Reciprocal experimental crosses were conducted between *T. rosai* sp. nov. and *T. sordida* to evaluate the pre- and/or post-zygotic reproductive isolation barriers [36, 37]. The experimental crosses were conducted in the Triatominae Insectary of the School of Pharmaceutical Sciences, according to the experiments of Costa et al. [38] and Mendonça et al. [39]: the insects were sexed as 5th instar-nymphs, and males and females were kept separately until they reached the adult stage 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. The eggs were collected weekly throughout the female's oviposition periods and the egg fertility rate was calculated. Besides, after the hybrids hatched, the development of 1st instar-nymphs until adults was also monitored weekly to assess the mortality rate.

2.8. Distribution map

Based on Lent and Wygodzinsky [8], Panzera et al. [17,18], Dujardin et al. [40]; Galvão et al. [41], Calderón-Fernández and Juárez [19], and Nattero et al. [20] we prepared a distribution map of *T. rosai* sp. nov. across Argentina provinces. The map was developed in the QGIS 3.12 program [42], using the layers available at the National Geographic Institute [43] having the World Geodetic System 1984 (WGS 84) Coordinate Reference System as base.

3. Results

3.1. Systematics

Family Reduviidae Latreille, 1807

Subfamily Triatominae Jeannel, 1919

Genus *Triatoma* Laporte, 1832

Triatoma rosai Alevi, Oliveira, Garcia, Cristal, Delgado, Bittinelli, Reis, Ravazi, Oliveira, Galvão, Azeredo-Oliveira, Madeira, 2020 sp. nov. (Figures 1A, B; 2A, B; 3A, C; 4A, C, E; 5A, C, E; 6A, B; 7A-C; 8A, B; 9A-C)

3.1.1. Type Material

Holotype: male, ARGENTINA, Department San Miguel, Province of Corrientes, 09.08.1999, collection manual, leg. (CEJMSB).

Paratypes: 9 females and 8 males, ARGENTINA, Department San Miguel, Province of Corrientes, 09.08.1999, collection manual, leg. (CEJMSB).

Additional paratypes. Collection of Triatomines of the Oswaldo Cruz Institute (CTIOC/FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil (1 male and 1 female), and Entomological Reference Collection of the Faculty of Public Health (FSP/USP), São Paulo, Brazil (1 male and 1 female).

3.2. Description

3.2.1. Male

Coloring: general brown color with pale yellowish tones with portions or spots darkened to brownish or blackish (Figs. 1A, B; 2A, B). Head, including neck, mainly dark brown with two lateral spots in the catch and darkened or blackened ventrally and laterally behind the eyes; ocellar tubercle, median portion in the space between the eyes and the apices of dark anteniferous tubercles; first and second antennal segments brown and third and fourth brownish; mostly pale lip, with darkened portions (Fig. 3A). Labium with the three visible light brown segments (Figs. 1B; 2B). Thorax mainly dark brown in general; pronotum brown (Fig. 3C); anterolateral angles blackened with yellowish ends; longitudinal medial groove in the anterior lobe, variable in length, darkened, a spot in pairs in the anterior lobe of yellowish color, posterior lobe of brown coloration; dark brown scutellum on the sides and brownish in the central portion with yellowish apex. Legs generally light brown to yellowish with the following portions or markings darkened: coxae completely yellowed; anterior and medium femurs with an ill-defined complete median or submedian black ring and the apex slightly darkened; these markings can be variable or absent; posterior femur with a distal submedian

ring slightly large and incomplete ventrally; tibiae with brownish sub-basal rings, larger in the posterior tibiae and slightly subapically darkened or with the apical third or darkened apical quarter; yellowish tarsi (Figs. 1A, B; 2A, B). Hemelytra mostly grayish; with yellowish spots at the base of the dorsal surface, laterally, and in the lateral portion, basally; two black spots at the basal angle of the second disk cell of the membrane; sometimes the basal portions of the veins in that cell are also black. Abdomen, in dorsal view: brownish tergites with some slightly darkened portions, as an intersegmental bridge between the first and second segments, except their lateral portions (Figs. 1A, 2A). Connexivum with distal areas having two dark spots and whitish pale yellowish basal part, each spot occupying approximately 1/4 of the respective segment; a medium-large oval black spot in the sternite VIII, in ventral view: sternites mostly yellowish; blackened sternites, except in the lateral portions; a pair of wavy black spots on the side, which in some specimens is smaller, incomplete, stained with a pale color in its center, or divided into a pair of sub-median spots, or joined to the side band by the darkened posterior portion of the segment (Figs. 1B, 2B) The markings on the ventral connected segments are generally the same as those on the dorsal portions, but more variable, weakly marked or partially or completely absent in some segments.

Vestiture: when recorded in SEM, it is possible to perceive that the general integument is covered by short, thin, somewhat curved bristles, for example: Figs. 4A, 5A, C and E. Besides, the following vestiture characteristics, also evident under the optical stereomicroscope, were registered: head: smooth eyes; sparse short or slightly longer bristles, clear to yellowish in the distal portion of the clypeus, numerous on the lip; some bristles scattered in the anterior and lateral portions of the base of the first visible lip segment; second visible lip segment with some short, erect bristles inserted on the lateral and subapical surfaces; last lip segment with many upright, long, thin and clear scattered setae.

Clypeus narrow slightly enlarged behind the middle. Genae tapered and slightly apically pointed, distinctly extending beyond the level of the apex of the clypeus. Jugae, apically subangular. Eyes in lateral view reaching the lower level, but not reaching the level of the superior surface of the head. Anteniferous tubercles are inserted behind the middle of the anteocular region. The first antennal segment below the middle of the clypeus level. The first rostral segment is very short, not extending exactly to the level of the apex of the yokes, the second reaching the level of the posterior margin of the eyes (Figs. 1A, B; 2A, B; 3A; 4A).

Anterior lobe of pronotum with discal and lateral tubercles. Submedian carinae extending near the posterior border of the pronotum. Humeral angles are slightly curved, slightly angular. Anterolateral projections of the pronotum small, but detached, narrowly apically rounded. Scutellum has a well-developed central depression. Large scutellar process, about three-quarters of the length of the main body of the scutellum, horizontal, subcylindrical, slightly tapering apically, obliquely truncated distally in the lateral view. Hemelytra approaching or reaching the apex of the seventh urotergite, in males and females I reached half of the seventh urotergite (Figs. 1A; 2A; 3C; 4C).

Relatively slender legs, anterior femurs longer than broad. The anterior and middle femurs with subapically robust pair of denticles. Spongy fossulae in the anterior and middle tibiae of males, absent in females. Venter convex, weakly flattened in some specimens of both sexes, delicately striated across, sparsely defined. Spiracles variable in position, from adjacent to the connective internal margin to distant from the internal margin by twice its diameter (Figs. 1A, B; 2A, B).

Male genitalia: genital capsule rounded, in the ventral view, does not show the exposure of the pigophore (Fig. 6 A, B) is smooth and shiny integument; in dorsal view (Fig. 6A). Sclerotized, triangular (equilateral) pigophore median process (Fig. 7C), slightly larger towards the apex; apical margin almost straight, slightly curved (Fig. 7C). Parameters (pa) slightly not exposed when the genital capsule is in situ (Fig. 6A) or in a ventral view (Fig. 6B); their apexes almost touch each other in a resting position (Fig. 6B). Symmetrical, elongated, curved approximately in the middle third; slightly larger in the apical quarter; truncated apex, with short subapical tooth on the lower margin; mainly glabrous, with some thin bristles scattered and a group of short, thicker bristles mediated to the subapical tooth (Figs. 7A, B), the basal plate arm with moderately short and not curved basal plate arms (bpa), connected by a narrow basal plate bridge (Fig. 8A). Endosomal arms formed by a pair of parallel arms, almost straight in the middle portion, larger in the basal portion, joined at the base and at the apex, which are continuous with the dorsal fusion of sclerite-sclerite endosome (Fig. 9A). After inflation, the endosome takes on an irregular shape with rough streaks (Fig. 9B). Endosome wall striated longitudinally in the basal portion in ventral view (Fig. 9B).

3.2.2. Female

Similar to males in general.

3.3. Female external genitalia

Dorsal view of female external genitalia: lines (1+1) limiting the seventh segment with the connexivum are regular (Fig. 5A). Posterior portions (1 + 1) of the seventh segment at the limit with the eighth segment and connecting end in rounded ends (Fig. 5A). Connexiva (1+1) of the seventh segment ends in a pointed tip (Fig. 5A). The eighth segment shows a trapezoidal shape with rounded edges (Fig. 5A). The ninth segment is wavy and the side portions (1 + 1) form raised flaps (Fig. 5A). The posterior portions (1 + 1) of the ninth segment have the shape of rounded tips that take the approximate shape of the letter W (Fig. 5A).

Posterior view of female external genitalia: the central part of the region that divides the eighth and ninth segments is straight; the junction of the ninth segment IX with the central portion is convex. Being elevated, the lateral portions (1 + 1) form depressions in the antero posterior direction (Fig. 5B). The boundaries between the ninth and tenth segments are opened on the sides and closed in the central area (Fig. 5B). The tenth segment is semicircular (Fig. 5B). Gonocoxites 8 are penniform, while gonapophyses 8 are almost triangular (Fig. 5B).

Ventral view of female external genitalia: the limit of the seventh segment with gonocoxites 8 and gonapophyses 8 is concave on the sides (1 + 1) and convex in the central portion (Fig. 5C). Posterior portions of the seventh segment connective end in rounded ends (Fig. 5C). From this point of view, gonocoxites 8 and gonapophyses 8 (1 + 1) are triangular (Fig. 5C).

3.4. Measurement data

The measurement data of the studied characters were made available in a table, the characters were: total body length, head length, internal distance between the eyes, post-ocular head width, pronotum, and abdomen (Table 2).

3.5. Distribution

Based on the article by Panzera et al. [17] which indicates that *T. sordida sensu stricto* and *T. sordida* La Paz were not notified in Argentina, a distribution map was developed from the notifications of *T. rosai* sp. nov. (pointed out in the articles as *T. sordida* from Argentina or *T. sordida* Argentina [8,17-20,40,41]) in 12 Argentina provinces: Misiones, Corrientes,

Santa Fe, Formosa, Chaco, Buenos Aires, Córdoba, Jujuy, Salta, Santiago del Estero, Tucumán and La Rioja (Figure 10).

3.6. Observation

The possible existence of this new species was first noted by Panzera et al. [18] and later mentioned by Dujardin et al. [40], Calderón-Fernández and Juárez [19], Panzera et al. [17] and Nattero et al. [20].

3.7. Etymology

This species is dedicated to Prof. Dr. João Aristeu da Rosa [Full professor of the School of Pharmaceutical Sciences of São Paulo State University (FCFAR/UNESP), Araraquara, São Paulo, Brazil], one of the world's top authority on triatomine morphology, who has contributed for more than 30 years with taxonomic and systematic studies of these vectors.

3.8. Phylogenetic reconstruction and genetic distances

Phylogenetic analyses recovered *T. rosai* sp. nov. as an independent lineage of *T. sordida sensu stricto* and *T. sordida* La Paz, as well as *T. garciabesi* and *T. guasayana*, and related it as a sister taxon to *T. sordida* (Figure 11). Pairwise Kimura 2-parameter genetic distances for cyt b gene revealed that *T. rosai* sp. nov. diverges at least 8.5% from the lineages of *T. sordida sensu stricto* (Table 3).

3.9. Experimental crosses

The crosses between *T. rosai* sp. nov. and *T. sordida sensu stricto* resulted in hybrids (absence of pre-zygotic barrier) (Table 4). However, hybrids showed a high mortality rate when compared to parental crosses (post-zygotic barrier by hybrid inviability) (Table 4).

3.10. Taxonomic notes

Triatoma sordida (Stål, 1859) (Figures 1C, D; 2C, D; 3B, D; 4B, D, F; 5B, D, F; 6C, D; 7D-F; 8C, D; 9D-F; 12 A, B).

Conorhinus sordidus Stål, 1859,

Triatoma sordida Chagas, 1912

Eutriatoma sordida Pinto, 1931

Triatoma sordida Lent and Wygodzinsky 1979

3.10.1. List of synonymous: *Conorhinus sordidus* Stål, 1859 and *Eutriatoma sordida* Pinto, 1931 [11].

3.10.2. Distribution: Brazil: Acre, Bahia, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo and Tocantins. Distribution outside Brazil: Bolívia, Paraguay and Uruguay [11,44].

3.10.3. Type material: deposited at the Zoologisches Museum, Berlin, Germany [45] (Figure 12).

3.10.4. Comments: all aspects used in this description of *T. rosai* sp. nov. were compared with the type specimen and with a population from the same state.

3.11. Literature data

3.11.1. Genetics differences

Cytogenetics differences

The cytogenetic characterization of *T. rosai* sp. nov. was carried out by Panzera et al. [17,18] and Bardella et al. [46] (termed as *T. sordida* Argentina) and demonstrated great differences when compared to *T. sordida sensu stricto*: *T. rosai* sp. nov. [absence of heterochromatin and CMA3/DAPI bands in autosomes, chromocenter formed only by sex chromosomes, Y sex chromosome is DAPI+ with CMA3+ dots, and 45S rDNA clusters were observed in both sex chromosomes (X and Y)] and *T. sordida sensu stricto* [presence of heterochromatic blocks on a chromosomal end (8 to 10 autosomes), all bivalents showed CMA+/DAPI+ regions co-localized, chromocenter formed by sex chromosomes and autosomes, Y sex chromosome DAPI+ and negative for CMA3, and 45S rDNA clusters were observed in X sex chromosome].

Electrophoresis pattern

The electrophoretic profile of *T. rosai* sp. nov. (termed as *T. sordida* Argentina) was characterized by Panzera et al. [18]. The authors noted that of the 14 enzyme systems studied, three diagnostic loci evaluated among *T. rosai* sp. nov. and *T. sordida sensu stricto* showed no common alleles [GPI (11), PEP-1 (11), PEP-2 (11), and GPI (33), PEP-1 (22), PEP-2 (22), respectively].

Molecular analyses

Garcia et al. [47], using mtDNA fragments of 12S and 16S ribosomal RNA genes observed, for the first time, phylogenetic divergences between *T. sordida* from Brazil and *T. rosai* sp. nov. (termed as *T. sordida* from Argentina) since the specimens from Argentina were closer to *T. matogrossensis* Leite and Barbosa, 1953 than to *T. sordida* from Brazil. Posteriorly, the phylogenetic analyses performed by Panzera et al. [17] with the mitochondrial gene COI demonstrated that *T. rosai* sp. nov. (termed as *T. sordida* Argentina) constituted a monophyletic clade with 88% bootstrap. The authors also observed a genetic distance between *T. rosai* sp. nov. and *T. sordida sensu stricto* of 5.3%. Belintani et al. [48] performed a phylogenetic study combining COI, cyt b, 16S, 18S and 28S genes and observed that *T. sordida* populations were separated into two well-defined strains: *T. sordida* (Bolivia and Brazil) and *T. rosai* sp. nov. (termed as *T. sordida* Argentina). This division is corroborated by phylogenetic reconstruction, species delimitations based on Poisson Tree Process (PTP), and values of genetic distances. Finally, Madeira et al. [49], through phylogenetic analyzes with cyt b and ND1 genes, clearly demonstrated the difference between *T. rosai* sp. nov. (termed as *T. sordida* from Argentina) and *T. sordida sensu stricto* from different locations in Brazil (Bahia: Gentio de Ouro, Macaúbas, Seabra, and Tanhaçu; Goiás: Posse; Minas Gerais: Brasília de Minas, Catuti, Monte Azul, Porteirinha, and Riacho dos Machados; Mato Grosso do Sul: Corumbá and Pantanal).

3.11.2. Morphological differences

Cuticular hydrocarbons pattern

The cuticular hydrocarbons analyses of *T. rosai* sp. nov. (termed as *T. sordida* of Argentina) and *T. sordida sensu stricto* performed by Calderón-Fernández and Juárez [19] comprised that both species showed significantly different hydrocarbon profiles.

Geometric morphometry

Morphometric analyses of the head, wings, and thorax performed in *T. rosai* sp. nov. (termed as *T. sordida* Argentina) and *T. sordida sensu stricto* by Nattero et al. [20] demonstrated divergences between all measured characters. Neighbor-joining trees derived from Mahalanobis distances from head and wing measurements clearly differentiated *T. rosai* sp. nov. and *T. sordida sensu stricto* [20].

3.11.3 Life cycle and average time of development

According to Oscherov et al. [50], *T. rosai* sp. nov. (termed as *T. sordida* from Argentina) has an average development time of all nymph stages of approximately 303 days, while *T. sordida sensu stricto* has an average time of nymph development of approximately 170 days [51]. Oscherov et al. [50] also reported that the life cycle of *T. rosai* sp. nov. is completed in about 10 months, unlike *T. sordida sensu stricto* that completes its cycle in just five months [52].

Geographic distribution

According to Panzera et al. [17], *T. rosai* sp. nov. (termed as *T. sordida* Argentina) is present in Argentina, Bolivia and Paraguay, and *T. sordida sensu stricto* is present in Brazil, Bolivia and Paraguay. Although species may overlap in Bolivia and Paraguay, there are no reports of *T. rosai* sp. nov. in Brazil, as well as *T. sordida sensu stricto* in Argentina (the papers already published with *T. sordida* coming from Argentina were performed with *T. rosai* sp. nov. [9,17-20,40,41,46-49,50,53-75])

4. Discussion

Triatoma rosai sp. nov., in conjunction with *T. garciabesi*, *T. jurbergi* Carcavallo, Galvão, and Lent, 1998, *T. matogrossensis*, *T. sordida*, and *T. vanda* Carcavallo, Jurberg, Rocha, Galvão, Noireau, and Lent, 2002 constitute the monophyletic *T. sordida* subcomplex [48,76]. Several authors, based mainly on morphological data and geographic distribution, considered *T. sordida* subcomplex as a group formed by four species (*T. garciabesi*, *T. guasayana*; *T. patagonica* Del Ponte, 1929, and *T. sordida*) [40,77,78]. Genetic studies (cytogenetics and phylogenetics) have shown that, in fact, *T. guasayana* and *T. patagonica* have an evolutionary relationship with the *T. rubrovaria* subcomplex [48,76].

In addition to *T. rosai* sp. nov., there are 16 species reported in Argentina: *P. coreodes* Bergroth, 1911, *P. geniculatus* (Latreille, 1811), *P. guentheri* Berg, 1879, *P. megistus*, *P. rufotuberculatus* (Champion, 1899), *T. breyeri* Del Ponte, 1929, *T. delpontei* Romaña and Abalos, 1947, *T. eratyrusiformis* Del Ponte, 1929, *T. garciabesi*, *T. guasayana*, *T. infestans* (Klug, 1834), *T. limai* Del Ponte, 1929, *T. patagonica*, *T. platensis* Neiva, 1913, *T. rubrofasciata* (De Geer, 1773) and *T. rubrovaria* (Blanchard, 1843) [41]. Taking into account that *T. garciabesi* shows great morphological similarity with *T. sordida* (which even led to a synonymization event) [8,9,17], the difficulty of morphological differentiation of *T. guasayana* and *T. sordida* (especially in the nymphal stages) and the fact that the geographic distribution of both species overlaps in northern Argentina [17], we included these taxa in our phylogenetic studies and confirmed that *T. rosai* sp. nov. is a distinct species.

Several phylogenetic studies showed that *T. rosai* sp. nov. (termed as *T. sordida* Argentina) differs from *T. sordida* (*T. sordida sensu stricto* and *T. sordida* La Paz) [17,47-49]. Our results based on integrative taxonomy confirmed that the initial divergences reported as “intraspecific variation” [17-20] actually represent interspecific differences, being *T. rosai* sp. nov. an independent strain of *T. sordida*. The last two species of *Triatoma* described (*T. mopan* Dorn et al., 2018 and *T. huehuetenanguensis* Lima-Cordón et al., 2019) were also based on integrative taxonomy, which provides greater reliability of the specific status of this new taxa [79,80].

Among the different tools that can support the integrative taxonomy, the performance of experimental crossings and the analyses of pre- and post-zygotic interspecific reproductive barriers are of great importance to assess the specific status of taxa (based on the biological concept of species) [36, 37]. The characterization of pre-zygotic barriers that prevent the formation of hybrids is important from a taxonomic point of view since they demonstrate that the species are genetically isolated (with no interspecific gene flow) [36]. However, the high mortality rate observed among hybrids resulting from crosses between *T. rosai* sp. nov. and *T. sordida sensu stricto* demonstrates in turn that, in addition to the physical barriers that possibly prevent the meeting of these insects in nature (because they live in different countries in South America [17]), there are evolutionary events that lead to a low adaptive value of hybrids. There are several examples of triatomine species that do not have pre-zygotic reproductive barriers, but that had the specific status supported by the post-zygotic barriers (inviability, sterility, or hybrid breakdown) that make hybrids unfeasible [39,81-88].

Triatoma rosai sp. nov. (referred in the article as *T. sordida* Argentina) is a wild species, k strategist, present between dry and fallen trunks, tree holes, bromeliads, palm trees,

in opossum (*Didelphis* spp.) houses and in dry cacti, which was found naturally infected with *T. cruzi* and is considered responsible for the parasite's wild cycle (mainly associated with bird nests). This species has also been reported in rural peridomestic (such as goat corrals), as well as in domiciliary areas (houses, in general, which were 300 to 2700 meters away from pigeon nests) [54,57,59,63,64,67,69,70].

A survey carried out on palm trees in the province of Corrientes, Argentina showed that *T. rosai* sp. nov. (termed as *T. sordida* Argentina) has a high rate of infection with *T. cruzi*, since 38.5% of the specimens analyzed were infected – it is believed that prawns and rodents are the reservoirs of the parasite in palm trees [59]. Maffey et al. [72] also suggest that *T. rosai* sp. nov. probably is the vector of *T. cruzi* genotype I (TcI) among opossums and can act as a secondary vector of the TcVI and TcV genotypes in domestic and peridomestic cycles. These data are of great epidemiological importance since the infection rate of *T. rosai* sp. nov. is extremely high when compared to *T. sordida sensu stricto* (rates ranging from 0.5% to 16.2% [89-92]) and highlights the importance of epidemiological surveillance of this species in Argentina, where has about two to three million people infected (of which approximately 800,000 are chronic heart patients), being 20 million inhabitants living at risk and, above all, nine out of ten new Chagas' disease cases occurring in children in the country [93].

5. Conclusions

Based on the above, we describe *T. rosai* sp. nov., highlight the importance of integrative taxonomy for the description of new species of triatomines and, above all, demonstrate the need for the attention of vector control programs in Argentina for this new species of Chagas disease vector.

Author Contributions: Conceptualization, K.C.C.A., J.O., C.G., F.F.M. and M.T.V.A.O.; methodology, K.C.C.A., J.O., A.C.C.G., D.C.C., L.M.G.D., I.F.B., Y.V.R., A.R., A.B.B.O. and F.F.M.; formal analysis, K.C.C.A., J.O., A.C.C.G., D.C.C., L.M.G.D., I.F.B., Y.V.R., A.R., A.B.B.O. and F.F.M.; investigation, K.C.C.A., J.O., A.C.C.G., D.C.C., L.M.G.D., I.F.B., Y.V.R., A.R., A.B.B.O., F.F.M., C.G., and M.T.V.A.O.; resources, K.C.C.A., J.O., C.G. and M.T.V.A.O.; writing—original draft preparation, K.C.C.A., A.C.C.G., J.O. and F.F.M.; writing—review and editing, K.C.C.A., J.O., A.C.C.G., D.C.C., L.M.G.D., I.F.B., Y.V.R., A.R., A.B.B.O., F.F.M., C.G., and M.T.V.A.O.; supervision, K.C.C.A. and

M.T.V.A.O.; project administration, K.C.C.A. and M.T.V.A.O.; funding acquisition, K.C.C.A., C.G. and M.T.V.A.O. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Process number 2017/05015-7, 2018/12039-2, 2018/24116-1 and 2020/07917-0), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

Acknowledgments: We are very grateful to Dr. Jürgen Deckert (Museum für Naturkunde, Berlin, Germany) for the photos and information provided about the *T. sordida* holotype deposited in your institution. Besides that, we also thank Genivaldo de Oliveira Navarro and Milton Cesar for all the field support in Riacho dos Machados, Minas Gerais, Brazil.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Rodriguez, J.B.; Falcone, B.N.; Szajnman, S.H. Detection and treatment of *Trypanosoma cruzi*: A patent review (2011–2015). *Expert. Opin. Ther. Pat.* **2016**, *26*, 993–1015, <https://doi.org/10.1080/13543776.2016.1209487>.
2. Pérez-Molina, J.A.; Molina, I. Chagas disease. *Lancet*. **2018**, *391*, 82–94. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31612-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31612-4).
3. World Health Organization. Available online: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)) (accessed on 18 September 2020).
4. Pan American Health Organization. Available online: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=13566&Itemid=40721&lang=pt (accessed on 18 September 2020).
5. Dias, J.C.P.; Ramos Jr, A.N.; Gontijo, E.D.; Luquetti, A.; Shikanai-Yasuda, M.A.; Coura, J.R.; Torres, R.M.; Melo, J.R.C.; Almeida, E.A.; Oliveira Jr, W.; Silveira, A.C.; Rezende, J.M.; Pinto, F.S.; Ferreira, A.W.; Rassi, A.; Fragata Filho, A.A.; Sousa, A.S.; Correia, D.; Jansen, A.M.; Andrade, G.M.Q.; Britto, C.F.D.P.C.; Pinto, A.Y.N.; Rassi Jr, A.; Campos, D.E.; Abad-Franch, F.; Santos, S.E.; Chiari, E.; Hasslocher-Moreno, A.M.; Moreira, E.F.; Marques, D.S.O.; Silva, E.L.; Marin-Neto, J.A.; Galvão, L.M.C.; Xavier, S.S.; Valente, S.A.S.; Carvalho, N.B.; Cardoso, A.V.; Silva, R.A.; Costa, V.M.; Vivaldini, S.M.;

- Oliveira, S.M.; Valente, V.C.; Lima, M.M.; Alves, R.V. 2nd Brazilian consensus on Chagas disease. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2016**, *49*, 3–60. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0505-2016>.
6. Galvão C. Taxonomia dos Vetores da Doença de Chagas da Forma à Molécula, quase três séculos de história. In *Atualidades em Medicina Tropical no Brasil: Vetores*; Oliveira, J., Alevi, K.C.C., Camargo, L.M.A., Meneguetti, D.U.O., Eds.; Stricto Sensu: Rio Branco, Brazil, 2020; pp. 9-37. <https://doi.org/10.35170/ss.ed.9786586283129>.
 7. Chagas, C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1909**, *1*, 159–218. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761909000200008>.
 8. Lent, H.; Wygodzinsky, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera – Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* **1979**, *163*, 123–520. <http://hdl.handle.net/2246/1282> (accessed on 18 September 2020).
 9. Gurgel-Gonçalves, R.; Ferreira, J.B.C.; Rosa, A.F.; Bar, M.E.; Galvão, C. Geometric morphometrics and ecological niche modelling for delimitation of near-sibling triatomine species. *Med. Vet. Entomol.* **2011**, *25*, 84–93. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2010.00920.x>.
 10. Gurgel-Gonçalves, R.; Galvão, C.; Costa, J.; Peterson, A.T. Geographic distribution of Chagas disease vectors in Brazil based on ecological niche modeling. *J. Trop. Med.* **2012**, *2012*, 1-15. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/705326>.
 11. Galvão, C. *Vetores da doença de Chagas no Brasil*; Sociedade Brasileira de Zoologia: Curitiba, Brazil, 2014; pp. 165. <https://doi.org/10.7476/9788598203096>.
 12. Abalos, J.W.; Wygodzinsky, P. Las Triatominae Argentinas (Reduviidae, Hemiptera). *Publ. Inst. Med. Reg. Universidad Nacional* **1951**, *601*, 1–179. https://peerj.com/preprints/3006v1/Article_S1.pdf (accessed on 18 September 2020).
 13. Actis, A.S.; Traversa, O.C.; Carcavallo, R.U. Estudios taxonómicos sobre el genero *Triatoma* Laporte mediante la electrophoresis de la linfa. *An. Esc. Nac. Cienc. Biol.* **1964**, *3*, 97-106.
 14. Carcavallo, R.U.; Cichero, J.A.; Martínez, A.; Prosen, A.F.; Ronderos, R. Una nueva especie del género *Triatoma* Laporte (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Segundas Jornadas Entomo-epidemiológicas Argentinas* **1967**, *2*, 43-48.
 15. Jurberg, J.; Galvão, C.; Lent, H.; Monteiro, F.; Lopes, M.C.; Panzera, F.; Pérez, R. Revalidação de *Triatoma garciabesi* Carcavallo, Cichero, Martínez, Prozen & Ronderos, 1967 (Hemiptera, Reduviidae). *Entomol. vectores* **1998**, *5*, 107-122. [http://refhub.elsevier.com/S0001-706X\(20\)30147-9/sbref0029](http://refhub.elsevier.com/S0001-706X(20)30147-9/sbref0029) (accessed on 18 September 2020).
 16. Noireau, F.; Gutierrez, T.; Zegarra, M.; Flores, R.; Brenière, F.; Cardozo, L. Cryptic speciation in *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) from the Bolivian Chaco. *Trop. Med. Int. Health* **1998**, *3*, 364–372. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.1998.00219.x>.

17. Panzera, F.; Pita, S.; Nattero, J.; Panzera, Y.; Galvão, C.; Chavez, T. Cryptic speciation in the *Triatoma sordida* subcomplex (Hemiptera, Reduviidae) revealed by chromosomal markers. *Parasit. Vectors* **2015**, *8*, 495–504. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1109-6>.
18. Panzera, F.; Hornos, S.; Pereira, J.; Cestau, R.; Canale, D.; Diotaiuti, L.; Dujardin, J.P.; Perez, R. Genetic variability and geographic differentiation among three species of triatomine bugs (Hemiptera-Reduviidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1997**, *57*, 732–739. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1997.57.732>.
19. Calderón-Fernández, G.M.; Juárez, M.P. The cuticular hydrocarbons of the *Triatoma sordida* species subcomplex (Hemiptera: Reduviidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2013**, *108*, 778–784. <http://dx.doi.org/10.1590/0074-0276108062013015>.
20. Nattero, J.; Piccinali, R.M.; Lopes, C.M.; Hernandez, M.L.; Abrahan, L.; Lobbia, P.A.; Rodríguez, C.S.; Carbajal-de-la-Fuente, N.A. Morphometric variability among the species of the Sordida subcomplex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae): evidence for differentiation across the distribution range of *Triatoma sordida*. *Parasit. Vectors* **2017**, *10*, 412. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2350-y>.
21. Rosa, J.A.; Rocha, C.S.; Gardim, S.; Pinto, M.C.; Mendonça, V.J.; Ferreira-Filho, J.C.R.; Carvalho, E.O.C.; Camargo, L.M.A.; Oliveira, J.; Nascimento, J.D.; Cilense, M.; Almeida, C.E. Description of *Rhodnius montenegrensis* n. sp. (Hemiptera, Reduviidae: Triatominae) from the state of Rondônia, Brazil. *Zootaxa* **2012**, *3478*, 62–76. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3478.1.8>.
22. Monteiro, F.A.; Perez, R.; Panzera, F.; Dujardin, J.P.; Galvão, C.; Rocha, D.; Noireau, F.; Schofield, C.J.; Beard, C.B. Mitochondrial DNA variation of *Triatoma infestans* populations and its implication on the specific status of *T. melanosoma*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1999**, *94*, 229–238. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761999000700037>.
23. Tartarotti, E.; Ceron, C.R. Ribosomal DNA ITS-1 intergenic spacer polymorphism in triatomines (Triatominae, Heteroptera). *Biochem. Genet.* **2005**, *43*, 365–373. <https://doi.org/10.1007/s10528-005-6776-0>.
24. Hall, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **1999**, *41*, 95–98. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-14998u1.29.
25. Thompson, J.; Higgins, D.; Gibson, T. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 4673–4680. <https://dx.doi.org/10.1093%2Fnar%2F22.22.4673>.
26. Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipski, A.; Kumar, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **2013**, *30*, 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>.
27. Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Knyaz, C.; Tamura, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* **2018**, *35*, 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.

28. Edgar, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **2004**, 32, 1792-1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>.
29. Gouy, M.; Guindon, S.; Gascuel, O. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building, *Mol. Biol. Evol.* **2010**, 27, 221-224. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp259>.
30. Maddison, W.P.; Maddison, D.R. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.61. 2019. Available online: <http://www.mesquiteproject.org>. (accessed on 20 July 2020).
31. Darriba, D.; Taboada, G.L.; Doallo, R.; Posada, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods* **2012**, 9, 772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>.
32. Ronquist, F.; Teslenko, M.; Van Der Mark, P.; Ayres, D.L.; Darling, A.; Höhna, S.; Larget, B.; Liu, L.; Suchard, M.A.; Huelsenbeck, J.P. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.* **2012**, 61, 539-542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>.
33. Felsenstein, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **1985**, 39, 783-791. <https://www.jstor.org/stable/2408678> (accessed on 18 September 2020).
34. Rambaut, A. *FigTree – Tree Figure Drawing Tool Version v.1.4.3*; Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh: Edinburgh, 2016. Available online: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> (accessed on 18 September 2020).
35. Rambaut, A.; Drummond, A.J.; Xie, D.; Baele, G.; Suchard, M.A. Posterior summarisation in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Syst. Biol.* **2018**, 67, 901-904. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syy032>.
36. Mayr, E. *Animal Species and Evolution*; Harvard University Press: Cambridge, UK, 1963.
37. Dobzhansky, T. *Genetics of the Evolutionary Process*; Columbia University Press: New York, NY, USA, 1970.
38. Costa, J.; Almeida, C.E.; Dujardin, J.P.; Beard, C.B. Crossing Experiments Detect Genetic Incompatibility among Populations of *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Heteroptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2003**, 98, 637–639. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762003000500009>.
39. 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. Revalidation of *Triatoma bahiensis* Sherlock & Serafim, 1967 (Hemiptera: Reduviidae) and phylogeny of the *T. brasiliensis* species complex. *Zootaxa* **2016**, 4107, 239–254. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4107.2.6>.
40. Dujardin, J.P.; Schofield, C.J.; Panzera, F. *Los vectores de la enfermedad de Chagas*. Académie Royale des Sciences D’Outre-Mer: Bruxelles, Belgium, 2002, 189 p.

41. Galvão, C.; Carcavallo, R.U.; Rocha, D.S.; Jurberg, J. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa* **2003**, 202, 1–36. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.202.1.1>.
42. QGIS Geographic Information System. Available online: <http://qgis.org>. (accessed on 19 September 2020).
43. Instituto Geográfico Nacional. Available online: <https://www.ign.gob.ar/NuestrasActividades/InformacionGeoespacial/CapasSIG> (accessed on 19 September 2020).
44. Ramos, L.J.; Souza, J.L.; Souza, C.R.; Oliveira, J.; Rosa, J.A.; Camargo, L.M.A.; Cunha, R.M.; Meneguetti, D.U.O. First report of *Triatoma sordida* Stål, 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) in the State of Acre and Brazilian Western Amazon. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2018**, 51, 77–79. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0161-2017>.
45. Rodrigues, J.M.S.; Moreira, F.F.F.; Deckert, J.; Galvão, C. List of the type specimens of Triatominae (Hemiptera: Heteroptera: Reduviidae) in the Hemimetabola Collection of the Museum für Naturkunde, Berlin. *Zootaxa* **2020**, 4809, 329–348. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4809.2.5>.
46. Bardella, V.B.; Pita, S.; Vanzela, A.L.L.; Galvão, C.; Panzera, F. Heterochromatin base pair composition and diversification in holocentric chromosomes of kissing bugs (Hemiptera, Reduviidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2016**, 111, 614–662. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160044>.
47. García, B.A.; Moriyama, E.N.; Powell, J.R. Mitochondrial DNA sequences of triatomines (Hemiptera: Reduviidae): phylogenetic relationships. *J. Med. Entomol.* **2001**, 38, 675–683. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-38.5.675>.
48. Belintani, T.; Oliveira, J.; Pinotti, H.; Silva, L.A.; Alevi, K.C.C.; Galvão, C.; Rosa, J.A. Phylogenetic and phenotypic relationships of the *Triatoma sordida* subcomplex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Acta Trop.* **2020**, 212, 105679. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105679>.
49. Madeira, F.F.; Delgado, L.M.G.; Bittinelli, I.F.; Sartori, R.Q.; Oliveira, J.; Rosa, J.A.; Azeredo-Oliveira, M.T.V.; Alevi, K.C.C. Revisiting the genetic variability of the Brazilian peridomestic populations of the Chagas disease vector *Triatoma sordida* (Stål, 1859) (Hemiptera, Triatominae). *Infect. Genet. Evol.* **2020**, 85, 104568. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104568>.
50. Oscherov, E.B.; Damborsky, M.P.; Bar, M.E. Características biológicas de *Triatoma sordida* (Heteroptera, Reduviidae): Ciclo de vida. *Rev. Soc. Entomol. Argent.* **1998**, 57, 13–17. <https://www.biotaxa.org/RSEA/article/download/33689/29858> (accessed on 18 September 2020).
51. Souza, J.M.P.; Rodrigues, V.L.C.C.; Rocha & Silva, E.O. *Triatoma sordida*: considerações sobre o tempo de vida das formas adultas e sobre a oviposição das fêmeas. *Rev. Saúde Públ.* **1978**, 12, 291–296. <https://doi.org/10.1590/S0034-89101978000300004>.

-
52. Pinto, C.F. Fatos curiosos sobre a biologia do *Triatoma sordida* (Nota prévia). *Rev. Soc. Bras. Med.* **1949**, 6, 305.
53. Schofield, C.J.; Lehane, M.J.; McEwan, P.; Catala, S.S.; Gorla, D.E. Dispersive flight by *Triatoma sordida*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1991**, 85, 676-678. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(91\)90392-C](https://doi.org/10.1016/0035-9203(91)90392-C).
54. Bar, M.E.; Oscherov, E.B.; Damborsky, M.P.; Varela, M.E.; Mizdraji, G.; Porcel, E. Triatomismo del Departamento San Luis del Palmar de la Provincia de Corrientes, Argentina. *Medicina (B. Aires)* **1992**, 52, 193-201.
55. Bar, M.E.; Oscherov, E.B.; Damborsky, M.P. Presencia de *Triatoma sordida* Stål, 1859 en ecótopos urbanos de la ciudad de Corrientes, Argentina. *Rev. Saúde Públ.* **1993**, 27, 117-122. <https://doi.org/10.1590/S0034-89101993000200007>.
56. Bar, M.E.; Oscherov, E.B.; Damborsky, M.P.; Porcel, E.A.; Alvarez, B.M. Population interactions between *Triatoma infestans* and *Triatoma sordida*. *Rev. Saúde Públ.* **1994**, 28, 59-68. <https://doi.org/10.1590/S0034-89101994000100007>.
57. Bar, M.E.; Oscherov, E.B.; Avalos, G.; Damborsky, M.P.; Alvarez, B.M. Infección natural de *Triatoma sordida* por *Trypanosoma cruzi* en ecótopos silvestres de la provincia de Corrientes, Argentina. In *Resúmenes*, 5ta. Jornada de Biología, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción: Asunción, Paraguay, 1996, p. 32-33.
58. Bar, M.E.; Damborsky, M.P.; Oscherov, E.B.; Alvarez, B.M.; Mizdraji, G.; Avalos, G. Infestación domiciliaria por triatomíneos y seroprevalencia humana en el Departamento Empedrado, Corrientes, Argentina. *C. Saúde Pública* **1997**, 13, 305-312. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X1997000200020>.
59. Bar, M.E.; Wisniewsky-Colli, C. *Triatoma sordida* Stål 1859 (Hemiptera, Reduviidae: Triatominae) in palms of northeastern Argentina. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2001**, 96, 895-899. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762001000700002>.
60. Bar, M.E. Estructura y dinámica poblacional de *Triatoma sordida* Stål 1859 en una comunidad de *Butia yatay* en Argentina. *Bol. Malariol. Salud Ambient.* **2006**, 46, 21-30. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1690-46482006000100003&lng=es&nrm=iso (accessed on 18 September 2020).
61. Gorla, D.E.; Jurberg, J.; Catala, S.S.; Schofield, C.J. Systematics of *Triatoma sordida*, *T. guasayana* and *T. patagonica* (Hemiptera, Reduviidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1993**, 88, 379-385. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761993000300006>.
62. McEwen, P.K.; Lehane, M.J. Factors influencing flight initiation in the triatomine bug *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae). *Insect Sci. Appl.* **1993**, 14, 461-464. <https://doi.org/10.1017/S1742758400014132>.
63. Wisnivesky-Colli, C.; Gürtler, R.E.; Solarz, N.D.; Schweigmann, N.J.; Silvia, M.; Pietrokovsky, S.M.; Alberti, A.; Flo, J. Dispersive flight and house invasion by *Triatoma guasayana* and *Triatoma sordida* in Argentina. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1993**, 88, 27-32. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761993000100006>.

-
64. Wisnivesky-Colli, C.; [Pietrokovsky, S.](#); Bottazzi, V.; Haedo, A.; Solarz, N.; Schweigmann, N.; [Canale, D.](#); [Reyes, O.R.](#) Laboratory comparison of feeding success among *Triatoma infestans*, *T. guasayana*, and *T. sordida* (Hemiptera: Reduviidae). *J. Med. Entomol.* **1995**, 32, 583–587. <https://doi.org/10.1093/jmedent/32.5.583>.
65. Crocco, L.B.; Catalá, S.S. Feeding and defaecation patterns in *Triatoma sordida*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1996**, 91, 409–413. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761996000400004>.
66. Crocco, L.; Catalá, S. Host preferences of *Triatoma sordida*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **1997**, 91, 927–930. <https://doi.org/10.1080/00034983.1997.11813220>.
67. Oscherov, E.B.; Damborsky, M.P.; Bar, M.E.; Porcel, E. Population statistics of *Triatoma sordida* Stål 1859 (Hemiptera: Reduviidae) in experimental conditions. *Rev. Saúde Públ.* **1996**, 30, 438–443. <https://doi.org/10.1590/S0034-89101996000500006>.
68. Oscherov, E.B.; Damborsky, M.P.; Bar, M.E.; Avalos, G.; Alvarez, B.M.; Presman, H.; Wisnivesky-Colli, C. Interactions between *Triatoma infestans* and *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) in artificial ecotopes: population growth and age structure. *J. Med. Entomol.* **2001**, 38, 214–217. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-38.2.214>.
69. Pietrokovsky, S.; Bottazzi, V.; Schweigmann, N.; Haedo, A.; Wisnivesky-Colli, C. Comparison of the blood meal size among *Triatoma infestans*, *T. guasayana* and *T. sordida* (Hemiptera: Reduviidae) of Argentina under laboratory conditions. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1996**, 91, 241–242. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761996000200022>.
70. Schweigmann, N.J.; Pietrokovsky, S.; Conti, O.; Escosteguy, M.; Bottazzi, V.; Solarz, N.; Wisnivesky-Colli, C. Infection of *Triatoma guasayana*, *Triatoma sordida* and *Triatoma infestans* by *Trypanosoma cruzi* from a naturally infected opossum. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1997**, 92, 151–152. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761997000200003>.
71. Rebagliati, P.; Papeschi, A.G.; Mola, L.M.; Pietrokovsky, S.; Gajate, P.; Bottazzi, V.; Wisnivesky-Colli, C. Comparative meiotic studies in *Triatoma sordida* (Stål) and *T. guasayana* Wygodzinsky & Abalos (Reduviidae, Heteroptera). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1998**, 93, 309–315. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761998000300007>.
72. Maffey, L.; Cardinal, M.V.; Ordonez-Krasnowski, P.C.; Lanati, L.A.; Lauricella, M.A.; Schijman, A.G.; Gürtler, R.E. Direct molecular identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in domestic and peridomestic *Triatoma infestans*, and *Triatoma sordida* from the Argentine Chaco. *Parasitology* **2012**, 139, 1570–1579. <https://doi.org/10.1017/s0031182012000856>.
73. Macchiaverna, N.P.; Gaspe, M.S.; Enriquez, G.F.; Tomassone, L.; Gürtler, R.E.; Cardinal, M.V. *Trypanosoma cruzi* infection in *Triatoma sordida* before and after community-wide residual insecticide spraying in the Argentinean Chaco. *Acta Trop.* **2015**, 143, 97–102. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.12.010>.
74. Pessoa, G.C.A.; Sousa, T.N.; Sonoda, I.V.; Diotaiuti, L. Assessing the mitochondrial DNA diversity of the chagas disease vector *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2016**, 111, 322–329. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150429>.

75. Rodríguez-Planes, L.I.; Gaspe, M.S.; Enriquez, G.F.; Gürtler, R.E. Habitat-specific occupancy and a metapopulation model of *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae), a secondary vector of Chagas disease, in northeastern Argentina. *J. Med. Entomol.* **2018**, *55*, 370–381. <https://doi.org/10.1093/jme/tjx227>.
76. Pita, S.; Lorite, P.; Nattero, J.; Galvão, C.; Alevi, K.C.C.; Teves, S.C.; Azeredo-Oliveira, M.T.V.; Panzera, F. New arrangements taxon several species subcomplexes of *Triatoma* genus based on the chromosomal position of ribosomal genes (Hemiptera - Triatominae). *Infect. Genet. Evol.* **2016**, *43*, 225–231. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.05.028>.
77. Carcavallo, R.U.; Jurberg, J.; Lent, H.; Noireau, F.; Galvão, C. Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera Reduviidae). Proposals for taxonomic arrangements, *Entomol. Vectores* **2000**, *7*, 1–99. https://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/divers12-11/010024157.pdf (accessed on 18 September 2020).
78. Schofield, C.J.; Galvão, C. Classification, evolution and species groups within the Triatominae. *Acta Trop.* **2009**, *110*, 88–100. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.01.010>.
79. Dorn, P.L.; Justi, S.A.; Dale, C.; Stevens, L.; Galvão, C.; Lima-Cordón, R.; Monroy, C. Description of *Triatoma mopan* sp. n. from a cave in Belize (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Zookeys* **2018**, *775*, 69–95. <https://doi.org/10.3897/zookeys.775.22553>.
80. Lima-Cordón, R.A.; Monroy, M.C.; Stevens, L.; Rodas, A.; Rodas, G.A.; Dorn, P.L.; Justi, A.S. Description of *Triatoma huehuetenanguensis* sp. n., a potential Chagas disease vector (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *ZooKeys* **2019**, *820*, 51–70. <https://doi.org/10.3897/zookeys.820.27258>.
81. Schreiber, G.; Pinho, A.C.; Parentoni, R.; Salgado, A.A.; Godoi Jr, T.L. Cytogenetics of Triatominae: II Spermatogenesis in hybrid between *Triatoma infestans* and *Triatoma pseudomaculata* (Hemiptera, Reduviidae). *Rev. Bras. Biol.* **1974**, *31*, 1–9. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4618618/> (accessed on 18 September 2020).
82. Pérez, R.; Hernández, M.; Quintero, O.; Scvortzoff, E.; Canale, D.; Méndez, L.; Cohanoff, C.; Martino, M.; Panzera, F. Cytogenetic analysis of experimental hybrids in species of Triatominae (Hemiptera-Reduviidae). *Genetica* **2005**, *125*, 261–270. <https://doi.org/10.1007/s10709-005-0369-z>.
83. 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. Biological and genetic aspects of crosses between phylogenetically close species of Mexican Triatomines (Hemiptera: Reduviidae). *J. Med. Entomol.* **2011**, *48*, 705–707. <https://doi.org/10.1603/me10159>.
84. Díaz, S.; Panzera, F.; Jaramillo-O, N.; Pérez, R.; Fernández, R.; Vallejo, G.; Saldaña, A.; Calzada, J.E.; Triana, O.; Gómez-Palácio, A. Genetic, Cytogenetic and Morphological Trends in the Evolution of the *Rhodnius* (Triatominae: Rhodniini) Trans-Andean Group. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e87493. <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0087493>.
85. Mendonça, V.J.; Alevi, K.C.C.; Medeiros, L.M.O.; Nascimento, J.D.; Azeredo-Oliveira, M.T.V.; Rosa, J.A. 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.* **2014**, 26, 123-131. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.05.015>.
86. Campos-Soto, R.; Panzera, F.; Pita, S.; Lages, C.; Solari, A.; Botto-Mahan, C. Experimental crosses between *Mepraia gajardoi* and *M. spinolai* and hybrid chromosome analyses reveal the occurrence of several isolation mechanisms. *Infect. Genet. Evol.* **2016**, 45, 205-212. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.09.001>.
 87. Alevi, K.C.C.; Pinotti, H.; Araújo, R.F.; Azeredo-Oliveira, M.T.V.; Rosa, J.A.; Mendonça, V.J. Hybrid collapse confirm the specific status of *Triatoma bahiensis* Sherlock and Serafim, 1967 (Hemiptera, Triatominae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2018**, 98, 475-477. <https://dx.doi.org/10.4269%2Fajtmh.17-0270>.
 88. Villacís, A.G.; Dujardin, J.P.; Panzera, F.; Yumiseva, C.A.; Pita, S.; Santillán-Guayasamín, S.; Orozco, M.I.; Mosquera, K.D.; Grijalva, M.J. Chagas vectors *Panstrongylus chinai* (Del Ponte, 1929) and *Panstrongylus howardi* (Neiva, 1911): chromatic forms or true species?. *Parasit. Vectors* **2020**, 13, 226. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04097-z>.
 89. Castro, G.B.; Machado, E.M.M.; Borges, E.C.; Lorosa, E.S.; Andrade, R.E.; Diotaiuti, L.; Azeredo, B.V.M. *Trypanosoma cruzi* Peridomiciliar Transmission by *Triatoma sordida* in the Municipality of Patis, Gerais State, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1997**, 92, 434. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761997000700007>.
 90. Lorosa, E.S.; Andrade, R.E.; Santos, S.M.; Pereira, C.A. Estudo da infecção natural e da fonte alimentar do *Triatoma sordida* (Stal, 1859), (Hemiptera - Reduviidae) na região norte de Minas Gerais, Brasil, através da reação de precipitina. *Entomol. Vectores* **1998**, 5, 13-22.
 91. Brenière, S.F.; Aliaga, C.; Waleckx, E.; Buitrago, R.; Salas, R.; Barnabé, C.; Tybayrenc, M.; Noireau, F. Genetic characterization of DTUs in wild *Triatoma infestans* from Bolivia: predominance of TcI. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2012**, 6, e1650. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001650>.
 92. Rossi, J.C.N.; Duarte, E.C.; Gurgel-Gonçalves, R. Factors associated with the occurrence of *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) in rural localities of Central-West Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2015**, 110, 192–200. <https://doi.org/10.1590/0074-02760140395>.
 93. Pickenheyn, J.; Guimarães, R.B.; Lima, S.C.; Curto, S. Processo de urbanização da Doença de Chagas na Argentina e no Brasil. *Hygeia* **2009**, 4, 58-69. <http://www.seer.ufu.br/index.php/hygeia/article/view/16920> (accessed on 18 September 2020).

Table 1. Species, geographic distribution and molecular markers used in the phylogenetic studies.

Species	Geographic distribution	COI	Cyt b	Marker		
				28S	16S	ITS-1
<i>T. sordida</i>	Seabra, Bahia, Brazil	MH029692	MH054940	MG417085	-	*
<i>T. sordida</i>	Posses, Goiás, Brazil	MH029695	*	MH059640	-	-
<i>T. sordida</i>	Monte Azul, Minas Gerais, Brazil	MH029693	MH054941	MG417086	-	-
<i>T. sordida</i>	Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brazil	MH029694	KC249292	KC249210	KC249075	-
<i>T. sordida</i>	Apolo, La Paz, Bolívia	MH029696	MH054942	MH059641	-	*
<i>T. rosai</i> sp. nov.	San Miguel, Corrientes, Argentina	MH029697	*	MG417088	-	*
<i>T. rosai</i> sp. nov.	San Miguel, Corrientes, Argentina	KC249387	KC249295	KC249213	KC249078	-
<i>T. garciabesi</i>	Rivadavia, Salta, Argentina	MH029698	MH054943	MG417089	-	-
<i>T. garciabesi</i>	Rivadavia, Salta, Argentina	KC249338	KC249249	KC249158	KC249006	-
<i>T. guasayana</i>	Santa Cruz, Bolívia	KC249343	KC249252	KC249162	KC249011	-
<i>P. megistus</i>	Nova Prata, Rio Grande do Sul, Brazil	KC249308	KC249228	KC249136	KC248970	AM949580

*Sequences obtained in this study.

Table 2. Measurement averages and significance of *T. sordida sensu stricto* and *T. rosai* sp. nov. In bold we present statistically significant measurements.

Sex	Species	Structures							
		HL	IE	PHW	PRO	SCU	THO	ABD	TL
Male	<i>T. rosai</i> sp. nov.	5,174	0,951	1,490	4,717	3,077	6,704	15,117	26,98
	<i>T. sordida</i>	4,857	0,966	1,381	4,107	2,816	6,093	14,084	25,02
	<i>T. rosai</i> sp. nov.	5,055	1,003	1,486	4,429	3,215	6,531	16,418	27,99
Female	<i>T. sordida</i>	5,208	1,066	1,510	4,221	3,214	6,459	16,167	27,81

HL: head length; IE: inner distance between eyes; PHW: postocular head width; PRO: pronotum; SCU: scutellum; THO: thorax; ABD: abdomen, TL: total body length.

Table 3. Genetic distance based on cyt b mitochondrial gene. In bold we present the Genetic distance between *T. rosai* sp. nov. and *T. sordida sensu stricto*.

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)
(1) Posse GO*									
(2) Seabra BA*	0,007								
(3) Monte Azul MG*	0,007	0,000							
(4) Pantanal MS*	0,007	0,000	0,000						
(5) <i>T. rosai</i> sp. nov.	0,085	0,087	0,087	0,087					
(6) <i>T. garciabesi</i>	0,082	0,074	0,074	0,074	0,099				
(7) <i>T. garciabesi</i>	0,082	0,074	0,074	0,074	0,097	0,000			
(8) <i>T. guasayana</i>	0,078	0,074	0,074	0,074	0,069	0,067	0,067		
(9) <i>P. megistus</i>	0,245	0,234	0,234	0,234	0,259	0,240	0,241	0,244	

* *T. sordida sensu stricto*.

Table 4. Experimental crosses performed between *T. sordida sensu stricto* and *T. rosai* sp. nov.

Experimental crosses	Number of eggs	Hatching rate	Number of nymphs	Mortality rate
Interspecific				
♀ <i>T. sordida sensu stricto</i> x <i>T. rosai</i> sp. nov. ♂	241	77%	186	80%
♀ <i>T. rosai</i> sp. nov. x <i>T. sordida sensu stricto</i> ♂	237	59%	139	73%
Intraspecific				
♀ <i>T. sordida sensu stricto</i> x <i>T. sordida sensu stricto</i> ♂	590	73%	429	20%
♀ <i>T. rosai</i> sp. nov. x <i>T. rosai</i> sp. nov. ♂	208	61%	125	17%

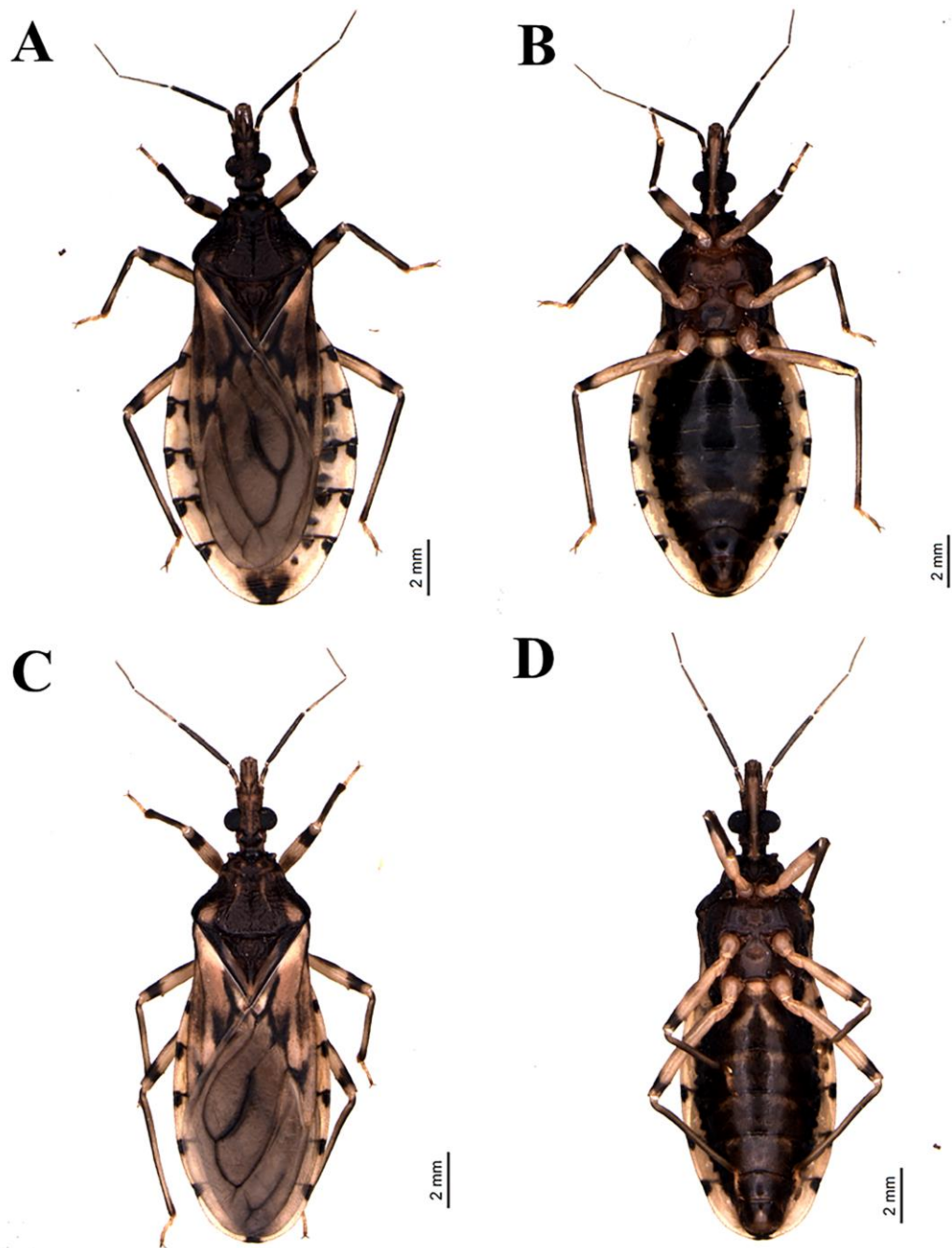


Figure 1. *Triatoma rosai* sp. nov. male (A) dorsal view, (B) ventral view, *T. sordida* male (C) dorsal view, (D) ventral view.

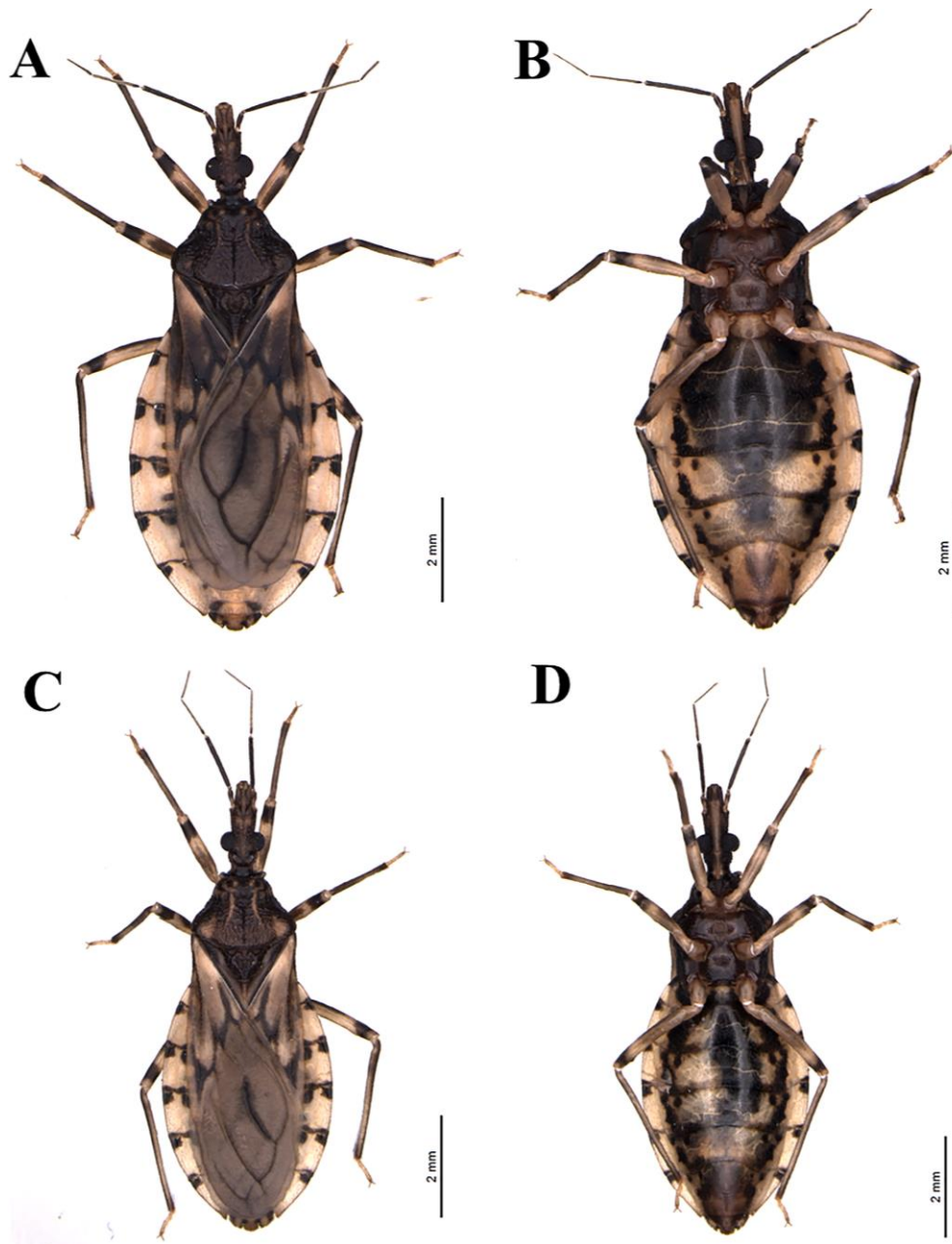


Figure 2. *Triatoma rosai* sp. nov. female (A) dorsal view, (B) ventral view, *T. sordida* female (C) dorsal view, (D) ventral view.

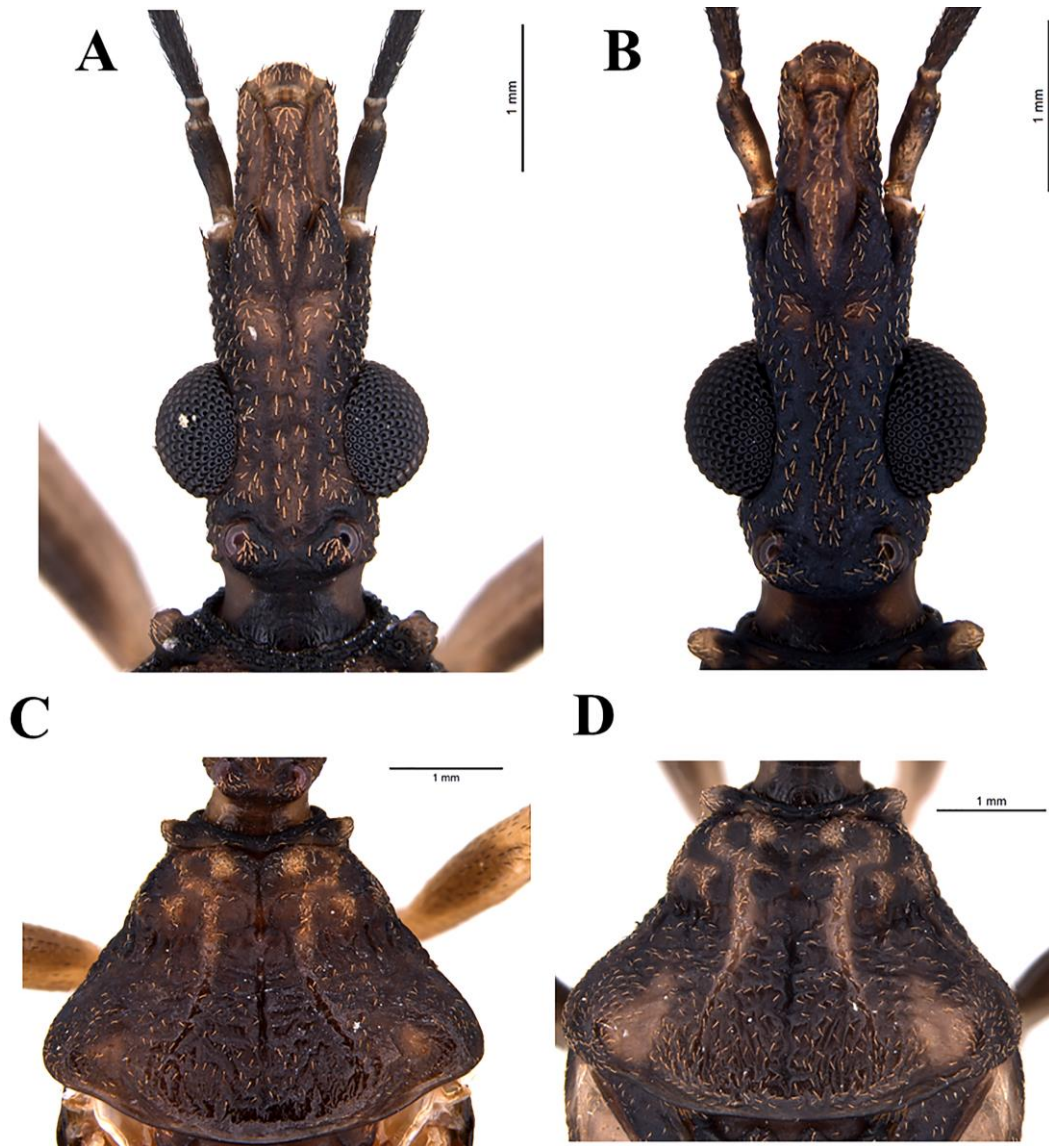


Figure 3. Detail of Head: (A) *T. rosai* sp. nov. dorsal view, (B) *T. sordida* dorsal view; Detail of Pronotum: (C) *T. rosai* sp. nov. dorsal view (D) *T. sordida* dorsal view.

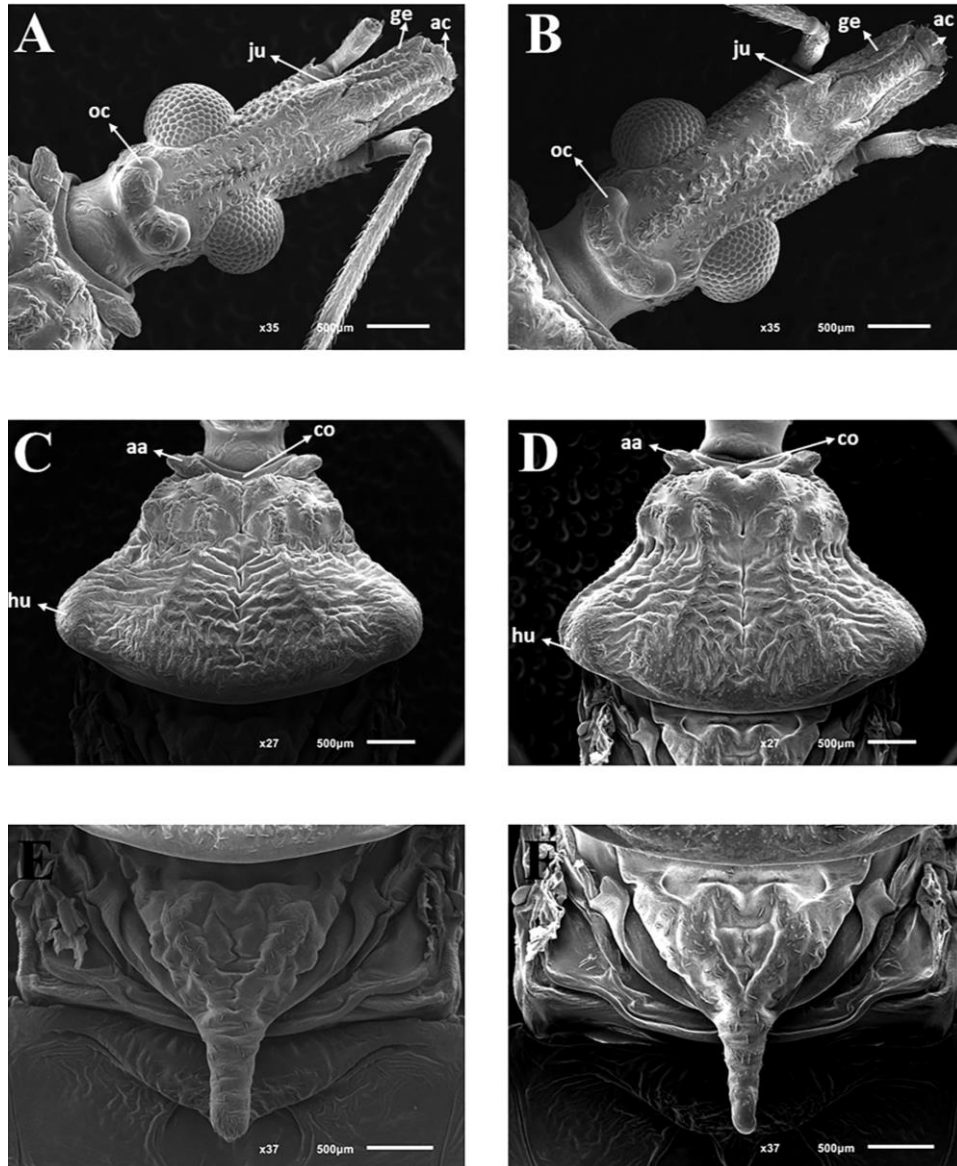


Figure 4. Detail of Head by SEM: (A) *T. rosai* sp. nov. by dorsal view, (B) *T. sordida* by dorsal view; Detail of Pronotum by SEM: (C) *T. rosai* sp. nov. dorsal view (D) *T. sordida* dorsal view; Detail of scutellum by SEM: (E) *T. rosai* sp. nov. dorsal view (F) *T. sordida* dorsal view. ac: anteclypeus; ge: gena; ju: jugum; oc: ocellus; aa: anterolateral angle; co: collar; hu: humeral angles.

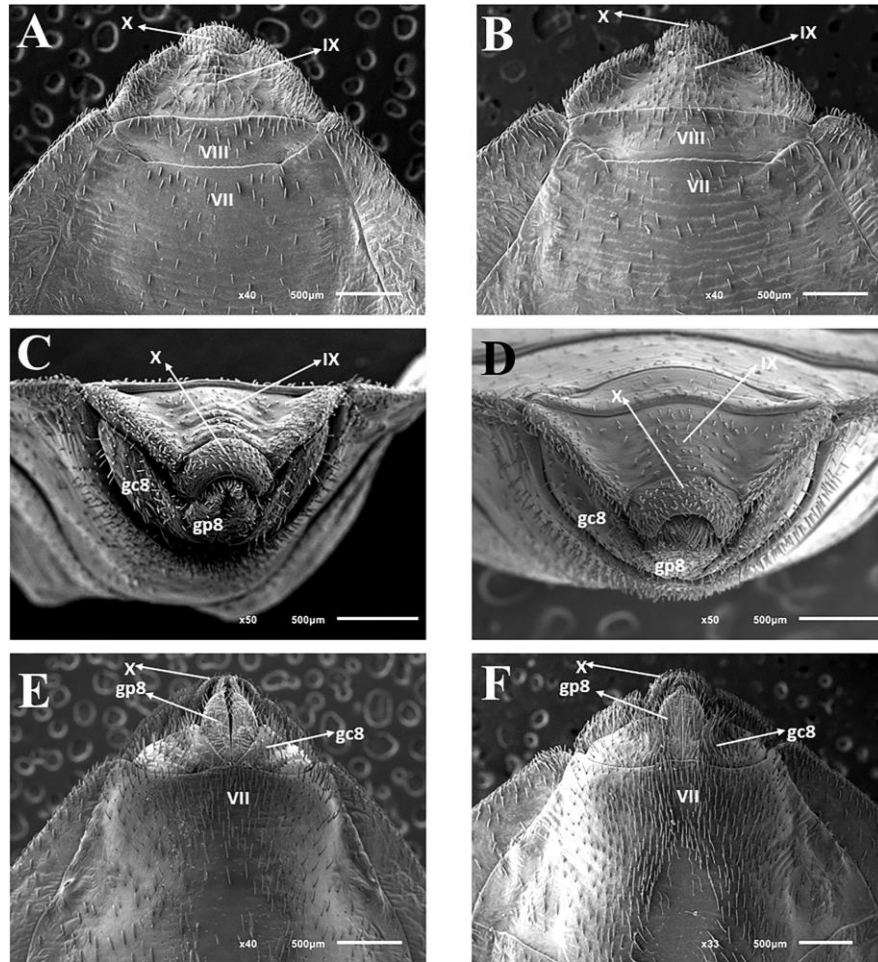


Figure 5. Female external genitalia by SEM: *T. rosai* sp. nov. (A) dorsal view, (C) posterior view, (E) ventral view, *T. sordida*: (B) dorsal view, (D) posterior view, (F) ventral view. Gc 8: gonocoxite; Gc 9: gonapophyse; Gp 8: gonapophyse, VII, VIII, IX: tergites; X: segment.

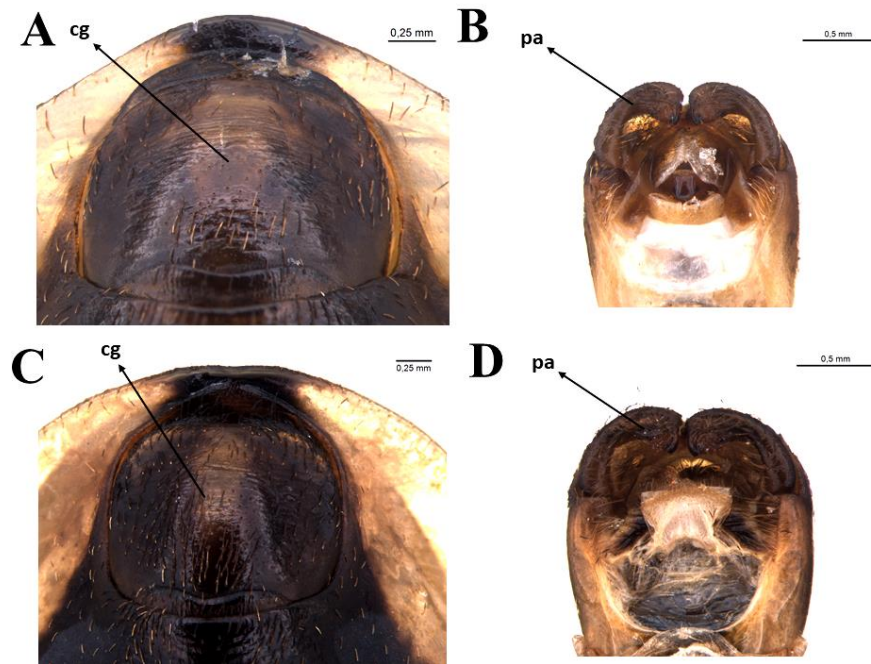


Figure 6. Detail of genital capsule *T. rosai* sp. nov.: (A) dorsal view, (B) ventral view, *T. sordida*: (C) dorsal view, (D) ventral view. cg: genital capsule, pa: paramere.

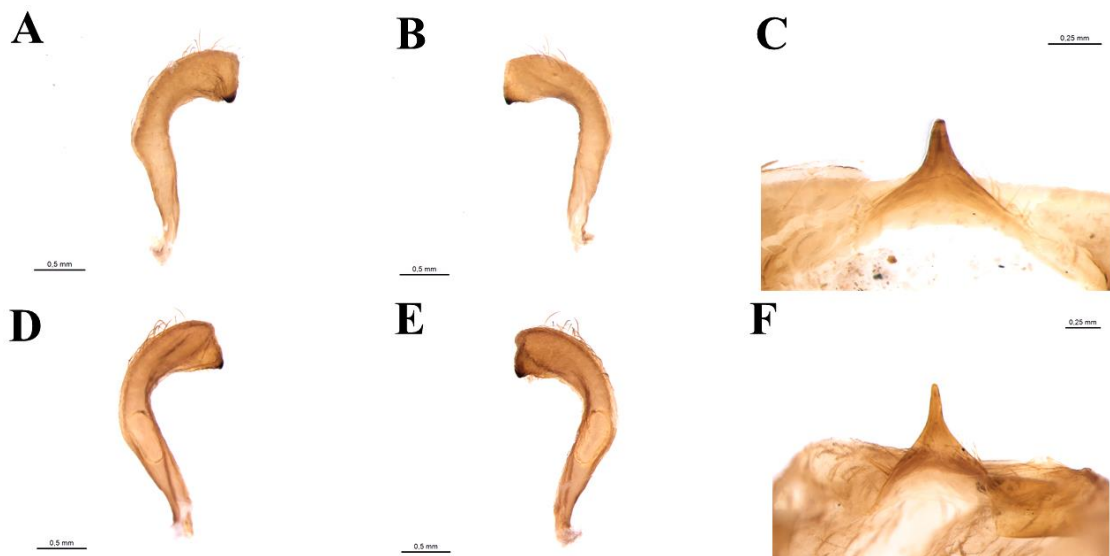


Figure 7. Paramere of *T. rosai* sp. nov.: (A) dorsal view, (B) ventral view; (C) Median process of the pygophore; Paramere of *T. sordida*: (D) dorsal view, (E) ventral view; (F) Median process of the pygophore.

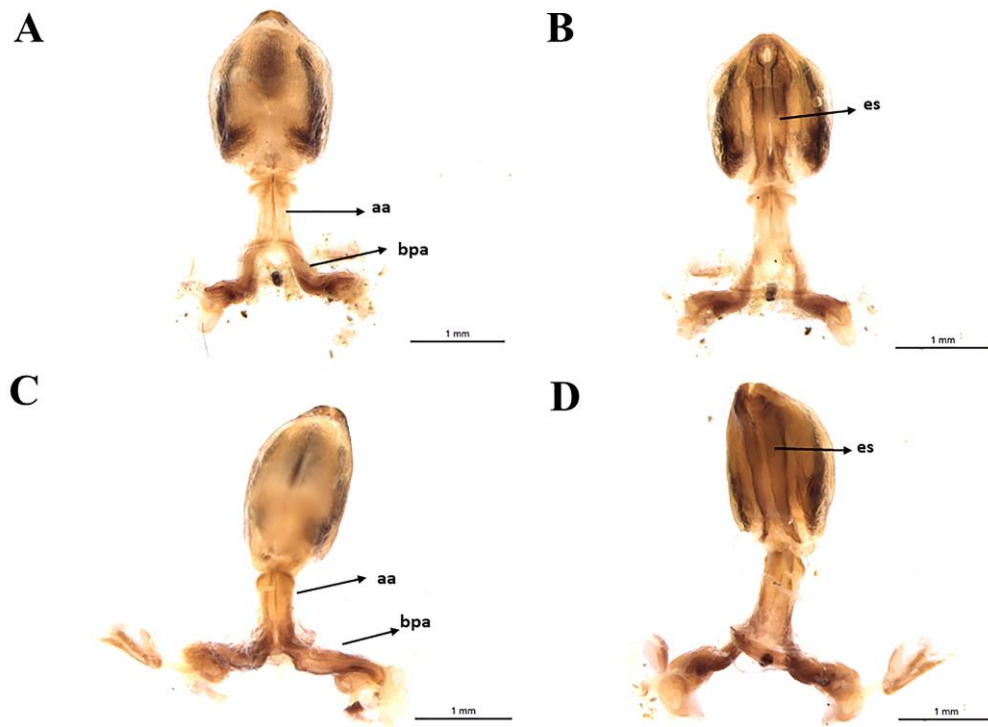


Figure 8. Phallus of *T. rosai* sp. nov.: (A) dorsal view, (B) ventral view, *T. sordida*: (C) dorsal view, (D) ventral view. bpa: basal plate arm, aa: articulatory apparatus, es: endosomal struts.

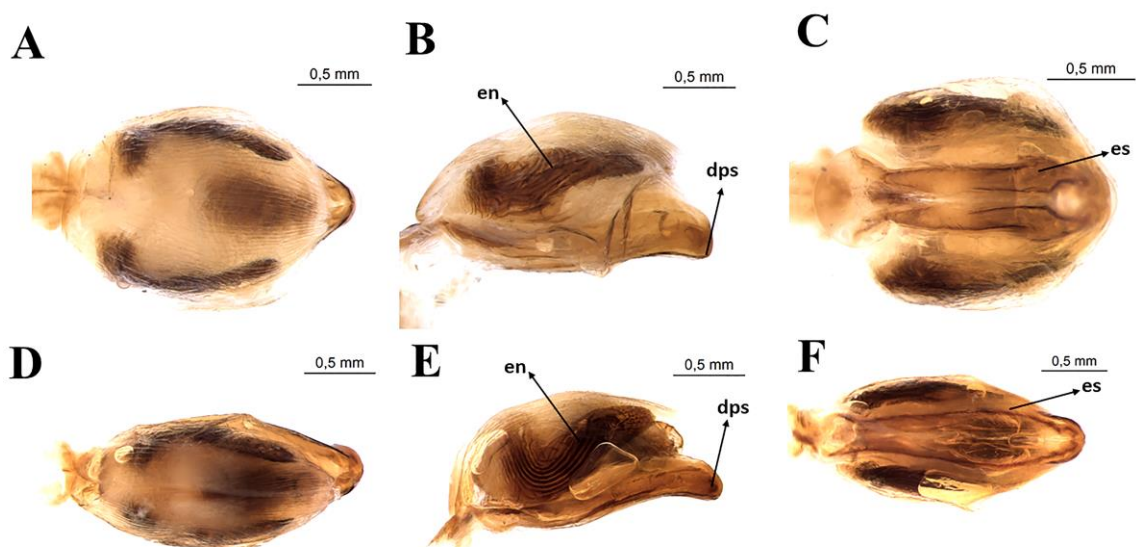


Figure 9. Phallus of *T. rosai* sp. nov.: (A) dorsal view, (B) lateral view, (C) ventral view; *T. sordida*: (D) dorsal view, (E) Lateral view, (F) ventral view. en: endosoma, dps: dorsal phallothecal sclerite, es: endosoma struts.

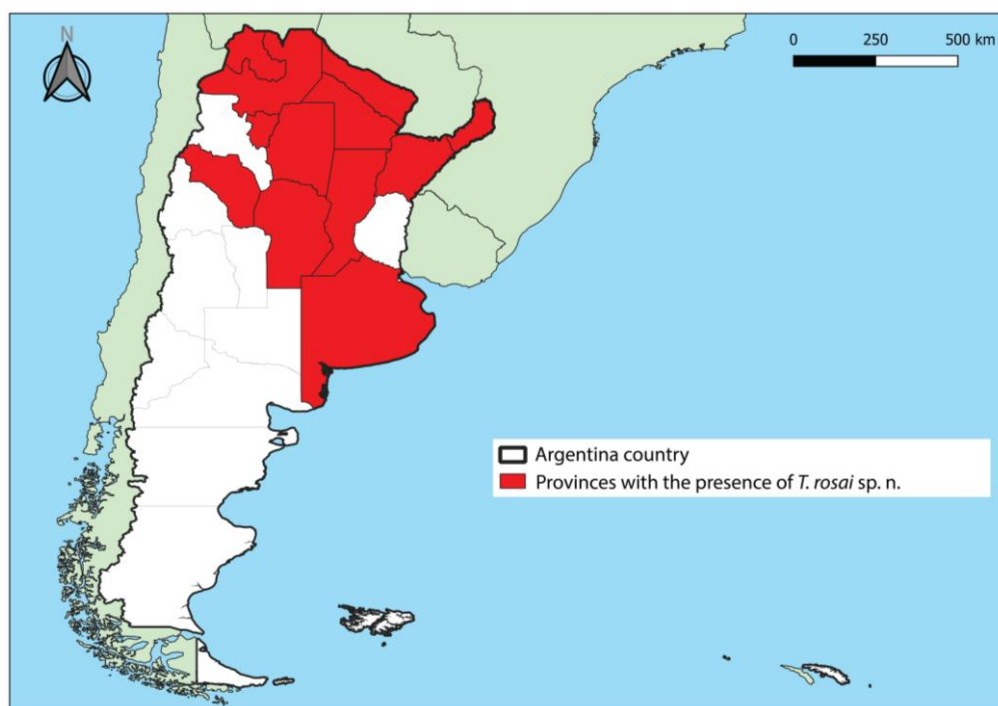


Figure 10. Occurrence of *T. rosai* sp. nov. in Argentina provinces. Made with QGIS.

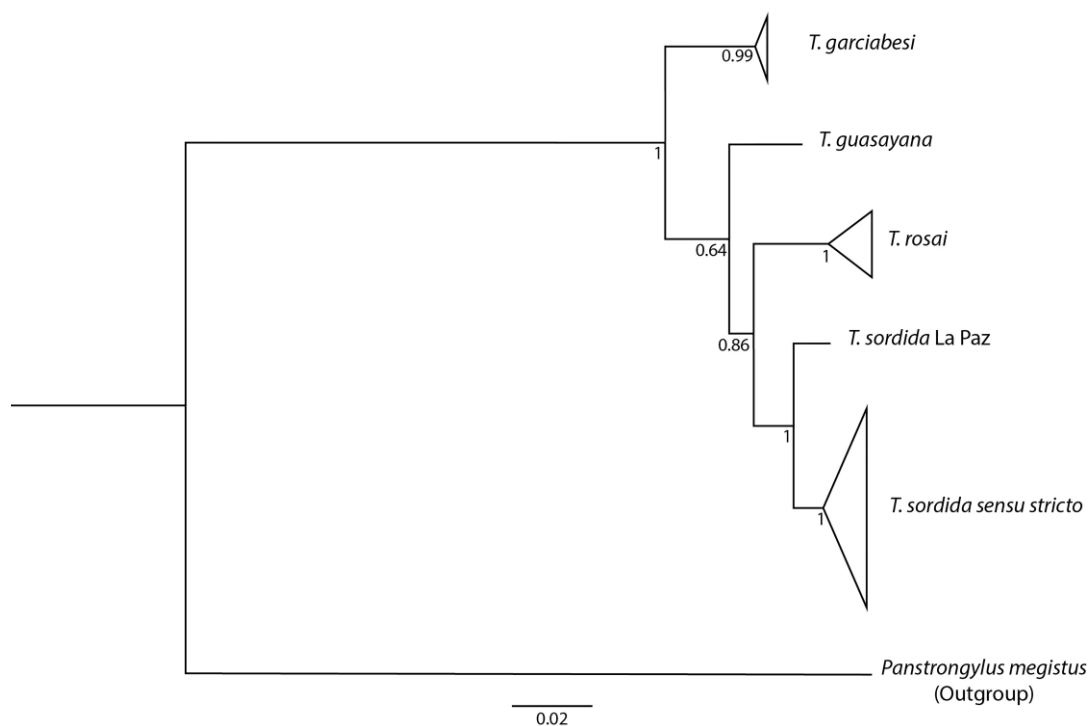


Figure 11. Tree obtained by Bayesian Inference for the concatenated genes COI, cyt b, 28S, 16S and ITS-1. The numbers in the nodes represent the bootstrap values.

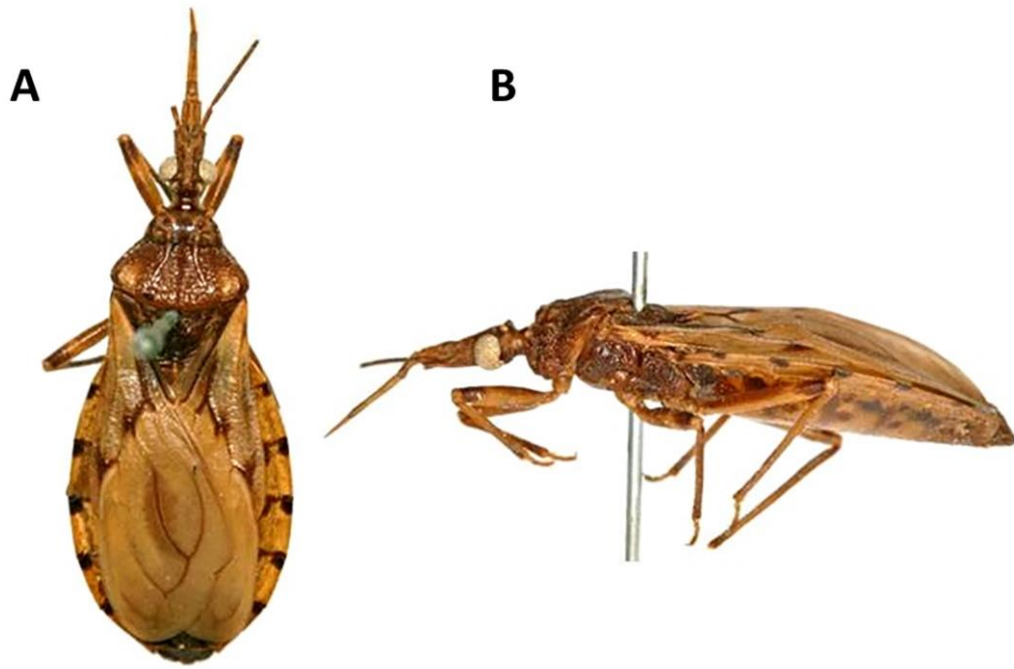


Figure 12. Holotype of *T. sordida* described by Stål in 1859 (as *Conorhinus sordidus*) and deposited in the Zoologisches Museum, Berlin, Alemanha, A – Dorsal view; B – Lateral view.

4.4. Capítulo IV (Artigo científico aceito para publicação na revista *Parasites & Vectors*; FI: 2,824)

MADEIRA, F. F.; DELGADO, L. M. G.; BITTINELLI, I. F.; OLIVEIRA, J.; RAVAZI, A.; REIS, Y. V.; OLIVEIRA, A. B. B.; CRISTAL, D. C.; GALVAO, C.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V.; ROSA, J. A.; ALEVI, K.C.C. *Triatoma sordida* (Stål, 1859) from La Paz, Bolivia (Hemiptera, Triatominae): an incipient species or an intraspecific chromosomal polymorphism? *Parasites & Vectors*, London. *In press*.

***Triatoma sordida* (Stål, 1859) from La Paz, Bolivia (Hemiptera, Triatominae): an incipient species or an intraspecific chromosomal polymorphism?**

ABSTRACT

Background: *Triatoma sordida* is one of the main Chagas disease vectors in Brazil. In addition to Brazil, this species has already been reported in Bolivia, Argentina, Paraguay, and Uruguay. There is a hypothesis that the insects currently identified as *T. sordida* are a species subcomplex formed by three cytotypes (*T. sordida sensu stricto*, *T. sordida* La Paz and *T. sordida* Argentina). With the recent description of *T. rosai* from the Argentinean specimens, it became necessary to assess the taxonomic status of *T. sordida* from La Paz, Bolivia, since was suggested that it may represents a new species, which has taxonomic, evolutionary and epidemiological implications. Based on the above, we carried out molecular and experimental crossover studies to assess the specific status of *T. sordida* La Paz. **Methods:** To evaluate the pre and post-zygotic barriers between *T. sordida* La Paz and *T. sordida sensu stricto*, experimental crosses and intercrosses between F1 hybrids and between F2 hybrids were conducted. In addition, cytogenetic analyses of the F1 and F2 hybrids were applied with an emphasis on the degree of pairing between the homeologous chromosomes, and morphological analyses of the male gonads were performed to evaluate the presence of gonadal dysgenesis. Lastly, the genetic distance between *T. sordida* La Paz and *T. sordida sensu stricto* was calculated for the Cyt B, ND1, and ITS-1 genes. **Results:** Regardless of the gene used, *T. sordida* La Paz showed low genetic distances compared to *T. sordida sensu stricto* (below 2%). Experimental crosses resulted in offspring for both directions, demonstrating that there are no prezygotic barriers installed between these allopatric

populations. Furthermore, post-zygotic barriers were not observed either (since the F1 x F1 and F2 x F2 intercrosses resulted in viable offspring). Morphological and cytogenetic analyses of the male gonads of the F1 and F2 offspring demonstrated that the testes were not atrophied and did not show chromosome pairing errors. **Conclusion:** Based on the low genetic distance (which configures intraspecific variation), associated with the absence of prezygotic and postzygotic reproductive barriers, we confirm that *T. sordida* La Paz represents only a chromosomal polymorphism of *T. sordida sensu stricto*.

Keywords: Chagas disease vector, triatomines, experimental crosses, genetic distance

Background

Triatomines are hematophagous insects of great importance to public health, since they are considered as the main form of transmission of the protozoan *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), the etiological agent of Chagas disease [1]. This disease (also known as American trypanosomiasis) is a neglected disease that affects about eight million people worldwide and results in 10,000 deaths per year [1]. These insects have the behavior of defecating or urinating during or after hematophagy and, once infected by *T. cruzi*, release the infective form of the parasite in feces/urine [1], which may lead to contamination of the host.

The subfamily Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) is composed of 156 species, grouped into 18 genera and five tribes [2-4]. All species are considered potential vectors of Chagas disease, although the genera *Triatoma* Laporte, 1832, *Rhodnius* Stål, 1859 and *Panstrongylus* Berg, 1879 are considered the most important from the epidemiological point of view [5,6].

Triatoma sordida (Stål, 1859) is one of the main Chagas disease vectors in Brazil, being the most captured species in peridomestic environments of Brazil [5,7] where it has already been reported naturally infected by *T. cruzi* [8]. In addition to Brazil, this species has already been reported in Bolivia, Argentina, Paraguay, and Uruguay, in the Atlantic forest, Caatinga, Cerrado, Chaco, and Pantanal biomes [3,5,9]. There is a hypothesis that the insects currently identified as *T. sordida* could be actually a species subcomplex formed by three cytotypes (cytotype 1 determined as *T. sordida sensu stricto*, cytotype 2 determined as *T. sordida* La Paz and cytotype 3 determined as *T. sordida* Argentina) [9], which resulted in the recent description of *T. rosai* Alevi et al., 2020 from the Argentinean specimens (excluding Argentina of the geographic distribution of *T. sordida*) [3].

For a long time, it was believed that the diversification events of the different *T. sordida* cytotypes were based on cryptic speciation [9]. However, comparative morphological and morphometric studies between *T. rosai* and *T. sordida* (Brazil, Bolivia, and Paraguay), as well as between *T. sordida* from different countries, found phenotypic differences, demonstrating that it is not cryptic speciation [10]. With the recent description of *T. rosai* (from *T. sordida* cytotypes from Argentina), it became necessary to assess the taxonomic status of *T. sordida* from La Paz, Bolivia (referred to as *T. sordida* La Paz), since Panzera et al. [9] suggested that this cytotype composed of domestic populations from La Paz, Bolivia may represent a new species, which has taxonomic, evolutionary and, above all, epidemiological implications.

According Panzera et al. [9] *T. sordida* La Paz represents a "chromosomal taxon" but these authors does not rule out the hypothesis that *T. sordida* La Paz and *T. sordida sensu stricto* may be conspecific populations with different ribosomal gene locations. Morphological, morphometric [11] and phylogenetic [12] studies have pointed to this hypothesis as the most viable. Assessing the specific status of *T. sordida* La Paz also has epidemiological implications, since different species may have different vectorial capacity and vector competences, such as *T. sordida sensu stricto* and *T. rosai*, which have different infection rates [3,13-17]. Entomoepidemiological studies indicate different infection rates between *T. sordida* from Brazil (0.5% to 41.9%) and Bolivia (16.2%) [14-18]. Thus, based on the above, we carried out molecular and experimental crossover studies to assess the specific status of *T. sordida* La Paz.

Methods

Experimental crosses

Experimental reciprocal crosses were conducted between *T. sordida* La Paz (Apolo, La Paz, Bolivia, collected in peridomiciliary ecotopes) and *T. sordida sensu stricto* (Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brazil, collected in peridomiciliary ecotopes). The insects used in the experiments came from colonies kept in the Triatominae insectary of the School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University (UNESP), Araraquara, São Paulo, Brazil. The experimental crosses were conducted in the Triatominae insectary, according to the experiments of Correia et al. [19] and Mendonça et al. [20]: the insects were sexed as 5th instar nymphs [21], and males and females were kept separately until they reached the adult stage 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 (average of 24°C [22]) and relative humidity average of 63% [22]). Weekly, the eggs were collected, counted, and separated in new jars to assess the hatch rate. Upon reaching the fifth instar (N5), again three pairs of first-generation nymphs (F1) resulting from each interspecific cross were separated to perform intercrosses (F1 x F1) (Table 1), being the same parameters described above reviewed again. Finally, the eggs of these crosses were again counted and separated, and from the second-generation nymphs (F2), new backcrosses (F2 x F2) (Table 1) were performed to assess the hatching rate of third-generation (F3).

Molecular analysis

For molecular analysis, the genomic DNA of five parental insects used in crosses (*T. sordida* Apolo, La Paz, Bolivia and *T. sordida* Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brazil, both collected in peridomiciliary ecotopes) was extracted from gonads using the DNeasy Blood and Tissue kit (QIAGEN®). Amplification of the fragments was performed by polymerase chain reaction (PCR), using primers targeting the Cyt B [23], ND1 [24], and ITS-1 genes [25] described in the literature. The amplified PCR products were visualized by electrophoresis in 1% agarose gel and later purified using the GFX PCR DNA & Gel Band Kit (GE Healthcare and Life Technology®) according to the manufacturer's instructions. Subsequently, this material was submitted for direct sequencing on an ABI 3730 DNA Analyzer (Life Technologies) sequencer, from the Research Center on the Human Genome and Stem Cells, University of São Paulo (USP), Brazil. The obtained sequences were manually edited using BioEdit Alignment Editor v.7.0.5.3 and aligned using the ClustalW Multiple Alignment tool. The genetic sequences are available on GenBank [access data: *T. sordida sensu stricto* Cyt B (MZ700100), ND1 (MZ700102) and ITS-1 genes (MZ648337); *T. sordida* La Paz Cyt B (MZ700101), ND1 (MZ700103) and ITS-1 genes (MZ648333)]. The genetic distance matrices between *T. sordida sensu stricto* and *T. sordida* La Paz for all genes were obtained by the MEGA 7.0 software, using the Kimura-2-parameters distance model (K2P). Sequences available on the GenBank of *T. brasiliensis* Neiva, 1911 for the Cyt B (KC249239), ND1 (AM980619) and ITS-1 genes (KJ125138) were used as outgroups.

Morphology of the gonads and Cytogenetic analysis

After the experimental crosses (F1 x F1 and F2 x F2) (Table 1), the F1 and F2 males were dissected (n = 5), the testes were removed and stored in methanol: acetic acid solution (3: 1). Before cytogenetic analysis, the morphology of the male gonads from F1 and F2 hybrids specimens (n = 5) was analyzed under a LEICA MZ APO stereoscopic microscope and analyzed through the Motic Advanced 3.2 plus image analysis system to evaluate the presence of gonadal dysgenesis (which may be uni or bilateral) [26]. Posteriorly, slides were prepared by the cell crushing technique (as described by Alevi et al. [27]), and the cytogenetic analysis was applied to characterize the spermatogenesis, with emphasis on the degree of pairing between the homeologous chromosomes [20], using the Lacto-Acetic orcein technique [27,28]. The slides were examined using a JenaVal light microscope (Zeiss), coupled to a digital camera and an AxioVision LE 4.8 Image Analysis Software. The images obtained were magnified by a factor of 1000x.

Results and Discussion

Extremely low genetic distance values were found between *T. sordida* La Paz and *T. sordida sensu stricto* (Table 2). These results could be associated with the absence of prezygotic [represented by the hatching of F1 hybrids (Table 1)] and postzygotic barriers [represented by the absence of mortality among F1 hybrids that showed normal development and reached adulthood (absence of hybrid inviability) (Table 1), by obtaining F2 hybrids, demonstrating that the F1 hybrids were fertile (Table 1) and that they did not present atrophied gonads (Figure 2) and produced viable gametes (Figure 3) (absence of hybrid sterility) and by high F3 hatching rate (Table 1) associated with 100% pairing (Figure 3) (absence of hybrid breakdown)] installed between these allopatric populations (Table 1). These data indicate that *T. sordida* La Paz represents only a chromosomal polymorphism of *T. sordida sensu stricto*.

Alevi et al. [3] and Belintani et al. [12] presented robust phylogenetic analyses using *T. sordida sensu stricto*, *T. sordida* La Paz and *T. rosai*. In both, *T. sordida* La Paz was recovered along with *T. sordida sensu stricto* and *T. rosai* was recovered as an independent strain. Morphological and morphometric analyses resulted in similar clusters to those above, since *T. sordida sensu stricto* and *T. sordida* La Paz showed similar characteristics to each other (that grouped them) and divergent from *T. rosai* [11].

Regardless of the gene used, *T. sordida* La Paz showed extremely low genetic distances compared to *T. sordida sensu stricto* (Table 2). Monteiro et al. [29] suggest that

minimum interspecific distances in Triatominae should be greater than 2%. *Triatoma rosai* and *T. sordida sensu stricto*, for example, have a distance greater than 8% (which confirmed the specific status of *T. rosai*) [3]. On the other hand, our results demonstrated that the greatest distance observed between *T. sordida* La Paz and *T. sordida sensu stricto* was 1.9% (Table 2), which suggests that these cytotypes represent only intraspecific chromosomal variation.

Experimental crosses (Figure 1) resulted in offspring for both directions (Table 1), demonstrating that there are no prezygotic barriers installed between these allopatric populations. These results demonstrate that beyond the physical barriers that, possibly, make it impossible to find these insects together in nature (because they inhabit different countries in South America [9]), there are no prezygotic barriers installed between *T. sordida* La Paz and *T. sordida sensu stricto*. So, under laboratory conditions, these insects recognize each other (absence of ethological isolation), copulate (absence of mechanical isolation), in addition to occurring gametic, genomic and, above all, zygotic (absence of gametic isolation) compatibility.

In triatomines, the detection of pre and/or postzygotic barriers has helped in taxonomy and systematics, since evolutionarily more distant species have prezygotic barriers that prevent the formation of hybrids, while evolutionarily closely-related species can produce hybrids that will decline (hybrid breakdown) by postzygotic barriers such as hybrid inviability, hybrid sterility, or hybrid collapse [30].

From F1 hybrids that reached adulthood, confirming the absence of post-zygotic barrier of hybrid inviability, intercrosses were performed (Table 1) and F2 hybrids were obtained for all combinations (Table 1), also demonstrating the absence of the postzygotic barrier of hybrid sterility. The unfeasibility of the hybrids is represented by the high mortality rate, associated with their low adaptive value, during the nymphal stages [3]. This postzygotic barrier was extremely important to confirm the specific status of *T. rosai* [3]. On the other hand, the hybrid sterility, which can be represented by the atrophy of the gonads (gonadal dysgenesis) [26] or by chromosomal pairing errors which lead to the formation of unviable gametes [31], was also not observed, since F2 hybrids hatched (Table 1) and morphological analyses of the male gonads of the F1 and F2 offspring demonstrated that the testes were not atrophied compared to control group – absence of gonadal dysgenesis (Figure 2). Furthermore, cytogenetic analyses of the degree of pairing between the homeologous chromosomes of the F1 and F2 hybrids demonstrated genomic compatibility between both

cytotypes, since all chromosomes were paired during metaphases (Figure 3), resulting in the formation of viable gametes.

For triatomines, all cases of hybrid sterility were associated only with errors during meiosis [31,32]. The degree of pairing between the homeologous chromosomes of F1 hybrids allows to evaluate the evolutionary relationship between the species [33]: in general, species that are phylogenetically closer range about 90-100% chromosomal pairing (as observed among species of the *T. brasiliensis* complex [20,34] and *T. infestans* subcomplex [23]); meanwhile more distant related species show several pairing errors (40% or more), as observed between *T. infestans* and *T. rubrovaria* (Blanchard, 1846) [31]. Panzera et al. [9] presented cytogenetic analyses of four possible hybrids of *T. sordida* from Bolivia (two from Apolo, La Paz, and two from Izozog, Santa Cruz) and observed 100% chromosomal pairing and variations in 45S rDNA probe markings (which led the authors to consider these specimens as hybrids). Our results indicate that the insects analyzed were only chromosomal variants of *T. sordida sensu stricto*.

Nascimento et al. [35] combined molecular data and experimental crosses to synonymize *R. taquarussuensis* Rosa et al., 2017 with *R. neglectus* Lent, 1954. The authors noted that the hatch rates of F1 offspring were the same as for parental crosses (greater than 78%). Our results demonstrate that the hatching rate of the F1 and F2 offspring was greater than 80% and of the F3 offspring greater than 60% (Table 1), being all these rates higher than the hatching rate observed to control crosses between *T. sordida* La Paz (Table 1). These results, combined with the low genetic distances data, also indicate that *T. sordida* La Paz and *T. sordida sensu stricto* are the same species.

The hatching of viable hybrids up to F3 demonstrates the absence of a postzygotic barrier by hybrid collapse. Mendonça et al. [20] characterized this event for hybrids resulting from the crosses between *T. lenti* Sherlock & Serafim, 1967 and *T. sherlocki* Papa et al., 2002. The authors observed the absence of F3 for the cross between *T. lenti* female and *T. sherlocki* male and the presence of only two F3 nymphs for the cross between *T. lenti* male and *T. sherlocki* female, that died soon after hatching [20]. Furthermore, Mendonça et al. [20] analyzed the metaphases of F2 hybrids that were intercrossed and observed several chromosomal pairing errors (which resulted in the formation of inviable gametes). The high F3 hatching rate associated with 100% pairing between the F2 hybrid chromosomes demonstrates that this evolutionary phenomenon is not occurring in hybrids of *T. sordida* La Paz and *T. sordida sensu stricto*.

Conclusion

Based on the low genetic distance (which configures intraspecific variation), associated with the absence of prezygotic and postzygotic reproductive barriers, we confirm that *T. sordida* La Paz represents only a chromosomal polymorphism of *T. sordida sensu stricto*.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Availability of data and materials

The data supporting the conclusions of this article are included within the article.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

This research was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Process number 2017/05015-7, 2018/12039-2, 2018/24116-1, and 2019/17581-2), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior–Brazil (CAPES) – Finance Code 001. JAR: CNPq, PQ-2, process 307 398/2018-8.

Authors' contributions

FFM: Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing - Original Draft Preparation and Writing - Review & Editing, LGMD: Conceptualization, Methodology, Investigation and Data Curation, IFB: Conceptualization, Methodology, Investigation and Data Curation, JO: Conceptualization, Methodology, Investigation, Data Curation and Writing - Review & Editing, AR: Methodology, Investigation and Data Curation, YVR: Methodology, Investigation and Data Curation, ABBO: Methodology, Investigation and Data Curation, DCC: Methodology, Investigation and Data Curation, CG: Conceptualization, Writing - Review & Editing, and Funding acquisition, MTVAO: Conceptualization, Funding

acquisition and Writing - Review & Editing, JAR: Conceptualization, Resources and Writing - Review & Editing, KCCA: Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing - Original Draft Preparation and Writing - Review & Editing, Supervision, Project administration and Funding acquisition.

Acknowledgments

We appreciate the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Process number 2017/05015-7, 2018/12039-2, 2018/24116-1, and 2019/17581-2), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior–Brazil (CAPES) – Finance Code 001 for financial support.

References

1. World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis). [http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Accessed 12 May 2021.
2. Galvão C. Taxonomia dos Vetores da Doença de Chagas da Forma à Molécula, quase três séculos de história. In: Oliveira J, Alevi KCC, Camargo LMA, Meneguetti DUO, editores. *Atualidades em Medicina Tropical no Brasil: Vetores*. São Paulo: Strictu Sensus Editora; 2020. p. 9-37.
3. Alevi KCC, Oliveira J, Garcia ACC, Cristal DC, Delgado LMG, Bittinelli IF, et al. *Triatoma rosai* sp. nov. (Hemiptera, Triatominae): A New Species of Argentinian Chagas Disease Vector Described Based on Integrative Taxonomy. *Insects*. 2020;11:830.
4. Zhao Y, Galvão C, Cai W. *Rhodnius micki*, a new species of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) from Bolivia. *ZooKeys*. 2021;012:71–93.
5. Galvão C. *Vetores da doença de Chagas no Brasil*. 1ª ed. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia; 2014. p. 289p.
6. Justi SA, Russo CAM, Mallet JR dos S, Obara MT, Galvão C. Molecular phylogeny of Triatomini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Parasit Vect*. 2014;7:149.
7. Diotaiuti L, Pereira AS, Loiola CF, Fernandes AJ, Schofield JC, Dujardin JP, et al. Interrelation of sylvatic and domestic transmission of *Trypanosoma cruzi* in areas with and without domestic vectorial transmission in Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1995;90;443–48.
8. Lent H, Wygodzinsky P. Revision of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) and their significance as vector of Chagas's disease. *Bull Am Mus Nat Hist*. 1979;163:123-520.
9. Panzera F, Pita S, Nattero J, Panzera Y, Galvao C, Chavez T, et al. Cryptic speciation in the *Triatoma sordida* subcomplex (Hemiptera, Reduviidae) revealed by chromosomal markers. *Parasit Vect*. 2015;8,495.

10. Garcia ACC, Oliveira J, Cristal DC, Delgado LMG, Bittinelli IF, Galvão C, et al. Intraspecific and interspecific phenotypic differences confirm the absence of cryptic speciation in *Triatoma sordida* (Hemiptera, Triatominae). Am J Trop Med Hyg. 2021; in press.
11. Nattero J, Piccinali RM, Lopes CM, Hernandez ML, Abrahan L, Lobbia PA, et al. Morphometric variability among the species of the Sordida subcomplex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae): Evidence for differentiation across the distribution range of *Triatoma sordida*. Parasit. Vect. 2017;10,412.
12. Belintani T, Oliveira J, Pinotti H, Silva LA, Alevi KCC, Galvão C, et al. Phylogenetic and phenotypic relationships of the *Triatoma sordida* subcomplex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Acta Trop. 2020;212,105679.
13. Bar ME, Wisniewsky-Colli C. *Triatoma sordida* Stål 1859 (Hemiptera, Reduviidae: Triatominae) in palms of northeastern Argentina. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2001;96,895–9.
14. Castro GB, Machado EMM, Borges EC, Lorosa ES, Andrade RE, Diotaiuti, L, et al. *Trypanosoma cruzi* Peridomiciliar Transmission by *Triatoma sordida* in the Municipality of Patís, Gerais State, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1997;92,434.
15. Lorosa ES, Andrade RE, Santos SM, Pereira CA. Estudo da infecção natural e da fonte alimentar do *Triatoma sordida* (Stal, 1859), (Hemiptera -Reduviidae) na região norte de Minas Gerais, Brazil, através da reação de precipitina. Entomol. Vectores. 1998;5,13–22.
16. Brenière SF, Aliaga C, Waleckx E, Buitrago R, Salas R, Barnabé C, et al. Genetic characterization of DTUs in wild *Triatoma infestans* from Bolivia: Predominance of TcI. PLoS Negl. Trop. Dis. 2012;6,e1650.
17. Rossi JCN, Duarte EC, Gurgel-Gonçalves R. Factors associated with the occurrence of *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) in rural localities of Central-West Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2015;110,192–200.
18. Lorosa ES, Cahet DMB, Andrade RE, Figueiredo JF, Jurberg J. O uso da técnica de precipitação no estudo do comportamento alimentar e grau de infectividade em *Triatoma sordida* (Stal 1859) (Hemiptera – Reduviidae), coletados no estado de Mato Grosso, Brasil. Entomol. Vect. 2000;7,227-37.
19. Correia N, Almeida CE, Lima-Neiva V, Gumiel M, Lima MM, Medeiros LMO, et al. Crossing experiments confirm *Triatoma sherlocki* as a member of the *Triatoma brasiliensis* species complex. Acta Trop. 2013;128:162-67.
20. Mendonça VJ, Alevi KCC, Medeiros LM, Nascimento JD, Azeredo-Oliveira MTV, Rosa JA. 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. 2014;26:123-31.

21. Rosa JA, Barata JMS, Barelli N, Santos JLF, Belda Neto FM. Sexual distinction between 5th instar nymphs of six species (Hemiptera: Reduviidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1992;87:257-64.
22. Olaia N, Alevi KCC, Oliveira J, Cacini GL, Souza EDS, Pinotti H, et al. Biology of Chagas disease vectors: biological cycle and emergence rates of *Rhodnius marabaensis* Souza et al., 2016 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) under laboratory conditions. Parasitol. Res. 2021.
23. Monteiro, FA, Perez R, Panzera F, Dujardin JP, Galvao C, Rocha, D, et al. Mitochondrial DNA variation of *Triatoma infestans* populations and its implication on the specific status of *T. melanosoma*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999;94:229-38.
24. Guerra AL. Análise molecular do subcomplexo Brasiliensis (Hemiptera, Triatominae). 2016. <http://repositorio.unesp.br/handle/11449/136463>. Accessed 23 May 2020.
25. Tartarotti E, Ceron CR. Ribosomal DNA ITS-1 intergenic spacer polymorphism in triatomines (Triatominae, Heteroptera). Biochem Genet. 2005;43:365-73.
26. Almeida LM, Carareto CMA. Gonadal hybrid dysgenesis in *Drosophila sturtevantii* (Diptera, Drosophilidae). Ilheringia. 2002;92:71-9.
27. Alevi KCC, Mendonça PP, Pereira NP, Rosa JA, Azeredo-Oliveira MTV. Karyotype of *Triatoma melanocephala* Neiva & Pinto (1923). Does this species fit in the Brasiliensis subcomplex? Infect Genet Evol. 2012;12:1652-53.
28. De Vaio ES, Grucci B, Castagnino AM, Franca ME, Martinez ME. Meiotic differences between three triatomine species (Hemiptera:Reduviidae). Genetica. 1985;67:185-91.
29. Monteiro FA, Donnelly MJ, Beard CB, Costa J. Nested clade and phylogeographic analyses of the Chagas disease vector *Triatoma brasiliensis* in Northeast Brazil. Mol Phylogenet Evol. 2004;32:46-56.
30. Neves SJM, Sousa PS, Oliveira J, Ravazi, A, Madeira FF, Reis, YV, et al. Prezygotic isolation confirms the exclusion of *Triatoma melanocephala*, *T. vitticeps* and *T. tibiamaculata* of the *T. brasiliensis* subcomplex (Hemiptera, Triatominae). Infect Genet Evol. 2020;79:104149.
31. Pérez R, Hernández M, Quintero O, Scovortzoff E, Canale D, Méndez L, et al. Cytogenetic analysis of experimental hybrids in species of Triatominae (Hemiptera - Reduviidae). Genetica. 2005;125:261-70.
32. Díaz S, Panzera F, Jaramillo-O N, Pérez R, Fernández R, Vallejo G, et al. Genetic, Cytogenetic and Morphological Trends in the Evolution of the *Rhodnius* (Triatominae: Rhodniini) Trans-Andean Group. PLoS ONE. 2014;9.
33. Riley R. The secondary pairing of bivalents with genetically similar chromosomes. Nature. 1966;185:751-2.

34. Alevi KCC, Pinotti H, Araújo RF, Azeredo-Oliveira MTV, Rosa JA, Mendonça VJ. Hybrid collapse confirm the specific status of *Triatoma bahiensis* Sherlock and Serafim, 1967 (Hemiptera, Triatominae). Am J Trop Med Hyg. 2018;98:475-7.
35. Nascimento JD, Ravazi A, Alevi KCC, Pardo-Diaz C, Salgado-Roa FC, Rosa JA, et al. 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. 2019;14:e0211285.

Table 1. Experimental crosses performed between *T. sordida* La Paz and *T. sordida sensu stricto*.

Crossing experiments	Number of eggs			Egg Fertility	
	C1	C2	C3	Total	
<i>T. sordida</i> La Paz ♀ x <i>T. sordida sensu stricto</i> ♂	60	92	200	352	86%
<i>T. sordida sensu stricto</i> ♀ x <i>T. sordida</i> La Paz ♂	64	68	225	357	85%
Hybrid F1 ♀ x Hybrid F1 ♂ ^a	79	274	-	353	85%
Hybrid F1 ♀ x Hybrid F1 ♂ ^b	189	108	-	297	93%
Hybrid F2 ♀ x Hybrid F2 ♂ ^c	200	139	-	339	64%
Hybrid F2 ♀ x Hybrid F2 ♂ ^d	122	150	-	272	67%
Control experiments					
<i>T. sordida</i> La Paz ♀ x <i>T. sordida</i> La Paz ♂	132	164	35	331	53%
<i>T. sordida sensu stricto</i> ♀ x <i>T. sordida sensu stricto</i> ♂	286	126	178	590	73%

^a Hybrids of the cross between *T. sordida* La Paz ♀ x *T. sordida sensu stricto* ♂; ^b Hybrids of the cross between *T. sordida sensu stricto* ♀ x *T. sordida* La Paz ♂; ^c Hybrids of the cross between hybrids F1 from *T. sordida* La Paz ♀ x *T. sordida sensu stricto* ♂; ^d Hybrids of the cross between hybrids F1 from *T. sordida sensu stricto* ♀ x *T. sordida* La Paz ♂. C1, C2 and C3: replicates of experimental crosses, F1: first-generation, F2: second-generation.

Table 2. Genetic distance between *T. sordida* La Paz and *T. sordida sensu stricto* for mitochondrial (Cyt B and ND1) and nuclear (ITS-1) genes.

Genetic distance of Cyt B gene

	(1)	(2)	(3)
(1) <i>T. sordida sensu stricto</i>	-		
(2) <i>T. sordida</i> La Paz	0,018		
(3) <i>T. brasiliensis</i>	0,184	0,192	-

Genetic distance of ND1 gene

	(1)	(2)	(3)
(1) <i>T. sordida sensu stricto</i>	-		
(2) <i>T. sordida</i> La Paz	0,019		
(3) <i>T. brasiliensis</i>	0,098	0,089	-

Genetic distance of ITS-1 gene

	(1)	(2)	(3)
(1) <i>T. sordida sensu stricto</i>	-		
(2) <i>T. sordida</i> La Paz	0,008		
(3) <i>T. brasiliensis</i>	0,253	0,244	-

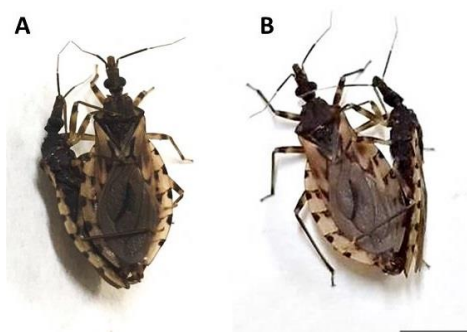


Figure 1. Experimental crosses between *T. sordida* La Paz and *T. sordida sensu stricto*: A. *T. sordida sensu stricto* female (right) x *T. sordida* La Paz male (left); B. *T. sordida* La Paz female (left) x *T. sordida sensu stricto* male (right). Bar: 1 cm.

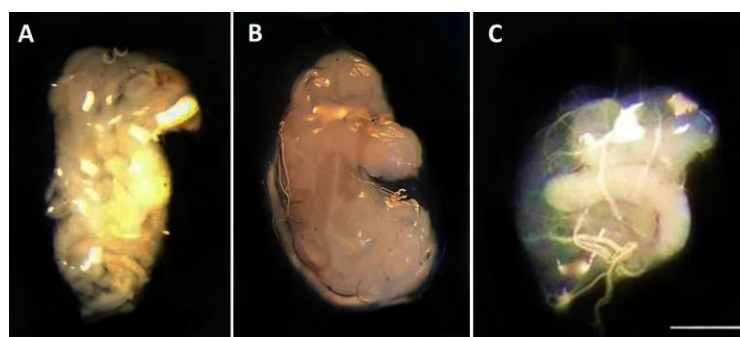


Figure 2. Not atrophied testicle of hybrid of *T. sordida* La Paz and *T. sordida sensu stricto*, demonstrating the absence of gonadal dysgenesis. A. Testicle of *T. sordida* La Paz; B. Testicle of hybrid F1 of the crosses between *T. sordida* La Paz female x *T. sordida sensu stricto* male; C. Testicle of hybrid F2 of the crosses between *T. sordida* La Paz male x *T. sordida sensu stricto* female. Bar: 10 mm.

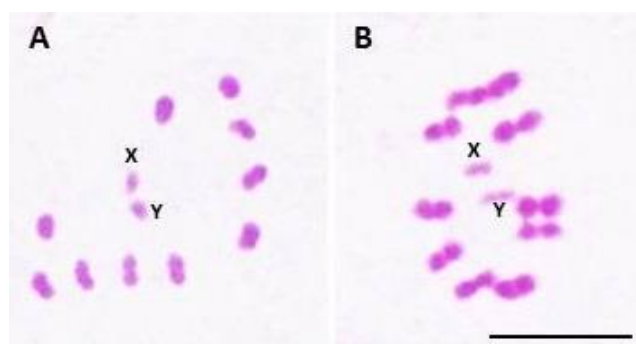


Figure 3. Meiotic metaphases of hybrids F1 resulting from the experimental crosses between *T. sordida* La Paz and *T. sordida sensu stricto*. A and B. Metaphases with correct pairing of the homeologous chromosomes; A. Hybrid F1 of the crosses between *T. sordida* La Paz female x *T. sordida sensu stricto* male; B. Hybrid F1 of the crosses between *T. sordida* La Paz male x *T. sordida sensu stricto* female; X: sex chromosomes X, Y: sex chromosomes Y. Bar: 10 μ m.

5. CONCLUSÕES

- a) Por meio de marcadores citogenéticos (Bandamento-C e CMA₃/DAPI), foi verificado que todas as populações brasileiras de diferentes biomas de *T. sordida* analisadas apresentam uma diversidade genética extremamente baixa, uma vez que todos os espécimes, independentemente da localidade, apresentaram as mesmas características:
- Bandamento-C: vários corpos heterocromáticos observados durante a prófase meiótica inicial, sendo um deles formado pelos cromossomos sexuais associados rodeado por algumas regiões heterocromáticas autossômicas; a maioria dos autossomos apresentam um bloco C-heterocromático em uma extremidade cromossômica e o cromossomo X pode apresentar um pequeno bloco C durante a metáfase meiótica;
 - Bandamento CMA₃/DAPI: vários corpos ricos em CG dispersos no núcleo da prófase meiótica inicial, sendo um deles formado pela associação do cromossomo sexual X circundado por alguns autossomos e apenas o cromossomo sexual Y rico em regiões AT.
- b) Por meio de marcadores moleculares mitocondriais (Cyt B e ND1), foi corroborada a baixa diversidade genética das populações brasileiras de *T. sordida*, evidenciada pelos seguintes fatores: baixa diversidade nucleotídica, alta diversidade haplotípica, baixa distância genética entre todas as localidades, alto valor do índice F_{st} , assim como a formação de um clado monofilético de todas as populações brasileiras amostradas e separado de espécimes da Argentina. Portanto, todos os espécimes brasileiros podem ser agrupados como *T. sordida sensu stricto*, o citótipo de maior importância na transmissão doméstica e peridoméstica da doença de Chagas.
- c) Com base na taxonomia integrativa, por meio de análises morfológicas, morfométricas, moleculares e cruzamentos experimentais, combinados com dados disponíveis na literatura, demonstramos que o citótipo *T. sordida* da Argentina é uma nova espécie, confirmando o *status* específico de *T. rosai* sp. nov.
- d) Com base na distância genética extremamente baixa, associada à ausência de barreiras reprodutivas pré-zigóticas e pós-zigóticas, sugerimos que *T. sordida* La Paz representa apenas um polimorfismo cromossômico de *T. sordida sensu stricto* e não um novo táxon, como o caso do citótipo *T. sordida* Argentina.

Referências bibliográficas

REFERÊNCIAS

- ABAD-FRANCH, F.; PAVAN, M. G.; JARAMILLO-O, N.; PALOMEQUE, F. S.; DALE, C.; CHAVERRA, D.; MONTEIRO, F. A. *Rhodnius barretti*, a new species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) from western Amazonia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, supl. 1, p. 92-99, 2013.
- ABALOS, J. W. Sobre híbridos naturales y experimentales de *Triatoma*. **Anais do Instituto Regional**, v. 2, p. 209-223, 1948.
- ABALOS J. W.; WYGODZINSKY, P. Las Triatominae argentinas. **Monographia Instituto de Medicina Regional de la Universidad Nacional de Tucumán**, v. 1, p. 1-178, 1951.
- ALEVI, K. C. C.; MENDONÇA, P. P.; SUCI, M.; PEREIRA, N. P.; ROSA, J. A.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Karyotype and spermatogenesis in *Triatoma melanocephala* Neiva and Pinto (1923). Does this species fit in the Brasiliensis subcomplex? **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, p. 1652-1653, 2012.
- ALEVI, K. C. C.; OLIVEIRA, J.; GARCIA, A. C. C.; CRISTAL, D. C.; DELGADO, L. M. G.; BITTINELLI, I. F.; REIS, Y. V.; RAVAZI, A.; OLIVEIRA, A. B. B.; GALVÃO, C.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V.; MADEIRA, F. F. *Triatoma rosai* sp. nov. (Hemiptera, Triatominae): A New Species of Argentinian Chagas Disease Vector Described Based on Integrative Taxonomy. **Insects**, v. 11, n. 830, 2020.
- ALEVI, K. C. C.; PINOTTI, H.; ARAÚJO, R. F.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V.; ROSA, J. A.; MENDONÇA, V. J. Hybrid collapse confirm the specific status of *Triatoma bahiensis* Sherlock and Serafim, 1967 (Hemiptera, Triatominae). **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, p. 475-477, 2018.
- ALMEIDA, L. M.; CARARETO, C. M. A. Gonadal hybrid dysgenesis in *Drosophila sturtevantii* (Diptera, Drosophilidae). **Ilheringia**, v. 92, p. 71-79, 2002.
- ANGHEBEN, A.; BOIX, L.; BUONFRATE, D.; GOBBI, F.; BISOFFI, Z.; PUPELLA, S.; GANDINI, G.; APRILI, G. Chagas disease and transfusion medicine: A perspective from non-endemic countries. **Blood Transfusion**, v. 13, n. 4, p. 540-550, 2015.
- ARNOLD, M. L. **Natural Hybridization and Evolution**. University Press, New York, Oxford, 215 pp, 1997.
- AVISE, J. C. **Phylogeography: The History and Formation of Species**. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press, 2000, 447 pp.
- AVISE, J. C.; ARNOLD, J.; BALL, R. M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J. E.; REEB, C. A.; SAUNDERS, N. C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual review of ecology and systematics**, v. 18, p. 489-522, 1987.
- BALLARD, J. W.; WHITLOCK, M. The incomplete natural history of mitochondria. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 729-744, 2004.

- BARGUES, M. D.; KLISIEWICZ, D. R.; GONZALEZ-CANDELAS, F.; RAMSEY, J.; MONROY, C.; PONCE, C.; SALAZAR-SCHETTINO, P. M.; PANZERA, F.; ABAD-FRANCH, F.; SOUSA, O. E.; SCHOFIELD, C. J.; DUJARDIN, J. P.; GUHL, F.; MAS-COMA, S. Phylogeography and genetic variations of *Triatoma dimidiata*, the main Chagas disease vector in Central America, and its position within the genus *Triatoma*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2: e233, 2008.
- BARGUES, M. D.; MARCILLA, A.; DUJARDIN, J. P.; MAS-COMA, S. **Triatominae vectors of Chagas disease**: a molecular perspective based on nuclear ribosomal DNA markers. In: Alvar, J., Baker, J.R. (Eds.), *Molecular Tools for Epidemiological Studies and Diagnosis of Leishmaniasis and Selected Other Parasitic Diseases*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 96, p. 159–164, 2002.
- BARGUES, M. D.; MARCILLA, A.; RAMSEY, J. M.; DUJARDIN, J. P.; SCHOFIELD, C. J.; MAS-COMA, S. Nuclear rDNA-based molecular clock of the evolution of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vectors of Chagas' disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 567–573, 2000.
- BARRETTO, M. P. Ecologia de triatomíneos e transmissão do *Trypanosoma cruzi*, com especial referência ao Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 6, p. 339-353, 1976.
- BELISÁRIO, C. J.; D'ÁVILA PESSOA, G. C.; DIOTAIUTI, L. Biological aspects of crosses between *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) and *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964 (Hemiptera: Reduviidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 517-521, 2007.
- BERMUDEZ, J.; DAVIES, C.; SIMONAZZI, A.; REAL, J. P.; PALMA, S. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta Tropica**, v. 156, p. 1–16, 2016.
- BERN, C. Chagas' Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 373, p. 456-466, 2015.
- BICKFORD, D.; LOHMAN, D. J.; SODHI, N. S.; NG, P. K. L.; MEIER, R.; WINKER, K.; INGRAM, K. K.; DAS, I. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 22, p. 148-155, 2007.
- CAMPOS-SOTO, R.; PANZERA, F.; PITA, S.; LAGES, C.; SOLARI, A.; BOTTO-MAHAN, C. Experimental crosses between *Mepraia gajardoi* and *M. spinolai* and hybrid chromosome analyses reveal the occurrence of several isolation mechanisms. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 45, p. 205-212, 2016.
- CARCAVALLO, R. U.; GALÍNDEZ-GIRÓN, I.; JURBERG, J.; LENT, H. **Atlas of Chagas disease vectors in the Americas/Atlas dos vetores da doença de Chagas nas Américas**, Editora Fiocruz, 1999.
- CARVALHEIRO, J. R.; BARRETTO, M. P. Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. LX – Tentativas de cruzamento de *Rhodnius prolixus* Stal, 1859 com *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 (Hemiptera, Reduviidae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 18, p. 17-23, 1976.

- CARVALHO, P. H. **Análises filogenéticas e filogeográficas do complexo de espécies *Hypostomus ancistroides* (Siluriformes: Loricariidae)**. 2011. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/41/41131/tde-23092011-112658/pt-br.php>. Acesso: 17 de dezembro de 2019.
- CASTRO, G. B.; MACHADO, E. M. M.; BORGES, E. C.; LOROSA, E. S., ANDRADE, R. E; DIOTAIUTI, L.; AZEREDO, B. V. M. *Trypanosoma cruzi* Peridomiciliar Transmission by *Triatoma sordida* in the Municipality of Patis, Gerais State, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, p. 434, 1997.
- CERQUEIRA, R. L. **Estudos sobre populações de triatomíneos silvestres encontrado em Santo Inácio – Bahia**. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 68p, 1982.
- CHAGAS, C. R. J. Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen, n. sp, agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159-218, 1909.
- CORRÊA, R. R.; ESPÍNOLA, H. Descrição de *Triatoma maculata*, nova espécie de triatomíneo de Sobral, Ceará (Hemiptera, Reduviidae). **Arquivos de Higiene e Saúde Pública**, v. 29, p. 115-127, 1964.
- 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. Crossing experiments confirm *T. sherlocki* as a member of the *Triatoma brasiliensis* species complex. **Acta Tropica**, v. 128, p. 162-167, 2013.
- COSTA, J.; ALMEIDA, C. E.; DUJARDIN, J. P.; BEARD, C. B. Crossing Experiments Detect Genetic Incompatibility among Populations of *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Heteroptera, Reduviidae, Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 637-639, 2003.
- COURA, J. R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions-a comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, p. 277–282, 2015.
- CRACRAFT, J. **Species concepts and speciation analysis**. In: JOHNSTON, R. F. (Ed.). Current ornithology. vol. 1. Boston: Springer, 1983. cap. 6, p. 159-187.
- DALE, C.; JUSTI, S. A.; GALVÃO, C. *Belminus santosmalletae* (Hemiptera: Heteroptera: Reduviidae): New Species from Panama, with an Updated Key for *Belminus* Stål, 1859 Species. **Insects**, n. 12, v. 686, p. 1-12, 2021.
- DARRIBA, D.; TABOADA, G. L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, v. 9, n. 8, p. 1-4, 2012.
- DE QUEIROZ, K. Species concepts and species delimitation. **Systematic Biology**, v. 56, n. 6, p. 879-886, 2007.

- DE VAIO, E. S.; GRUCCI, B.; CASTAGNINO, A. M.; FRANCA, M. E.; MARTINEZ M. E. Meiotic differences between three triatomine species (Hemiptera: Reduviidae). **Genetica**, v. 67, p. 185-191, 1985.
- DIAS, E.; LARANJA, F. S.; NOBREGA, G. Doença de Chagas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 42, n. 3, p. 495–581, 1945.
- DIAS, F. B. S.; JARAMILLO-O, N.; DIOTAIUTI, L. Description and characterization of the melanic morphotype of *Rhodnius nasutus* Stål 1859 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, p. 637–641, 2014.
- DIAS, J. C. P.; RAMOS, A. N.; GONTIJO, E. D.; LUQUETTI, A.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; COURA, J. R. et al. 2nd Brazilian Consensus on Chagas disease, 2015. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, p. 3–60, 2016.
- DÍAZ, S.; PANZERA, F.; JARAMILLO-O, N.; PÉREZ, R.; FERNÁNDEZ, R.; VALLEJO, G.; SALDAÑA, A.; CALZADA, J. E.; TRIANA, O.; GÓMEZ-PALÁCIO, A. Genetic, Cytogenetic and Morphological Trends in the Evolution of the *Rhodnius* (Triatominae: Rhodniini) Trans-Andean Group. **PLoS ONE**, v. 9, p. e87493, 2014.
- DIOTAIUTI, L.; CARNEIRO, M.; LOIOLA, C. C. P.; SILVEIRA NETO, H. V.; COUTINHO, R. M.; DIAS, J. C. P. Alternativa de controle do *Triatoma sordida* no triângulo mineiro. I. Borrifação parcial (intradomicílio) no município de Douradoquara, MG, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 21, p. 199-203, 1988.
- DIOTAIUTI, L.; LOIOLA, C. F.; FALCÃO, P. L.; DIAS, J. C. P. The ecology of *Triatoma sordida* in natural environments in two different regions of the state of Minas Gerais, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.35, n. 03, p. 237-245, 1993.
- DIOTAIUTI, L.; PEREIRA, A. S.; LOIOLA, C. F.; FERNANDES, A. J.; SCHOFIELD, J. C.; DUJARDIN, J. P.; DIAS, J. C. P.; CHIARI, E. Inter-relation of sylvatic and domestic transmission of *Trypanosoma cruzi* in areas with and without domestic vectorial transmission in Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 90, p. 443-448, 1995.
- DOBZHANSKY, T. **Genetics of the Evolutionary Process**, New York: Columbia University Press, pp. 71-93, 1970.
- DONOGHUE, M. J. A critique of the biological species concept and recommendations for a phylogenetic alternative. **Bryologist**, v. 88, n. 3, p. 172-181, 1985.
- DORN, P. L.; CALDERON, C.; MELGAR, S.; MOGUEL, B.; SOLORZANO, E.; DUMONTEIL, E.; RODAS, A.; DE LA RUA, N.; GARNICA, R.; MONROY, C. Two Distinct *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) Taxa Are Found in Sympatry in Guatemala and Mexico. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, n. 3, v. 3: e393, 2009.
- DORN, P. L.; JUSTI, S. A.; DALE, C.; STEVENS, L.; GALVÃO, C.; LIMA-CORDÓN, R.; MONROY, C. Description of *Triatoma mopan* sp. n. from a cave in Belize (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Zookeys**, v. 775, p. 69-95, 2018.

DUJARDIN, J. P.; SCHOFIELD, J.; PANZERA, F. Los vectores de la enfermedad de Chagas. **Académie Royale des Sciences d'Outre-Mer**, 2002.

ESPÍNOLA, H. N. Reproductive isolation between *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 and *Triatoma petrochii* Pinto & Barretto, 1925 (Hemiptera Reduviidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 31, p. 277-281, 1971.

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

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, p. 479-491, 1992.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, p. 783-791, 1985.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. EMPRAPA-CENARGEN, 200 p., 1998.

FORATTINI, O. P.; FERREIRA, O. A.; RABELLO, E. X.; BARATA, J. M.; SANTOS, J. L. F. Aspectos ecológicos da tripanossomíase americana. XVII. Desenvolvimento da domiciliação triatomínea regional, em centro de endemismo de *Triatoma sordida*. **Revista de Saúde Pública**, v. 17, p. 159-199, 1983.

FORATTINI, O. P.; FERREIRA, O. A.; ROCHA E SILVA, E. O.; RABELLO, E. X. Aspectos ecológicos da Tripanossomíase americana. VI. Persistência do *Triatoma sordida* após alteração ambiental e suas possíveis relações com a dispersão da espécie. **Revista de Saúde Pública**, v. 8, p. 265-82, 1974.

FORATTINI, O. P.; FERREIRA, O. A.; ROCHA e SILVA, E. O.; RABELLO, E. X. Aspectos ecológicos da Tripanossomíase Americana. VII. Permanência e mobilidade do *Triatoma sordida* em relação aos ecótopos artificiais. **Revista de Saúde Pública**, v. 9, p. 467-476, 1975.

FORATTINI, O. P.; ROCHA e SILVA, E. O. R.; FERREIRA, O. A.; RABELLO, E. X.; PATTOLI, D. G. B. Aspectos ecológicos da tripanossomose americana. III — Dispersão local de triatomíneos, com especial referência ao *Triatoma sordida*. **Revista de Saúde Pública**, v. 5, p. 193-205, 1971.

FRANCA-RODRÍGUEZ, M. E.; YONG, D. G.; LOZANO, M. Estudio sobre los descendientes entre *Triatoma infestans* (Klug, 1834) y *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843, (Hemiptera, Reduviidae). **Revista de Biología do Uruguay**, v. 7, p. 101-115, 1979.

FRANCO, D. P. **Autodescobrimento**: Uma busca interior (Série Psicológica Joanna de Ângelis Livro 6). Salvador: Leal Livraria, 143 p., 2018.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Introduction to conservation genetics**. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2010. 618 p.

- FUTUYMA, D. J. **The origin of genetic variation**. In: _____ (Ed.). *Evolution*. Sunderland: Sinauer Associates, 2005. p. 161-188.
- GALÍNDEZ, G. I.; BARAZARTE, R.; MÁRQUEZ, J.; OVIEDO, M.; MÁRQUEZ, Y.; MORÓN, L.; CARCAVALLO, R. U. Relaciones reproductivas entre *Rhodnius prolixus* Stal y *Rhodnius robustus* Larrousse (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) bajo condiciones de laboratorio. **Entomología y Vectores**, v. 1, p. 3-13, 1994.
- GARCÍA, M.; MENES, M.; DORN, P. L.; MONROY, C.; RICHARDS, B.; PANZERA, F.; BUSTAMANTE, D. M. Reproductive isolation revealed in preliminary crossbreeding experiments using field collected *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) from three ITS-2 defined groups. **Acta Tropica**, v. 128, p. 714-718, 2013.
- GALVÃO, C. **Vetores da doença de Chagas no Brasil** – Série Zoologia: Guias e Manuais de Identificação. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 288 p., 2014.
- GALVÃO, C. Taxonomia dos Vetores da Doença de Chagas da Forma à Molécula, quase três séculos de história. In: OLIVEIRA, J.; ALEVI, K. C. C.; CAMARGO, L. M. A.; MENEGUETTI, D. U. O. (org.). **Atualidades em Medicina Tropical no Brasil: Vetores**. Stricto Sensu: Rio Branco, 2020, pp. 9-37.
- GARCÍA, B. A.; POWELL, J. R. Phylogeny of species of *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae) based on mitochondrial DNA sequences. **Journal of Medical Entomology**, v. 35, p. 232-238, 1998.
- GARDIM, S.; ALMEIDA, C. E.; TAKIYA, D. M.; OLIVEIRA, J.; ARAÚJO, R. F.; CICARELLI, R. M. B.; ROSA, J. A. 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**, v. 23, p. 74-79, 2014.
- GONZÁLEZ-BRÍTEZ, N. Population dynamics of triatomines (Hemiptera: Reduviidae) related to *Trypanosoma cruzi* in Paraguay with emphasis on *Triatoma sordida*. **Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud**, v. 11, n. 2, p. 105-11, 2013.
- GONZÁLEZ-BRÍTEZ, N.; CARRASCO, H. J.; PURROY, C. E. M.; FELICIANGELI, M. D.; MALDONADO, M.; LÓPEZ, E.; SEGOVIA, M. J.; ARIAS, A. R. Genetic and morphometric variability of *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) from the eastern and western areas of Paraguay. **Frontiers in Public Health**, v. 2, n. 149, p. 1-9, 2014.
- GORLA, D. E.; JURBERG, J.; CATALÁ, S. S.; SCHOFIELD, C. J. Systematics of *Triatoma sordida*, *T. guasayana* and *T. patagonica* (Hemiptera, Reduviidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 88, p. 379-385, 1993.
- GRAND, W. S.; BOWEN, B.W. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity*, v. 89, p. 415-426, 1998.
- GUERRA, A. L. **Análise molecular do subcomplexo Brasiliensis (Hemiptera, Triatominae)**. 2016. Disponível em: <<http://repositorio.unesp.br/handle/11449/136463>>. Acesso: 18 de dezembro de 2019.

- 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. Revisiting the homoploid hybrid speciation process of the *Triatoma brasiliensis macromelasoma* Galvão, 1956 (Hemiptera, Triatominae) using cytogenetic and molecular markers. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 4, p. 911-913, 2019.
- GURGEL-GONÇALVES, R.; GALVAO, C.; COSTA, J.; PETERSON, A. T. Geographic distribution of Chagas disease vectors in Brazil based on ecological niche modeling. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, 2012.
- GURGEL-GONCALVES, R.; KOMP, E.; CAMPBELL, L. P.; KHALIGHIFAR, A.; MELLEBRUCH, J.; MENDONÇA, V. J.; OWENS, H. L.; DE LA CRUZ FELIX, K.; PETERSON, A. T.; RAMSEY, J. M. Automated identification of insect vectors of Chagas disease in Brazil and Mexico: the Virtual Vector Lab. **PeerJ – Life & Environment**, 5:e3040, 2017.
- GUSTAFSSON, A. L. S.; SKREDE, I.; ROWE, H. C.; GUSSAROVA, G.; BORGÉN, L.; RIESEBERG, L. H.; BROCHMANN, C.; PARISOD, C. Genetics of cryptic speciation within an arctic mustard, *Draba nivalis*. **PLoS One**, v. 9, p. e93834, 2014.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.
- HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Princípios de Genética de Populações**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 660 p.
- HEITZMANN-FONTENELLE, T. Bionomia comparativa de triatomíneos. VI - Híbridos de *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 x *Triatoma lenti*, Sherlocki & Serafim, 1967 (Hemiptera, Reduviidae). **Memórias do Instituto Butantan**, v. 47, p. 175-181, 1984.
- HERSHKOVITZ, M.A.; LEWIS, L. A. Deep-level diagnostic value of the rDNA-ITS region. **Molecular Biology and Evolution**, v. 13, n. 9, p. 1276-1295, 1996.
- HILLIS, D. M.; MORITZ, C.; MABLE, B. K. **Molecular Systematics**. Massachusetts: Sinauer Associates, 655 p. 1996.
- HOBEL, G.; GERHARDT, H. C. Reproductive character displacement in the acoustic communication system of green frogs (*Hyla cinerea*). **Evolution**, v. 57, p. 894-904, 2003.
- HOLLANDER, J.; SMADJA, C. M.; BUTLIN, R. K.; REID, D. G. Genital divergence in sympatric sister snails. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 26, p. 210-215, 2013.
- HOTEZ, P. J.; FUJIWARA, R. T. Brazil's neglected tropical diseases: an overview and a report card. **Microbes and Infection**, v. 16, p. 601-606, 2014.
- HOTEZ, P. J. The giant anteater in the room: Brazil's neglected tropical diseases problem. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v.2, e177, 2008.

- HOWARD, E. J.; XIONG, X.; CARLIER, Y.; SOSA-ESTANI, S.; BUEKENS, P. Frequency of the Congenital Transmission of *Trypanosoma cruzi*: A Systematic Review and Meta-Analysis. **BJOG**, v. 121, n. 1, p. 22–33, 2015.
- HYPISA, V.; TIETZ, D.; ZRZAVY, J.; REGO, R. O.; GALVÃO, C.; JURBERG, J. Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the asiatic clade. **Molecular Phylogenetic and Evolution**, v. 23, p. 447-457, 2002.
- JOBST, J.; KING, K.; HEMLEBEN, V. Molecular evolution of the internal transcribed spacer (ITS1 and ITS2) and phylogenetic relationship among species of the family Cucurbitaceae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 9, n. 2, p. 204-219, 1998.
- JORGENSEN, R.; CLUSTER, P. Modes and tempos in the evolution of nuclear ribosomal DNA: new characters for evolutionary studies and new markers for genetic and population studies. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 75, p. 1238–1247, 1988.
- JURBERG, J.; GALVÃO, C.; LENT, H.; MONTEIRO, F.; LOPES, M. C.; PANZERA, F.; PÉREZ, R. Revalidação de *Triatoma garciabesi* Carcavallo, Cichero, Martínez, Prozen & Ronderos, 1967 (Hemiptera, Reduviidae). **Entomologia y Vectores**, v. 5, p. 107-122, 1998.
- JUSTI, S. A.; GALVÃO, C.; SCHRAGO, C. G. Geological Changes of the Americas and their Influence on the Diversification of the Neotropical Kissing Bugs (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, p. 1-22, 2016.
- JUSTI, S. A.; RUSSO, C. A.; MALLET, J. R. S.; OBARA, M. T., GALVÃO, C. Molecular phylogeny of Triatomini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 149, 2014.
- KIMURA, M. J. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies do nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, n. 2, p. 111-120, 1980.
- KNOWLTON, N. Sibling species in the sea. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 24, p. 189-216, 1993.
- LEE, C. R.; MITCHELL-OLDS, T. Quantifying effects of environmental and geographical factors on patterns of genetic differentiation. **Molecular Ecology**, v. 20, p. 4631–4642, 2011.
- LENT, H.; WYGODZYNSKY, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera – Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas’ disease. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 163, p. 123520, 1979.
- LIMA-CORDÓN, R. A.; MONROY, M. C.; STEVENS, L.; RODAS, A.; RODAS, G. A.; DORN, P. L.; JUSTI, S. A. Description of *Triatoma huehuetenanguensis* sp. n., a potential Chagas disease vector (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **ZooKeys**, v. 820, p. 51-70, 2019.
- LINDOSO, J. A. L.; LINDOSO, A. A. B. Neglected tropical diseases in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, p. 247-253, 2009.

- LOROSA, E. S.; ANDRADE, R. E.; PEREIRA, C. A.; SANTOS, S. M.; JURBERG, J. Estudo das fontes alimentares *Triatoma sordida* (Stal, 1859) do Estado do Mato Grosso do Sul através da comparação das técnicas de precipitina e imunodifusão dupla. **Entomologia y Vectores**, v. 6, p. 156-165, 1999a.
- LOROSA, E. S.; ANDRADE, R. E.; PEREIRA, C. A.; SANTOS, S. M.; JURBERG, J. Identificação das fontes alimentares de *Triatoma sordida* (Stal, 1859), (Hemiptera Reduviidae) na região norte de Goiás, Brasil, através da técnica de precipitina. **Entomologia y Vectores**, v. 6, p. 291-304, 1999b.
- LOROSA, E. S.; BULHÕES, D. M.; CUNHA, V.; ANDRADE, R. E.; FIGUEREDO, J. F.; JURBERG, J. Study on the Feeding Behavior of *Triatoma Sordida* (Stal 1859) (Hemiptera – Reduviidae) Captured in Mato Grosso State Brazil using the precipitin technique and degree of infectivity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 250, 1999c.
- LOROSA, E. S.; CAHET, D. M. B.; ANDRADE, R. E.; FIGUEIREDO, J. F.; JURBERG, J. O uso da técnica de precipitação no estudo do comportamento alimentar e grau de infectividade em *Triatoma Sordida* (Stal, 1859) (Hemiptera – Reduviidae), coletados no estado de Mato Grosso, Brasil. **Entomologia y Vectores**, v. 7, p. 227-237, 2000.
- MACCHIAVERNA, N. P.; GASPE, M. S.; ENRIQUEZ, G. F.; TOMASSONE, L.; GÜRTLER, R. E.; CARDINAL, M. V. *Trypanosoma cruzi* infection in *Triatoma sordida* before and after community-wide residual insecticide spraying in the Argentinean Chaco. **Acta Tropica**, v. 143, p. 97-102, 2015.
- MADEIRA, F. F.; REIS, Y. V.; BITTINELLI, I. F.; DELGADO, L. M. G.; OLIVEIRA, J.; MENDONÇA, V. J.; MOREIRA, F. F. F.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V.; ALEVI, K. C. Genetic structure of Brazilian populations of *Triatoma sordida* (Stål, 1859) (Hemiptera, Triatominae) by means of chromosomal markers. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, p. 907-910, 2019.
- MARCILLA, A.; BARGUES, M. D.; RAMSEY, J. M.; MAGALLON-GASTELUM, E.; SCHETTINO, P. M. S.; ABAD-FRANCH, F.; DUJARDIN, J. P.; SCHOFIELD, C. J.; MASCOMA, S. The ITS-2 of the nuclear rDNA as a molecular marker for populations, species, and phylogenetic relationships in Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vectors of Chagas' disease. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 18, p. 136-142, 2001.
- MARTÍNEZ-IBARRA, J. A.; GRANT-GUILLÉN, Y.; DELGADILLO-ACEVES, I. N.; ZUMAYA-ESTRADA, F. A.; ROCHA-CHÁVEZ, G.; SALAZAR-SCHETTINO, P.M.; ALEJANDRE-AGUILAR, R.; VILLALOBOS, G.; NOGUEDA-TORRES, B. Biological and genetic aspects of crosses between phylogenetically close species of Mexican Triatomines (Hemiptera: Reduviidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 48, p. 705-707, 2011.
- MARTÍNEZ-IBARRA, J. A.; MORALES-CORONA, Z. Y.; MORENO-RUIZ, M. G.; DEL RIEGO-RUIZ, R.; MUNDO-BARAJAS, M. A. Híbridos naturales y fértiles entre especies del complejo *Meccus phyllosomus* (Hemiptera: Reduviidae) en Jalisco, México. **Entomological Society of Mexico**, v. 4, p. 734-738. 2005.

- MARTÍNEZ-IBARRA, J. A.; NOGUEDA-TORRES, B.; GARCÍA-LIN, J. C.; ARROYO-REYS, D.; SALAZAR-MONTAÑO, L. F.; HERNÁNDEZ-NAVARRO, J. A.; DÍAZ-SNCHES, C. G.; TORO-ARREOLA, E. S.; ROCHA-CHÁVEZ, G. Importance of Hybrids of *Meccus phyllosomus mazzottii*, and *M. p. pallidipennis*, and *M. p. phyllosomus* to the Transmission of *Trypanosoma cruzi* in Mexico. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 69, p. 202-206, 2016b.
- MARTÍNEZ-IBARRA, J. A.; NOGUEDA-TORRES, B.; SALAZAR-SCHETTINO, P. M.; CABRERA-BRAVO, M.; VENCES-BLANCO, M. O.; ROCHA-CHAVEZ, G. Transmission Capacity of *Trypanosoma cruzi* (Trypanosomatida: Trypanosomatidae) by Three Subspecies of *Meccus phyllosomus* (Hemiptera: Reduviidae) and Their Hybrids. **Medical and Veterinary Entomological**, v. 53, p. 928-934, 2016a.
- MARTÍNEZ-IBARRA, J.A.; VENTURA-RODRÍGUEZ, L.V.; MEILLON-ISAIS, K.; BARAJAS-MARTÍNEZ, H.; ALEJANDRE-AGUILAR, R.; LUPERCIORONEL, P.; ROCHA-CHÁVEZ, G.; NOGUEDA-TORRES, B. Biological and genetic aspects of experimental hybrids from species of the *Phyllosoma complex* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 236-243, 2008.
- MARTINS-MELO, F. R.; RAMOS JR, A. N.; ALENCAR, C. H.; HEUKELBACH, J. Mortality due to Chagas disease in Brazil from 1979 to 2009: trends and regional differences. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 6, p. 817–824, 2012.
- MARTINS-MELO, F. R.; RAMOS JR, A. N.; ALENCAR, C. H.; HEUKELBACH, J. Mortality from neglected tropical diseases in Brazil, 2000-2011. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 94, p. 103-110, 2016.
- MAS-COMA, S.; BARGUES, M. D. Populations, hybrids and the systematic concepts of species and subspecies in Chagas disease triatomine vectors inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA. **Acta tropica**, v. 110, p. 112-136, 2009.
- MAYDEN, R. L. **A hierarchy of species concepts**: the denouement in the saga of the species problem. In: CLARIDGE, M. F.; DAWAH, H. A.; WILSON, M. R. (Ed.). *Species: the units of biodiversity*. London: Chapman & Hall, 1997. cap. 19, p. 381-423.
- MAYR, E. **Animal Species and Evolution**. Harvard University Press, Cambridge, 1963.
- MAZZOTTI, L.; OSORIO, M. T. Resultados obtenidos en cruzamientos con especies diferentes de *Triatoma*. **Revista da Faculdade de Bogotá**, 10: 159-160, 1941.
- MAZZOTTI, L.; OSORIO, M. T. Cruzamientos experimentales entre varias especies de triatomas. *Medicina*, v. 22, p. 215-222, 1942.
- MENDONÇA, V. J.; ALEVI, K. C. C.; MEDEIROS, L. M. O.; NASCIMENTO, J. D.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V.; ROSA, J. A. 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**, v. 26, p. 123-131, 2014.

- MENDONÇA, V. J.; ALEVI, K. C. C.; PINOTTI, H.; GURGEL-GONGALVES, R.; PITA, S.; GUERRA, A. L.; PANZERA, F.; ARAÚJO, R. F.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V.; ROSA, J. A. Revalidation of *Triatoma bahiensis* Sherlock & Serafim, 1967 (Hemiptera: Reduviidae) and phylogeny of the *T. brasiliensis* species complex. **Zootaxa**, v. 4107, p. 239-254, 2016.
- MENDONÇA, V. J.; SILVA, M. T. A.; ARAÚJO, R. F.; JÚNIOR, J. M.; JÚNIOR, M. B.; ALMEIDA, C. E.; COSTA, J.; GRAMINHA, M. A. S.; CICARELLI, R. M. B.; ROSA, J. A. Phylogeny of *Triatoma sherlocki* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) Inferred from two mitochondrial genes suggests its location within the *Triatoma brasiliensis* Complex. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 5, p. 858-864, 2009.
- MISHLER, B. D. The morphological, developmental, and phylogenetic basis of species concepts in bryophytes. **Bryologist**, v. 88, n. 3, p. 207-214, 1985.
- MONTEIRO, F. A.; DONNELLY, M. J.; BEARD, C. B.; COSTA, J. Nested clade and phylogeographic analyses of the Chagas disease vector *Triatoma brasiliensis* in Northeast Brazil. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 32, n. 1, p. 46-56, 2004.
- MONTEIRO, F. A.; ESCALANTE, A. A.; BEARD, C. B. Molecular tools and triatomine systematics: a public health perspective. **Trends in Parasitology**, v.17, p. 344–347, 2001.
- MONTEIRO, F. A.; JURBERG, J.; LAZOSKI, C. Very Low Levels of Genetic Variation in Natural Peridomestic Populations of the Chagas Disease Vector *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) in Southeastern Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 2, p. 223-227, 2009.
- MONTEIRO, F. A.; PEREZ, R.; PANZERA, F.; DUJARDIN, J. P.; GALVAO, C.; ROCHA, D.; NOIREAU, F.; SCHOFIELD, C.; BEARD, C. B. Mitochondrial DNA variation of *Triatoma infestans* populations and its implication on the specific status of *T. melanosoma*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 229-238, 1999.
- NASCIMENTO, J. D.; RAVAZI, A.; ALEVI, K. C. C.; PARDO-DIAZ, C.; SALGADO-ROA, F. C.; ROSA, J. A.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V.; OLIVEIRA, J.; HERNÁNDEZ, C.; SALAZAR, C.; RAMÍREZ, J. D. 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**, v. 14, e0211285, 2019.
- NATTERO J., PICCINALI R.M., LOPES C.M., HERNANDEZ M.L.; ABRAHAN L; LOBBIA P.A.; RODRÍGUEZ C.S., CARBAJAL-DE-LA-FUENTE N.A. Morphometric variability among the species of the Sordida subcomplex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae): evidence for differentiation across the distribution range of *Triatoma sordida*. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 412, p.1-14, 2017.
- NELSON, G.; PLATNICK, N. I. **Systematics and biogeography**: cladistics and vicariance. New York: Columbia University Press, 1981. xi+567 pp.

- NEVES, J. M. S.; SOUZA, P. S.; OLIVEIRA, J.; RAVAZI, A.; MADEIRA, F. F.; REIS, Y. V.; BORTOLOZO, A. B.; PINOTTI, H.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V.; ROSA, J. A.; ALEVI, K. C. C. Prezygotic isolation confirms the exclusion of *Triatoma melanocephala*, *T. vitticeps* and *T. tibiamaculata* of the *T. brasiliensis* subcomplex (Hemiptera, Triatominae). **Infection, Genetics and Evolution**, v. 79, p. 104149, 2020.
- NIXON, K. C.; WHEELER, Q. D. An amplification of the phylogenetic species concept. **Cladistics**, v. 6, n. 3, p. 211-223, 1990.
- NOIREAU, F.; GUTIERREZ, T.; ZEGARRA, M.; FLORES, R.; BRENIÈRE, F.; CARDOZO, L.; DUJARDIN, J. P. Cryptic speciation in *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) from the bolivian Chaco. **Tropical Medicine & International Health**, v. 3, n. 5, p. 364-372, 1998.
- NOUVELLET, P.; CUCUNUBÁ, Z. M.; GOURBIÈRE, S. Ecology, Evolution and Control of Chagas Disease: A Century of Neglected Modelling and a Promising Future. **Advances in Parasitology**, v. 87, p. 135–191, 2015.
- OLIVEIRA, A. B. B. **Citotaxonomia de *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) e influência desse agente etiológico nas células de *Triatoma infestans* (Klug, 1834)**. 2020. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/193512>>. Acesso em: 30 de junho de 2021.
- OLIVEIRA, A. W.; SILVA, I. G. Distribuição geográfica e indicadores entomológicos de triatomíneos sinantrópicos capturados no Estado de Goiás. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p. 204-208, 2007.
- OLIVEIRA, J.; ALEVI, K. C. C. Taxonomic status of *Panstrongylus herreri* Wygodzinsky, 1948 and the number of Chagas disease vectors. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, p. 434-435, 2017.
- OLIVEIRA, J.; AYALA, J. M.; JUSTI, S. A.; ROSA, J. A.; GALVÃO, C. 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**, v. 43, p. 148-157, 2018.
- ONYABE, D. Y.; CONN, J. E. Intragenomic heterogeneity of a ribosomal DNA spacer (ITS2) varies regionally in the neotropical malaria vector *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae). **Insect Molecular Biology**, v. 8, p. 435–442, 1999.
- PADILLA, N. A.; MONCAYO, A. L.; KEIL, C. B.; GRIJALVA, M. J.; VILLACÍS, A. G. Life Cycle, Feeding, and Defecation Patterns of *Triatoma carrioni* (Hemiptera: Reduviidae), under Laboratory Conditions. **Journal of Medical Entomology**, v. 56, n. 3, p. 617-624, 2019.
- PAHO. **Chagas in the Americas**. 2017. Disponível em: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=13566:chagas-in-americas&Itemid=40721&lang=pt. Acesso: 15 de junho de 2020.
- PANZERA, F.; DUJARDIN, J. P.; NICOLINI, P.; CARACCIO, M. N.; ROSE V.; TELLEZ, T. Genomic changes of Chagas disease vector, South America. **Emerging Infection Disease**, v. 10, p. 438-446, 2004.

- PANZERA, F.; HORNOS, S.; PERERA, J.; CESTAU, R.; CANALE, D.; DIOTAIUTI, L.; DUJARDIN, J. P.; PEREZ, R. Genetic variability and geographic differentiation among three species of triatomine bugs (Hemiptera-Reduviidae). **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 57, p. 732-739, 1997.
- PANZERA, F.; PITA, S.; NATTERO, J.; PANZERA, Y.; GALVÃO, C.; CHAVEZ, T.; CHAVEZ, T.; DE ARIAS, A. R.; TÉLLEZ, L. C.; NOIREAU, F. Cryptic speciation in the *Triatoma sordida* subcomplex (Hemiptera, Reduviidae) revealed by chromosomal markers. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 1, 2015.
- PAVAN, M. G.; MONTEIRO, F. A multiplex PCR assay that separates *Rhodnius prolixus* from members of the *Rhodnius robustus* cryptic species complex (Hemiptera: Reduviidae). **Tropical Medicine & International Health**, v. 12, p. 751-758, 2007.
- PELLI, A.; DA SILVA, M. A.; SARMENTO, F. R.; MARTINS, E.; DA MATA, S. A.; DOMINGUES, M. A.; RAMIREZ, L. E. Population parameters for *Triatoma sordida* Stal, 1859: the most frequent vector for Chagas disease in the Triangulo Mineiro (Heteroptera, Triatominae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p. 25-28, 2007.
- PÉREZ DE ROSAS, A. R.; SEGURA, E. L.; FICHERA, L.; GARCIA, B. A. Macrogeographic and microgeographic genetic structure of the Chagas disease vector *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Catamarca, Argentina. **Genetica**, v. 133, n. 3, p. 247-60, 2008.
- PÉREZ DE ROSAS, A. R.; SEGURA, E. L.; GARCÍA, B. A. Microsatellite analysis of genetic structure in natural *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) populations from Argentina: its implication in assessing the effectiveness of Chagas disease vector control programmes. **Molecular Ecology**, v. 16, n. 7, p. 1401-12, 2007.
- PÉREZ, R.; HÉRNANDEZ, M.; QUINTERO, O.; SCVORTZOFF, E.; CANALE, D.; MÉNDEZ, L.; COHANOFF, C.; MARTINO, M.; PANZERA, F. Cytogenetic analysis of experimental hybrids in species of Triatominae (Hemiptera-Reduviidae). **Genetica**, v. 125, p. 261-270, 2005.
- PESSOA, G. C. D. A.; OBARA, M. T.; REZENDE, J. C.; DE MELLO, B. V.; FERRAZ, M. L.; DIOTAIUTI, L. Deltamethrin toxicological profile of peridomestic *Triatoma sordida* in the North of Minas Gerais, Brazil. **Parasites and Vectors**, v. 08, p. 263-269, 2015.
- PESSOA, G. C. D. A.; SOUSA, T. N. D.; SONODA, I. V.; DIOTAIUTI, L. Assessing the mitochondrial DNA diversity of the Chagas disease vector *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 5, p. 322-329, 2016.
- PINTO, C. Classification de genres d'hémiptères de la famille Triatomidae (Reduviidae). **Boletim Biológico**, v. 8, p. 103-114, 1927.
- PIRES, H. H. R.; BORGES, E. C.; LOROSA, E. S.; ANDRADE, R. E.; DIOTAIUTI, L. Peridomiciliary infestation of *Triatoma sordida* in the municipality of Serra do Ramalho, Bahia state, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, p. 431, 1997.

- PITA, S.; LORITE, P.; NATTERO, J.; GALVÃO, C.; ALEVI, K. C. C.; TEVES, S. C.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V.; PANZERA, F. New arrangements on several species subcomplexes of *Triatoma* genus based on the chromosomal position of ribosomal genes (Hemiptera-Triatominae). **Infection, Genetics and Evolution**, v. 43, p. 225-231, 2016.
- POINAR G. A primitive triatomine bug, *Paleotriatoma metaxytaxa* gen. et sp. nov. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), in mid-Cretaceous amber from northern Myanmar. **Cretaceous Research**, v. 93, p. 90-97, 2019.
- RAMBAUT, A. **FigTree** – Tree Figure Drawing Tool Version v.1.4.3. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/>, 2016.
- RAMBAUT, A.; SUCHARD, M. A.; XIE, W.; DRUMMOND, A. J. **Tracer** – MCMC Trace Analysis Tool Version v. 1.6.0. Disponível em: <http://beast.bio.ed.ac.uk/>, 2013.
- RAMOS, L. J.; SOUZA, J. L.; SOUZA, C. R.; OLIVEIRA, J.; ROSA, J. A.; CAMARGO, L. M. A.; CUNHA, R. M.; MENEGUETTI, D. U. O. First report of *Triatoma sordida* Stål, 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) in the State of Acre and Brazilian Western Amazon. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n.1, p. 77-79, 2018.
- RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 275–291, 2012.
- RAVAZI, A. **Estudo sobre hibridização na tribo Rhodniini (Hemiptera, Reduviidae): dinâmica evolutiva, viabilidade reprodutiva, caracterização morfo-molecular e suas implicações taxonômicas**. 2019. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/181029>>. Acesso em: 30 de junho de 2021.
- RIBEIRO JR, G.; SANTOS, C. G. S.; LANZA, F.; REIS, J.; VACCAREZZA, F.; DINIZ, C.; MIRANDA, D. L. P.; ARAÚJO, R. F.; CUNHA, G. M.; CARVALHO, C. M. M.; FONSECA, E. O. L.; SANTOS, R. F.; SOUSA, O. M. F.; REIS, R. B.; ARAÚJO, W. N.; GURGEL-GONÇALVES, R.; REIS, M. G. Wide distribution of *Trypanosoma cruzi*-infected triatomines in the State of Bahia, Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 12, p. 604, 2019.
- RILEY, R. The secondary pairing of bivalents with genetically similar chromosomes. **Nature**, v. 185, p. 751-752, 1966.
- RODERICK, G. K.; CROUCHER, P. J. P.; VANDERGAST, A. G.; GILLESPIE, R. G. Species differentiation on a dynamic landscape: shifts in metapopulation genetic structure using the chronology of the hawaiian archipelago. **Evolutionary Biology**, v. 39, p. 192-206, 2012.
- RODRÍGUEZ-PLANES, L. I.; GASPE, M. S.; ENRIQUEZ, G. F.; GÜRTLER, R. E. Impacts of residual insecticide spraying on the abundance and habitat occupancy of *Triatoma sordida* and co-occurrence with *Triatoma infestans*: A three-year follow-up in northeastern Argentina. **Acta Tropica**, v. 202, 105251, 2020.
- RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, p. 1572-1574, 2003.

- ROSA, J. A.; BARATA, J. M. S.; BARELLI, N.; SANTOS, J. L. F.; BELDA NETO, F. M. Sexual distinction between 5th instar nymphs of six species (Hemiptera: Reduviidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, p. 257-264, 1992.
- ROSEN, D. E. Fishes from the uplands and intermontane basins of Guatemala: revisionary studies and comparative biogeography. **Bulletin American Museum of Natural History**, v. 162, p. 267-376, 1979.
- ROSSI, J. C. N.; DUARTE, E. C.; GURGEL-GONÇALVES, R. Factors associated with the occurrence of *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) in rural localities of Central-West Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, p. 192-200, 2015.
- ROZAS, J.; FERRER-MATA, A.; SÁNCHEZ-DELBARRIO, J. C.; GUIRAO-RICO, S.; LIBRADO, P.; RAMOS-ONSINS, S. E.; SÁNCHEZ-GRACIA, A. Dna SP v6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 34, p. 3299-3302, 2017.
- RYCKMAN, R. E. Biosystematics and hosts of the *Triatoma protracta* complex in North América (Hemiptera: Reduviidae) (Rodentia: Cricetidae). **University California Public Entomology**, v. 27, p. 93-240, 1962.
- SÁEZ, A.; LOZANO, E. Body doubles. **Nature**, v. 433, p. 111, 2005.
- SÁNCHEZ, Z.; GUILLÉN, L.; PINEDA, D.; PAREDES, B.; RUSSOMANDO, G. Técnicas moleculares integradas a la vigilancia entomológica de vectores de la enfermedad de Chagas: Estudio del vector secundario *Triatoma sordida* en la Región Oriental del Paraguay. **Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud**, v. 18, n. 1, p. 76-83, 2020.
- SCHEREIBER, G.; PINHO, A. C.; PARENTONI, R.; SALGADO, A. A.; GODOI JR., T. L. Cytogenetics of Triatominae: II Spermatogenesis in hybrid between *Triatoma infestans* and *Triatoma pseudomaculata* (Hemiptera, Reduviidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 31, p. 1-9, 1974.
- SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia. IV. Differentiation of GC and AT-rich regions in Anura. **Chromosoma**, v. 77, p. 83-103, 1980.
- SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. **Arlequin**: A software for population genetics data analysis. v. 2.000. Genetics and Biometry Lab, Department of Anthropology, University of Geneva, 2000.
- SCHOFIELD, C. J.; GALVÃO, C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. **Acta tropica**, v. 110, n. 2, p. 88-100, 2009.
- SEVERI-AGUIAR, G. D. C.; LOURENÇO, L. B.; BICUDO, H. E. M. C.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Meiosis aspects and nucleolar activity in *Triatoma vitticeps* (Triatominae, Heteroptera). **Genetica**, v. 126, n. 1-2, p. 141-151, 2006.

SILVA, R. A.; SCANDAR, S. A.; PAULIQUÉVIS-JÚNIOR, C.; SAMPAIO, S. M.; RODRIGUES, V. L. Ampliação de raio de pesquisa de triatomíneos na atividade de atendimento às notificações em área de *Triatoma sordida* (Stål, 1859) no Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, p. 339-43, 2005.

SILVEIRA, A. C. Entomological survey (1975-1983). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, suppl. 2, p. 26-32, 2011.

SILVEIRA, A. C.; PEÑARADA-CARRILLO, R.; LOROSA, E. S.; LEITE, J.; VINHAES, M. C.; CASTRO, C.; PRATA, A.; MACÊDO, V. Evaluation of the impact of chemical control measures and entomological surveillance on Chagas' disease in the counties of Mambáí and Buritinópolis, Goiás State, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, 549-557, 2001.

SIMPSON, G. G. The species concept. **Evolution**, v. 5, n. 4, p. 285-298, 1951.

SIQUEIRA, F. F.; SANDES, S. H. C.; CAMPOS, S. H. C.; DA FONSECA, C. G.; MARTINS, R. P.; DRUMOND, M. A.; CARVALHO, M. R. S. Análise filogenética do minhocaçu *Rhinodrilus alatus*, Righi 1971 (glossoscolecidae: annelida) baseada em sequências dos genes de rDNA 5.8S, do espaço interno transcrito (its1) e da subunidade i da citocromo C oxidase mitocondrial. **Acta Zoológica Mexicana**, (n.s.), Especial, p. 1-19, 2010.

SOARES, A. C.; ARAÚJO, R. N.; CARVALHO-TAVARES, J.; GONTIJO, N. F.; PEREIRA, M. H. Intravital microscopy and image analysis of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) hematophagy: The challenge of blood intake from mouse skin. **Parasitology International**, v. 63, n. 1, p. 229-236, 2014.

SORIANO-ARANDES, A.; ANGHEBEN, A.; SERRE-DELCOR, N.; TREVIÑO-MARURI, B.; Gómez I Prat, J.; JACKSON, Y. Control and management of congenital Chagas disease in Europe and other non-endemic countries: current policies and practices. **Tropical Medicine and International Health**, v. 21, n. 5, p. 590-596, 2016.

SOUZA, E. S.; ATZINGEN, N. C. B. V.; FURTADO, M. B.; OLIVEIRA, J.; NASCIMENTO, J. D.; VENDRAMI, D. P.; GARDIM, S.; ROSA, J. A. Description of *Rhodnius marabaensis* sp. n. (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) from Pará State, Brazil. **Zookeys**, v. 621, p. 45-62, 2016.

STRUCK, T. H.; FEDER, J. L.; BENDIKSBY, M.; BIRKELAND, S.; CERCA, J.; GUSAROV, V.; KISTENICH, S.; LARSSON, K. H.; LIOW, L. H.; NOWAK, M. D.; STEDJE, B.; BACHMANN, L.; DIMITROV, D. Finding evolutionary processes hidden in cryptic species. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 33, p. 153-163, 2018.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

TARTAROTTI, E.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V.; CERON, C. R. Vectorial problematic of the Chagas disease. **Arquivos de Ciências da Saúde**, v. 11, n. 1, p. 44-47, 2004.

TARTAROTTI, E.; CERON, C. R. Ribosomal DNA ITS-1 intergenic spacer polymorphism in triatomines (Triatominae, Heteroptera). **Biochemical genetics**, v. 43, n. 7-8, p. 365-373, 2005.

TEMPLETON, A. R. **Genética de populações e teoria microevolutiva**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2011. 705 pp.

THOMPSON, J.; HIGGINS, D.; GIBSON, T. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

UESHIMA, N. Cytotaxonomy of the Triatominae (Reduviidae, Hemiptera). **Chromosoma**, v. 18, p. 97-122, 1966.

URDANETA-MORALES, S. Chagas' disease: an emergent urban zoonosis. The caracas valley (Venezuela) as an epidemiological model. **Frontiers in Public Health**, v. 2, n. 265, p. 1-13, 2014.

USINGER, R. L. **The Triatominae of North and Central America and the West Indies and their Public Health Significance**. Public Health Bulletin, 1944.

USINGER, R. L.; WYGODZINSKY, P.; RYCKMAN, R. E. The Biosystematics of Triatominae. **Annual Review of Entomology**, v. 11, p. 309-329, 1966.

VERMELHO, A. B.; RODRIGUES, G. C.; SUPURAN, C. T. Why hasn't there been more progress in new Chagas disease drug discovery? **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 15, n. 2, p. 145-158, 2020.

WHELAN, S.; LIÒ, P.; GOLDMAN, N. Molecular phylogenetics: state-of-the-art methods for looking into the past. **Trends in Genetics**, v. 17, n. 5, p. 262-272, 2001.

WILEY, E.O. The evolutionary species concept reconsidered. **Systematic Zoology**, v. 27, n. 1, p. 17-26, 1978.

WHO. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Disponível em: <<http://www.who.int/chagas/disease/en>>. Acesso: 14 de maio de 2021, 2020b.

WHO. **Neglected tropical disease**. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/>. Acesso: 14 de maio de 2021, 2020a.

WHO. **Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: Second WHO report on neglected tropical diseases**. Geneva: World Health Organization, 2013.

WHO. **Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: First WHO report on neglected tropical diseases**. Geneva: World Health Organization, 2010.

WRIGHT, S. Vol. 4: **Variability within and among natural populations**. Evolution and the genetics of populations: a treatise in four volumes: University of Chicago Press, 1978.

YANG, Z.; RANNALA, B. Molecular phylogenetics: principles and practice. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, p. 303–314, 2012.

ZHAO, Y; GALVÃO, C.; CAI, W. *Rhodnius micki*, a new species of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) from Bolivia. **ZooKeys**, v. 1012, p. 71-93, 2021.