



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" INSTITUTO DE
BIOCIÊNCIAS – CÂMPUS DE BOTUCATU (IBB/UNESP)
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA)

Paulo Sergio de Sousa

**Existe barreira de isolamento reprodutivo entre as espécies
do subcomplexo *vitticeps* (Hemiptera, Triatominae)?**

Botucatu
2020

Paulo Sergio de Sousa

**Existe barreira de isolamento reprodutivo entre as espécies
do subcomplexo *vitticeps* (Hemiptera, Triatominae)?**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Zoologia) junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu.

Orientador: Prof. Dr. Kaio Cesar
Chaboli Alevi

Coorientador: Dr. Jader de Oliveira

Botucatu
2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Sousa, Paulo Sergio de.

Existe barreira de isolamento reprodutivo entre as espécies do subcomplexo vitticeps (Hemiptera, Triatominae)? / Paulo Sergio de Sousa. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Kaio Cesar Chaboli Alevi

Coorientador: Jader de Oliveira

Capes: 20400004

1. Chagas, Doença de. 2. Hemiptera. 3. Barbeiro (Inseto). 4. Cruzamento (Genética). 5. Reprodução animal. 6. Técnicas Reprodutivas.

Palavras-chave: Cruzamentos experimentais; Doença de Chagas; Híbridos; Triatomíneos.

Paulo Sergio de Sousa

**Existe barreira de isolamento reprodutivo entre as espécies
do subcomplexo *vitticeps* (Hemiptera, Triatominae)?**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Zoologia) junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu.

Comissão examinadora

Prof. Dr. Kaio Cesar Chaboli Alevi
FCFAR/UNESP
Orientador

Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira
IBILCE/UNESP

Prof. Dr. Luis Lenin Vincente Pereira
UNIJALES

Botucatu
2020

Dedicatória

É com muito orgulho que dedico esse trabalho às pessoas que foram imprescindíveis em minha vida:

Agradeço ao meu pai, Paulo Brauna de Sousa, e à minha mãe, Claudinei de Seles Sousa, pela dedicação, amor, apoio, carinho e incentivo. Agradeço especialmente à minha mãe que, diante de todas as expectativas negativas sobre os meus estudos, nunca desistiu: me incentivou, me apoiou, me fez acreditar e me fez entender que apenas o estudo é capaz de transformar (para melhor) a minha realidade e a realidade dos que estão ao meu redor.

Dedico às minhas filhas, Thamires Cavallero de Sousa, Maria Paula Cavallero de Sousa e Rafaela Ferreira da Silva de Sousa; é para vocês que, todos os dias, eu tento ser uma pessoa melhor. Dedico, especialmente, à minha esposa, Jilly Gabriela Ferreira da Silva, que, com amor, esteve sempre presente nas minhas vitórias e derrotas, sendo parte essencial nessa conquista. Você é essencial na minha vida! Amo vocês!

Agradecimentos

Agradeço grandemente àqueles que me conduziram à melhoria, sejam com ensinamentos, palavras ou exemplos. Sou eternamente grato por sempre estar cercado de pessoas muito melhores que eu.

Agradeço aos meus pais, Paulo Brauna de Sousa e Claudinei de Seles Sousa, que mesmo com pouca instrução, me ensinaram valores essenciais para a vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Kaio Cesar Chaboli Alevi, pela dedicação desmedida, pelo zelo, por sempre fazer a diferença na minha vida, por ser esse ser humano fantástico e único, por todos os ensinamentos, pela confiança e pela parceria.

Ao meu coorientador, Dr. Jader de Oliveira, por toda a dedicação e ensinamentos durante a realização do nosso trabalho.

Agradeço aos membros da banca, Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira e Prof. Dr. Luis Lenin Vicente Pereira, pelo incentivo, pela orientação, pelas palavras e pelo direcionamento.

Ao meu amigo, Prof. Dr. Rodrigo Castro, amigo de todas as horas, que me apresentou ao meu orientador e com isso fez com que o meu sonho se tornasse realidade.

A todos os meus professores, desde os basais, em especial àqueles que me marcaram para toda a vida, dona Zenaide, dona Carmem, professor Manoel, professora Delaine (à quem dei muito trabalho), professor Maurício, aos docentes da graduação, Pedro, Rosani, Patrícia, Cecília, Neide, Jair, Margarete, Reinaldo, Fátima, João Paulo, e pós-graduação que me proporcionaram uma sólida formação de qualidade. Guardo todos com muito carinho.

Aos meus irmãos Simone, Marco e Camila: juntos somos mais. Passamos por momentos difíceis diversas vezes, mas sempre superamos e nos apegamos aos aprendizados e aos momentos bons e felizes.

A todos os meus familiares que sempre me incentivaram, que sempre demonstraram um grande orgulho em presenciar o meu crescimento pessoal. Em especial ao meu tio Carlos que foi quem me inseriu no mercado de trabalho e sempre que possível desfrutamos de altos papos; à tia Célia que sempre me colocou no mais alto dos pedestais, me incentivou e me apoiou; aos meus primos, meus “meio irmãos”, que sempre torceram por mim.

Aos meus avós (*in memorian*), precursores dessa família grande e feliz.

Aos meus amigos de toda a vida: Edmar, Ailton, Rinaldo, Marcos Paulo, que sempre vibram e comemoram as minhas conquistas.

Aos meus amigos da graduação, em especial à turma do fundão, Camila, Thiago, Flávio.

Às minhas amigas e parceiras do trabalho, professora Ana Stela, professora Rita, professora Rosemary Frushio, vocês foram grandes parceiras e me ajudaram muito nessa empreitada, supriram minhas ausências, e fizeram com que o fardo se tornasse mais leve.

À minha esposa Jilly Gabriela, sempre me apoiando e incentivando, sempre de platéia para os meus ensaios e minhas apresentações. Você é essencial e especial.

À toda a equipe da E.E. Genaro Domarco.

À toda a equipe do laboratório de Biologia Celular (IBILCE/UNESP) e do laboratório de Parasitologia (FCFAR/UNESP), pela ajuda e dedicação, vocês foram imprescindíveis na realização deste projeto.

À Fundação de Apoio à Pesquisa e Extensão de São José do Rio Preto (FAPERP) pelo auxílio financeiro concedido (Auxílio Pesquisa, Processo nº 002/2019).

Muito obrigado! Sem vocês, eu não teria conseguido...

“Temos de nos tornar na mudança que queremos ver.”

Mahatma Gandhi

Sumário

Resumo.....	10
Abstract.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivos gerais.....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 Delineamento do estudo.....	17
3.2 Análises citogenéticas.....	19
3.3 Morfologia gonadal.....	20
3.4 Morfologia externa.....	20
4. RESULTADOS.....	21
4.1 Cruzamentos experimentais.....	21
4.2 Regra de Haldane.....	23
4.3 Viabilidade reprodutiva.....	24
4.3.1 Morfologia gonadal.....	24
4.3.2 Espermatogênese.....	26
4.4 Segregação das características fenotípicas.....	26
5. DISCUSSÃO.....	29
6. CONCLUSÃO.....	34
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

Resumo

Triatoma melanocephala e *T. vitticeps* foram inicialmente agrupados no subcomplexo *T. brasiliensis*. Contudo, análises cariossistemáticas demonstraram que essas espécies não deveriam ter sido agrupadas com as espécies desse subcomplexo. Recentemente, *T. melanocephala* e *T. vitticeps* foram agrupadas em um novo subcomplexo intitulado *T. vitticeps*. Essas espécies são irmãs, compartilham características morfológicas e citogenéticas e, sobretudo, existem relatos de possíveis híbridos naturais ocorrendo na natureza. Como essas espécies estão isoladas reprodutivamente de todos os triatomíneos da América do Sul (pela divergência no número de cromossomos), consideramos importante realizar cruzamentos experimentais e avaliar se existem barreiras reprodutivas instaladas entre as espécies do subcomplexo *T. vitticeps*, pois acredita-se que diversos fatores, como as atuais mudanças climáticas e ambientais provocadas pelo homem, provavelmente, influenciarão no aumento da probabilidade de hibridação para as comunidades futuras, pois estão reorganizando as assembleias de espécies e derrubando as barreiras reprodutivas físicas, temporais e comportamentais, o que pode resultar em eventos de extinção, introgressão, ou, até mesmo, especiação. Assim, analisou-se se as espécies do subcomplexo *T. vitticeps* apresentam barreiras reprodutivas pré e/ou pós-zigóticas, por meio de cruzamentos experimentais e análise dos híbridos resultantes até a segunda geração (F2), com ênfase na análise da dinâmica evolutiva dos cruzamentos experimentais (cópula interespecífica, oviposição, eclosão e desenvolvimento dos híbridos), bem como na análise da viabilidade reprodutiva dos híbridos (espermatogênese e morfologia das gônadas masculinas e femininas). Os cruzamentos entre ♀ *T. vitticeps* x *T. melanocephala* ♂ não resultaram em híbridos, caracterizando, dessa forma, barreira pré-zigótica (possivelmente associada com isolamento gamético ou incompatibilidade genômica). Já os cruzamentos entre ♀ *T. melanocephala* x *T. vitticeps* ♂ produziram híbridos que, após chegar à fase adulta, foram estéreis (barreira pós-zigótica de esterilidade do híbrido) e apresentaram disgenesia gonadal bilateral (sem formação de gametas), confirmando o *status* específico de *T. vitticeps* e *T. melanocephala*, com base no conceito biológico de espécie.

Palavras-chave: Triatomíneos; Híbridos; Cruzamentos experimentais; Doença de Chagas

Abstract

Triatoma melanocephala and *T. vitticeps* were initially grouped in the *T. brasiliensis* subcomplex. However, karyosystematic analyzes showed that these species should not have been grouped with the species of this subcomplex. Recently, *T. melanocephala* and *T. vitticeps* have been grouped into a new subcomplex entitled *T. vitticeps*. These species are sisters, share morphological and cytogenetic characteristics and, above all, there are reports of possible natural hybrids occurring in nature. As these species are reproductively isolated from all triatomines in South America (due to the divergence in chromosome numbers), we consider it important to conduct experimental crosses and to evaluate if there are reproductive barriers installed between *T. vitticeps* subcomplex species, as it is believed that several factors, as the current climate and environmental changes caused by man, probably influence the increased likelihood of hybridization for future communities, as they are reorganizing the assemblies of species and breaking down the physical reproductive barriers, temporal and behavioral, which can result in events of extinction, introgression, or even speciation. Thus, we analyzed whether the species of the *T. vitticeps* subcomplex present pre and/or post-zygotic reproductive barriers through experimental crosses and analysis of the resulting hybrids until the second generation (F2), with emphasis on the evolutionary dynamics of the species. Experimental crosses (interspecific copulation, oviposition, hatching and development of hybrids), as well as the analysis of reproductive viability of hybrids (spermatogenesis and morphology of male and female gonads). Crossings between ♀ *T. vitticeps* x *T. melanocephala* ♂ did not result in hybrids characterizing prezygotic barrier (possibly associated with gametic isolation or genomic incompatibility). The crosses between ♀ *T. melanocephala* x *T. vitticeps* ♂ produced hybrids that, after reaching adulthood, were sterile (post-zygotic hybrid sterility barrier) and presented bilateral gonadal dysgenesis (without gamete formation), confirming the status of *T. vitticeps* and *T. melanocephala*, based on the biological species concept.

Keywords: Triatomines; Hybrids; Experimental crossings; Chagas disease

1. INTRODUÇÃO

Em 1907, o médico e pesquisador Carlos Ribeiro Justiniano Chagas foi encaminhado a Minas Gerais, Brasil, pelo Dr. Oswaldo Gonçalves Cruz, a fim de executar a campanha antimalárica nos serviços de construção da estrada de ferro central do Brasil. Em contato com a população local, teve a informação da existência de um hematófago conhecido como barbeiro, que habitava casas de paredes não rebocadas e telhados de capim (choupanas) e atacava o homem no período noturno (CHAGAS, 1909). Ao examinar o inseto *Conorhinus megistus* Burmeister, 1835 (Hemiptera, Triatominae), atualmente conhecido como *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835), verificou em suas fezes a presença de um protozoário, até então, desconhecido. Assim, o renomado pesquisador descreveu uma nova espécie de *Trypanosoma* [*Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) (Kinetoplastida, Trypanosomatidae)], bem como toda a cadeia epidemiológica da doença, que posteriormente foi denominada “moléstia de Chagas” (CHAGAS, 1909). Desse modo, Chagas identificou, não apenas o agente etiológico, mas também o vetor, o reservatório silvestre e o primeiro registro da doença em humanos, sem contar com os recursos tecnológicos atuais (AMATO NETO e PASTERNAK, 2009).

A tripanossomíase americana, também conhecida como doença de Chagas, é uma antropozoonose frequente nas Américas que tem como agente etiológico o protozoário flagelado *T. cruzi* (WHO, 2018). Mesmo após 110 anos de sua descrição, essa doença é considerada uma das principais endemias da América Latina, devido ao impacto social e econômico gerado, afetando, aproximadamente, oito milhões de pessoas no continente latino-americano, sendo transmitida, principalmente, pelas fezes de insetos hematófagos pertencentes à subfamília Triatominae (Hemiptera, Heteroptera) (uma vez que esses insetos tem o hábito de defecar durante o repasto

sanguíneo e, caso estejam infectados pelo *T. cruzi*, liberam o parasito pelas fezes, ocasionando a contaminação do hospedeiro vertebrado) (WHO, 2018).

Atualmente, existem 154 espécies descritas na subfamília Triatominae, agrupadas em 19 gêneros e cinco tribos (OLIVEIRA e ALEVI, 2017; DORN et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2018; LIMA-CORDÓN et al., 2019; POINAR, 2019, NASCIMENTO et al., 2019). Com base, principalmente, em dados morfológicos e na disposição geográfica, os triatomíneos do gênero *Triatoma* Laporte, 1832 foram inicialmente agrupados em oito subcomplexos específicos, a saber, *T. dimidiata*, *T. phyllosoma*, *T. brasiliensis*, *T. infestans*, *T. maculata*, *T. matrogrossensis*, *T. rubrovaria* e *T. sordida* (SCHOFIELD e GALVÃO, 2009). No entanto, com a disponibilidade de dados genéticos das espécies, diversos subcomplexos foram reagrupados (ALEVI et al., 2012, 2014; GARDIM et al., 2014; PITA et al., 2016), pois embora esses agrupamentos de espécies não sejam reconhecidos pelo Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICNZ, 1999), Justi et al. (2014) destacam que eles devem representar grupos naturais (grupos monofiléticos).

Triatoma melanocephala Neiva & Pinto, 1923 e *T. vitticeps* (Stål, 1859) foram inicialmente agrupados no subcomplexo *T. brasiliensis* (SCHOFIELD e GALVÃO, 2009). Contudo, análises cariotípicas demonstraram que essas espécies não deveriam ter sido agrupadas com as espécies do subcomplexo *T. brasiliensis*, pois apresentam número de cromossomos totalmente diferente (ALEVI et al., 2012). Recentemente, Alevi e colaboradores (2017), com base em dados morfológicos, citogenéticos e suporte filogenético, agruparam-nas em um novo subcomplexo intitulado *T. vitticeps*. Esse subcomplexo pode ser diferenciado de todos os subcomplexos da América do Sul (*T. brasiliensis*, *T. infestans*, *T. maculata*, *T. matrogrossensis*, *T. rubrovaria* e *T. sordida*) pela cariosistemática, pois enquanto *T.*

melanocephala e *T. vitticeps* apresentam $2n = 24$ cromossomos ($2n = 20 + X_1X_2X_3Y$), as outras espécies de *Triatoma* da América do Sul apresentam 22 cromossomos ($2n = 20 + XY$) (ALEVI et al., 2018).

Um recente estudo que associa dados geológicos e filogenéticos sugere que o ancestral das espécies do subcomplexo *T. vitticeps* chegou à costa do Atlântico por dispersão e se diversificou antes da elevação do norte Andino (23-10 Ma) (JUSTI et al., 2016). *T. melanocephala* e *T. vitticeps* são táxons irmãos (GARDIM et al., 2014; JUSTI et al., 2016) que compartilham características morfológicas (SHERLOCK e GUITTON, 1980) e citogenéticas (ALEVI et al., 2012, 2017). São espécies endêmicas do Brasil (GALVÃO, 2014) e existem relatos de possíveis híbridos naturais coletados na natureza (ALEVI et al., 2017). Como essas espécies estão isoladas reprodutivamente de todos os triatomíneos da América do Sul, pois o número de cromossomos atua como uma importante barreira de isolamento reprodutivo para Triatominae (ALEVI, KCC, comunicação pessoal), consideramos importante realizar cruzamentos experimentais e avaliar se existem barreiras reprodutivas instaladas entre as espécies do subcomplexo *T. vitticeps*, pois acredita-se que diversos fatores (como as atuais mudanças climáticas e ambientais provocadas pelo homem), provavelmente, influenciarão no aumento da probabilidade de hibridação para as comunidades futuras (pois estão reorganizando as assembleias de espécies e derrubando as barreiras reprodutivas físicas, temporais e comportamentais), o que pode resultar em eventos de extinção, introgressão ou, até mesmo, especiação (CHUNCO, 2014).

O *status* específico de diversas espécies agrupadas nos complexos *T. brasiliensis* (COSTA et al., 2003, 2009; CORREIA et al., 2013; MENDONÇA et al., 2014, 2016; ALEVI et al., 2018), *T. phyllosoma* (MARTÍNEZ-IBARRA et al., 2005, 2008, 2011) e *T. dimidiata* (GARCÍA et al., 2013) foram corroborados por

meio de cruzamentos experimentais. Com base no exposto, fica claro que a realização de cruzamentos experimentais e a análise de fatores associados com os híbridos, como, por exemplo, taxa de eclosão, taxa de mortalidade, proporção entre machos e fêmeas [para avaliar a regra de Haldane que prediz que o primeiro sexo afetado na prole híbrida é o heterogamético, ou seja, XY no caso dos tritomíneos (TURELLI e ORR, 1995)] e viabilidade reprodutiva, também são importantes para a taxonomia dos triatomíneos, principalmente porque, de acordo com o conceito biológico de espécie apresentado por Mayr et al. (1963) e Dobzhansky (1970), “espécies são grupos de populações naturais que se inter cruzam real ou potencialmente e que são isoladas reprodutivamente de outros grupos (produzindo qualquer incompatibilidade reprodutiva entre os parentais, esterilidade dos híbridos ou ambos)”.

Diversos outros exemplos de cruzamentos experimentais interespecíficos podem ser observados em triatomíneos (MAZZOTTI e OSÓRIO, 1941, 1942; USINGER, 1944, 1966; ABALOS, 1948; RYCKMAN, 1962; CORRÊA e ESPÍNOLA, 1964; UESHIMA, 1966; ESPÍNOLA, 1971; CARVALHEIRO e BARRETTO, 1976; FRANCA-RODRÍGUEZ et al., 1979; GALÍNDEZ et al., 1994, PÉREZ et al 2005; SCHEREIBER et al., 1974; CERQUEIRA, 1982; HEITZMANN-FONTENELLE, 1984; COSTA et al., 2003; MARTÍNEZ-IBARRA et al., 2005, 2008, 2011, 2016a,b; CORREIRA et al., 2013; DÍAZ et al., 2014; MENDONÇA et al., 2014, 2016; CAMPOS-SOTO et al., 2016; NEVES et al., 2020). Essas análises apresentam grande valor científico, principalmente para os cruzamentos resultantes em ovos inférteis (isolamento reprodutivo pré-zigótico) ou híbridos inviáveis (isolamento reprodutivo pós-zigótica), pois o estudo dos cruzamentos experimentais e dos híbridos resultantes possibilita ajudar a compreender a sistemática deste grupo de vetores e auxiliar na análise dos

mecanismos de isolamento que limitam o fluxo gênico entre as diferentes espécies (ARNOLD, 1997; PÉREZ et al., 2005). A hibridação experimental também pode ser empregada para estabelecer o papel da hibridação natural na geração de novas variantes que podem resultar na evolução adaptativa e/ou na fundação de novas linhagens evolutivas (ARNOLD, 1997; PÉREZ et al., 2005).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar se as espécies do subcomplexo *T. vitticeps* (*T. vitticeps* e *T. melanocephala*) apresentam barreiras reprodutivas pré e/ou pós-zigóticas, por meio de cruzamentos experimentais e análise dos híbridos.

2.2 Objetivos específicos

- a.** Avaliar a dinâmica evolutiva dos cruzamentos experimentais, por meio da análise da cópula, da oviposição, da taxa de eclosão dos ovos e da viabilidade dos híbridos;
- b.** Avaliar a aplicação da regra de Haldane em cada direção dos cruzamentos experimentais;
- c.** Avaliar a viabilidade reprodutiva dos híbridos, por meio da caracterização citogenética da espermatogênese e do grau de pareamento entre os cromossomos homeólogos de machos adultos, bem como por meio da análise morfológica das gônadas masculinas e femininas, com ênfase na disgenesia gonadal;
- d.** Analisar o padrão de segregação das características fenotípicas dos parentais nos híbridos experimentais, com base na morfologia externa.
- e.** Depositar os híbridos experimentais em coleções entomológicas, com o intuito de evitar a descrição de novas espécies a partir de possíveis híbridos naturais;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento do estudo

Os experimentos foram realizados no Insetário de Triatominae da FCFAR/UNESP, Araraquara, São Paulo, Brasil que apresenta toda a infraestrutura e biossegurança necessária para a realização do projeto de pesquisa. Os cruzamentos experimentais interespecíficos entre *T. vitticeps* e *T. melanocephala* foram realizados para ambas as direções (Figura 1) [assim como cruzamentos intraespecíficos também foram realizados entre os parentais e utilizados como parâmetro de comparação (grupo controle) (MARTINEZ-IBARRA et al., 2008)]. Para garantir que toda a prole seja resultante do cruzamento experimental, foram utilizadas ninfas de quinto instar (N5) machos e fêmeas [caracterizadas de acordo com a metodologia de Rosa et al. (1992)] para ambas as espécies parentais (MARTÍNEZ-IBARRA et al., 2011), uma vez que os triatomíneos só atingem a maturidade sexual após a muda imaginal. Além disso, para garantir a viabilidade dos cruzamentos e a efetividades dos resultados, seis casais (sendo três réplicas para cada direção) foram formados. Os casais foram mantidos separadamente em potes de plástico (cinco cm de diâmetro, 10 cm de altura) com uma tubo de papelão (para maior movimentação e facilidade na alimentação desses insetos) (BELISÁRIO et al., 2007), em temperatura ambiente e foram alimentados semanalmente com sangue de roedor (rato e/ou camundongo, de acordo com a disponibilidade do biotério da FCFAR/UNESP).

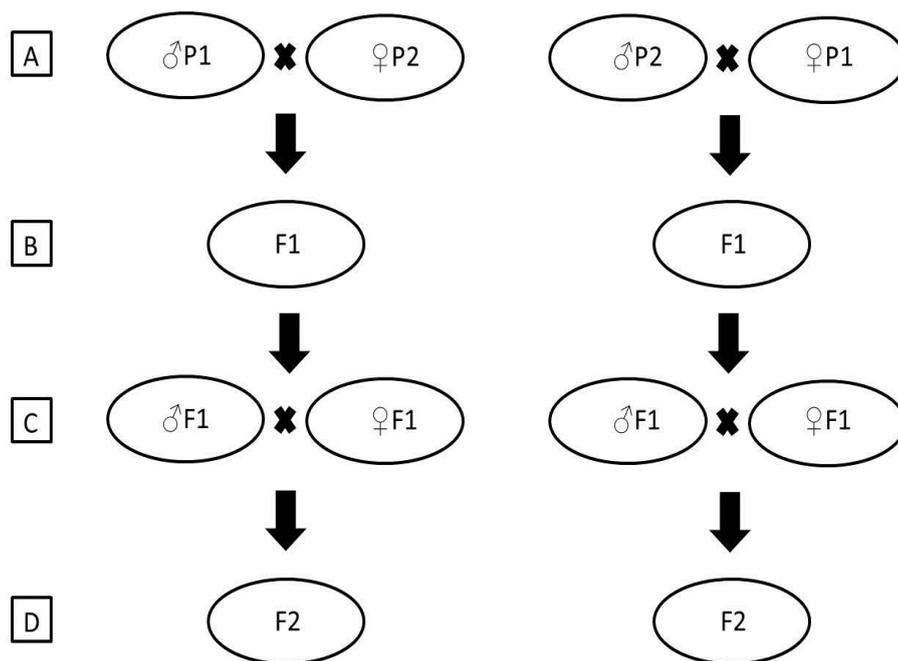


Figura 1. Fluxograma representando os cruzamentos experimentais que foram realizados durante o experimento. A: Cruzamentos experimentais entre os parentais (P1)[*T. vitticeps* e (P2)*T. melanocephala*], nas duas direções. B: Híbridos que poderão eclodir dos cruzamentos experimental (F1), caso não sejam detectadas barreiras reprodutivas pré-zigóticas. C: Cruzamentos experimentais que poderão ser realizados entre os híbridos (F1) provenientes de cada geração, caso não sejam inviáveis (inviabilidade do híbrido) ou inférteis (esterilidade do híbrido). D: Segunda geração híbrida (F2) que poderá eclodir, caso não exista barreira intraespecífica pré ou pós-zigótica instalado entre as espécies do subcomplexo *T. vitticeps*.

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

semanalmente (BELISÁRIO et al., 2007). Como os ovos do cruzamento entre *T. vitticeps* ♀ x *T. melanocephala* ♂ foram inférteis [e, conseqüentemente híbridos não foram obtidos em F1 (Figura 1B), apenas na direção entre *T. melanocephala* ♀ x *T. vitticeps* ♂] os híbridos (Figura 1B) foram sexados em N5 e três novos cruzamentos foram realizados (Figura 1C) para possível obtenção de F2 (Figura 1D), sendo os mesmos parâmetros, descritos acima, utilizados na avaliação.

Esses cruzamentos foram acompanhados semanalmente e as ninfas híbridas resultantes do cruzamento entre *T. melanocephala* ♀ x *T. vitticeps* ♂ que chegaram à fase adulta foram sexadas para que a regra de Haldane [que afirma que se híbridos de apenas um sexo são inviáveis ou estéreis, o sexo afetado é muito mais provável de ser heterogamético (XY) do que homogamético (XX) (TURELLI e ORR, 1995)] fosse avaliada. Justificamos que para todos os dados quantitativos coletados, a frequência relativa (%) foi calculada.

3.2 Análises citogenéticas

Dez híbridos machos adultos provenientes do cruzamento entre *T. melanocephala* ♀ x *T. vitticeps* ♂ foram dissecados e tiveram seus testículos retirados e armazenados em solução de metanol: ácido acético (3:1) [justificamos que ninfas não apresentam gônadas com divisão meiótica (CAMPOS- SOTO et al., 2016) e que os machos foram utilizados nos estudos citogenéticos porque diferente da ovogênese, a espermatogênese é contínua na fase adulta, permitindo que o grau de pareamento entre os cromossomos seja facilmente avaliado]. Posteriormente, lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento celular [conforme descrito por Alevi et al. (2012)] e as análises citogenéticas foram aplicadas para caracterizar a espermatogênese, por meio da técnica de Orceína Lacto-Acética [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)]. Pelo menos 50 células de cada organismo foram analisadas, conforme realizado por Mendonça et al. (2014). As lâminas foram examinadas em microscopia de luz *Jenaval* (Zeiss), acoplado à câmera digital e ao sistema analisador de imagens *Axio Vision LE 4.8* (Copyright ©2006-2009 Carl Zeiss *Imaging Solutions Gmb H*), com aumento de 1000 vezes.

3.3 Morfologia gonadal

Assim como realizado por Almeida e Carareto (2002) para híbridos de *Drosophila* Fallén, 1932, a morfologia das gônadas 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 seis exemplares machos [para otimização do material, foram utilizados os mesmos testículos das análises citogenéticas (item 3.2)] e dez fêmeas híbridas adultas de cada geração, que foram dissecadas e tiveram seus ovários analisados. Como grupo controle, as gônadas de, pelo menos, 10 parentais machos e fêmeas foram dissecadas e caracterizadas.

3.4 Morfologia externa

Com base na chave de identificação de Galvão (2014), as principais características morfológicas utilizadas para distinguir *T. melanocephala* [1+1 manchas amarelas na metade anterior do lobo posterior do pronoto entre as carenas e os bordos laterais (Galvão, 2014)] e *T. vitticeps* [manchas vermelhas em faixa longitudinal dorsal na cabeça desde atrás do clipeo até o sulco interocular; 3+3

manchas no lobo posterior do pronoto, sendo 1+1 entre as carenas e 2+2 entre elas e as bordas laterais (Galvão, 2014)] foram fotodocumentadas nos híbridos machos (oito) e fêmeas (12), para avaliar o padrão de segregação das características fenotípicas. A fotodocumentação foi realizada em microscópio estereoscópio Leica MZ APO, com sistema de análise de imagem *Motic Advanced 3.2 plus*.

4. RESULTADOS

4.1 Cruzamentos experimentais

Cruzamentos experimentais intra e interespecíficos foram realizados conforme descrito na tabela 1:

Tabela 1. Cruzamentos experimentais realizados entre *T. vitticeps* e *T. melanocephala* (intra e interespecíficos), bem como seus híbridos.

Cruzamentos experimentais	Número de Ovos	Número de ninfas	Taxa de eclosão
Interespecíficos			
♀ <i>T. melanocephala</i> x <i>T. vitticeps</i> ♂	208	156	75%
♀ <i>T. vitticeps</i> x <i>T. melanocephala</i> ♂	272	0	0%
Intercruzamentos (F1)			
♀ Híbrido x Híbrido ♂*	330	0	0%
Intraespecíficos (controle)			
♀ <i>T. melanocephala</i> x <i>T. melanocephala</i> ♂	302	189	63%
♀ <i>T. vitticeps</i> x <i>T. vitticeps</i> ♂	382	248	65%

* Cruzamento entre híbridos provenientes do cruzamento entre ♀ *T. melanocephala* x *T. vitticeps* ♂.

Cópulas interespecíficas foram observadas para ambas as direções dos cruzamentos (Figura 2). Contudo, embora os ovos do cruzamento entre ♀ *T.*

melanocephala x *T. vitticeps* ♂ produziram híbridos, os ovos do cruzamento entre ♀ *T. vitticeps* x *T. melanocephala* ♂ foram inférteis (Tabela 1), demonstrando que existe barreira pré-zigótica instalada para essa direção do cruzamento.

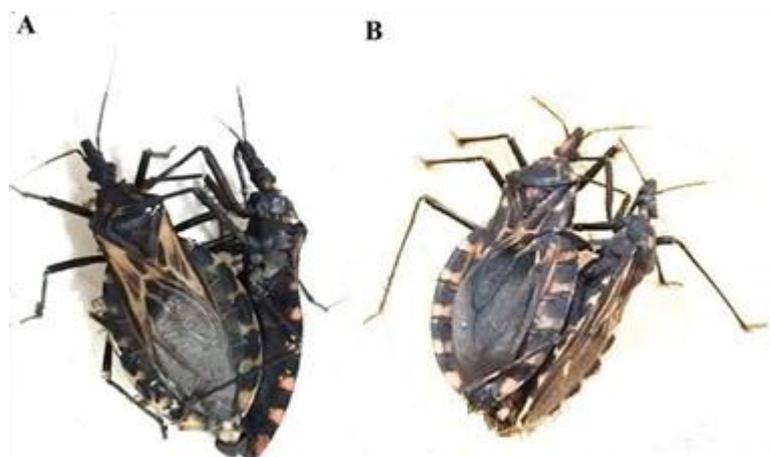


Figura 2. Cópulas interespecíficas entre (A) ♀ *T. melanocephala* x *T. vitticeps* ♂ e (B) ♀ *T. vitticeps* x *T. melanocephala* ♂.

A eclosão de híbridos F1 para o cruzamento entre ♀ *T. melanocephala* x *T. vitticeps* ♂ (Tabela 1) demonstra, por sua vez, que não existe barreiras pré-zigóticas instaladas para essa direção, ou seja, as espécies se reconheceram, copularam e ocorreu compatibilidade gamética, genômica e zigótica. Assim, realizou-se intercruzamentos entre os híbridos F1 que atingiram a fase adulta e cópulas foram fotodocumentadas (Figura 3). Contudo, todos os ovos resultantes do cruzamento foram inférteis (Tabela 1), caracterizando a barreira pós-zigótica do tipo esterilidade do híbrido.



Figura 3. Cópula entre os híbridos resultantes do cruzamento entre ♀ *T. melanocephala* x *T. vitticeps* ♂.

4.2 Regra de Haldane

A partir da sexagem da prole F1 foi possível observar que a proporção entre fêmeas e machos híbridos foi de 55% (Tabela 2), sugerindo que a regra de Haldane não esteja atuando para os cruzamentos entre ♀ *T. melanocephala* x *T. vitticeps* ♂.

Tabela 2. Análise da aplicação da regra de Haldane por meio da proporção de machos e fêmeas híbridas.

Cruzamentos experimentais	Híbridos		
	Machos (M)	Fêmeas (F)	Proporção (M/F)
Interespecíficos			
♀ <i>T. melanocephala</i> x <i>T. vitticeps</i> ♂	17	31	55%

Para confirmar que regra de Haldane não está atuando, realizamos retrocruzamentos entre híbridos fêmea (provenientes do cruzamento entre ♀ *T. melanocephala* x *T. vitticeps* ♂) com machos das espécies *T. melanocephala* e *T. vitticeps* (Tabela 3) (Figura 4), e observamos que as fêmeas híbridas também são

estéreis, descaracterizando a atuação desse fenômeno evolutivo para os híbridos obtidos.

Tabela 3. Retrocruzamentos realizados entre os híbridos provenientes do cruzamento entre ♀ *T. melanocephala* x *T. vitticeps* ♂ com *T. melanocephala* e *T. vitticeps*.

Cruzamentos experimentais	Número de Ovos	Número de ninfas	Taxa de Eclosão
Retrocruzamentos			
♀ Híbrido x <i>T. melanocephala</i> ♂	192	0	0%
♀ Híbrido x <i>T. vitticeps</i> ♂	229	0	0%

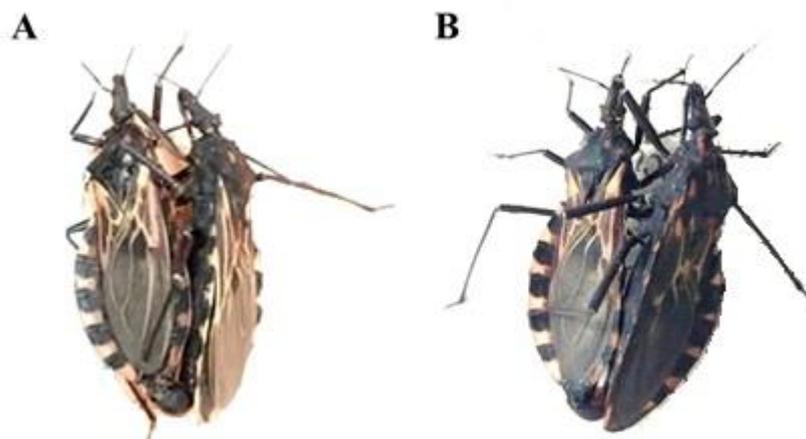


Figura 4. Retrocruzamentos: (A) Híbrido ♀ x *T. melanocephala* ♂, (B) Híbrido ♀ x *T. vitticeps* ♂.

4.3 Viabilidade reprodutiva

4.3.1 Morfologia gonadal

Ao analisarmos a morfologia das gônadas dos híbridos, observamos que os testículos estavam bilateralmente atrofiados (Figura 5, setas), caracterizando a disgenesia gonadal (Figura 6).

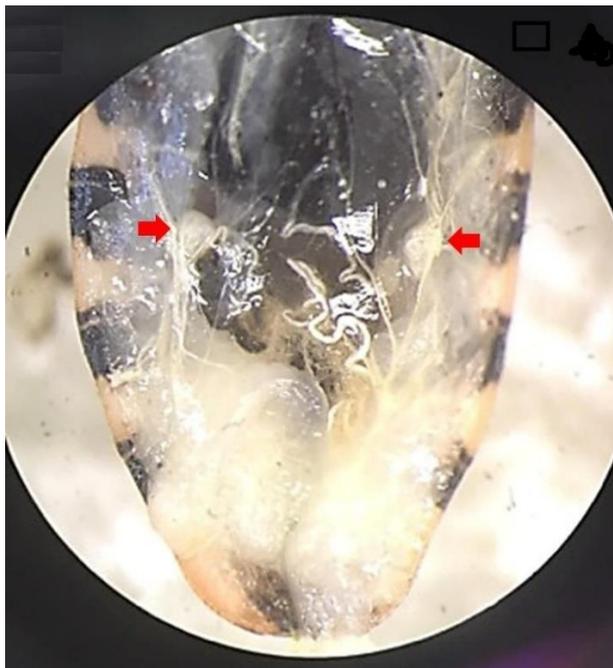


Figura 5. Disgenesia gonadal bilateral para os testículos dos híbridos resultantes do cruzamento entre ♀ *T. melanocephala* x *T. vitticeps* ♂. Setas indicam os testículos atrofiados.

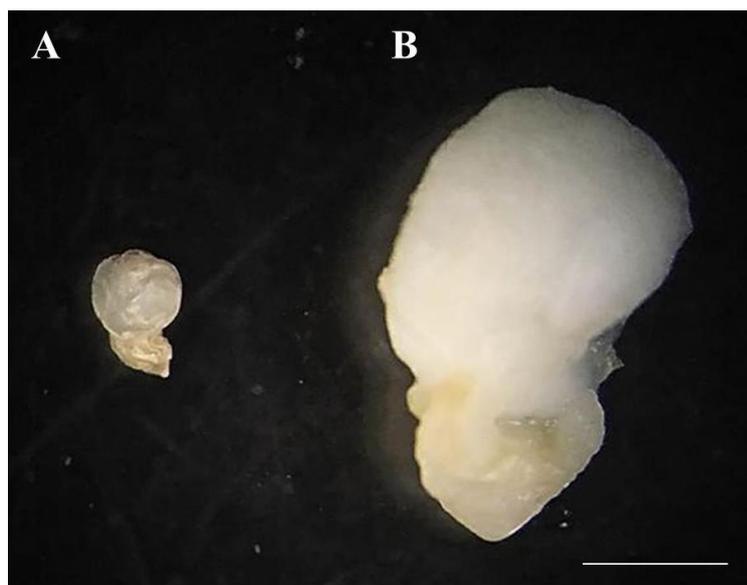


Figura 6. Testículo atrofiado dos híbridos resultantes do cruzamento entre (A) ♀ *T. melanocephala* x *T. vitticeps* ♂ e (B) testículo normal de *T. melanocephala*. Barra: 10 mm.

4.3.2 Espermatogênese

O estudo citogenético dos testículos atrofiados demonstrou que não ocorre gametogênese nesses órgãos, uma vez que apenas células somáticas (núcleos poliploides) foram observadas (Figura 7).

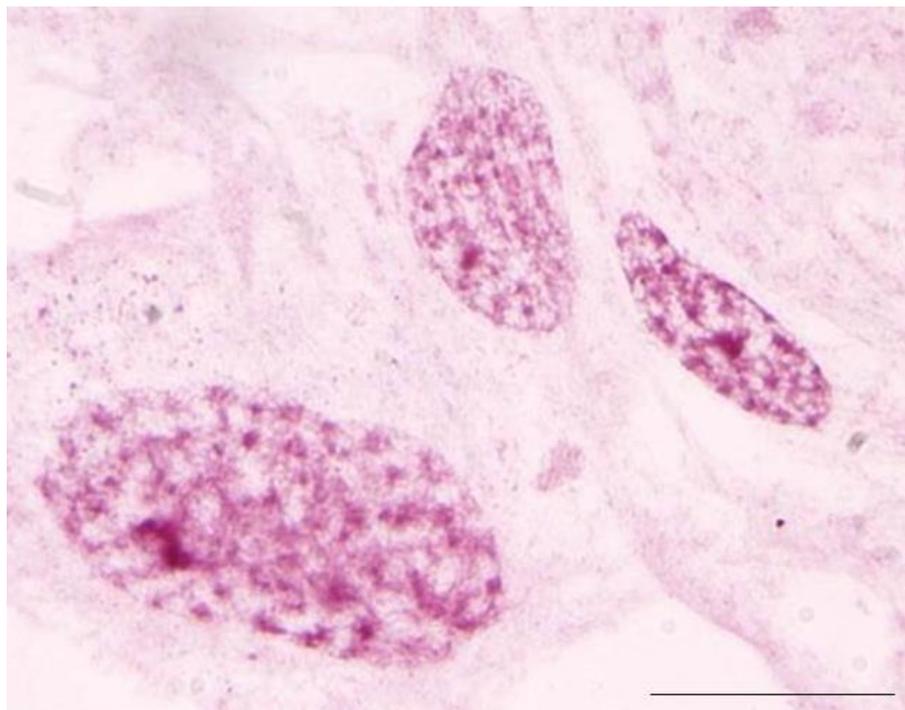


Figura 7. Estudo citogenético dos testículos atrofiados dos híbridos resultantes do cruzamento entre ♀ *T. melanocephala* x *T. vitticeps* ♂. Apenas células somáticas (núcleos poliploides) foram observadas. Barra: 100 µm.

4.4 Segregação das características fenotípicas

A caracterização morfológica da cabeça dos híbridos machos (Figura 8C) e híbridos fêmeas (Figura 8D) demonstrou que o padrão observado para *T. vitticeps* (Figura 8B), a saber, presença de manchas vermelhas em faixa longitudinal dorsal que vão desde atrás do clipeo até o sulco interocular (Galvão et al., 2014), foi o padrão principal que segregou na prole.

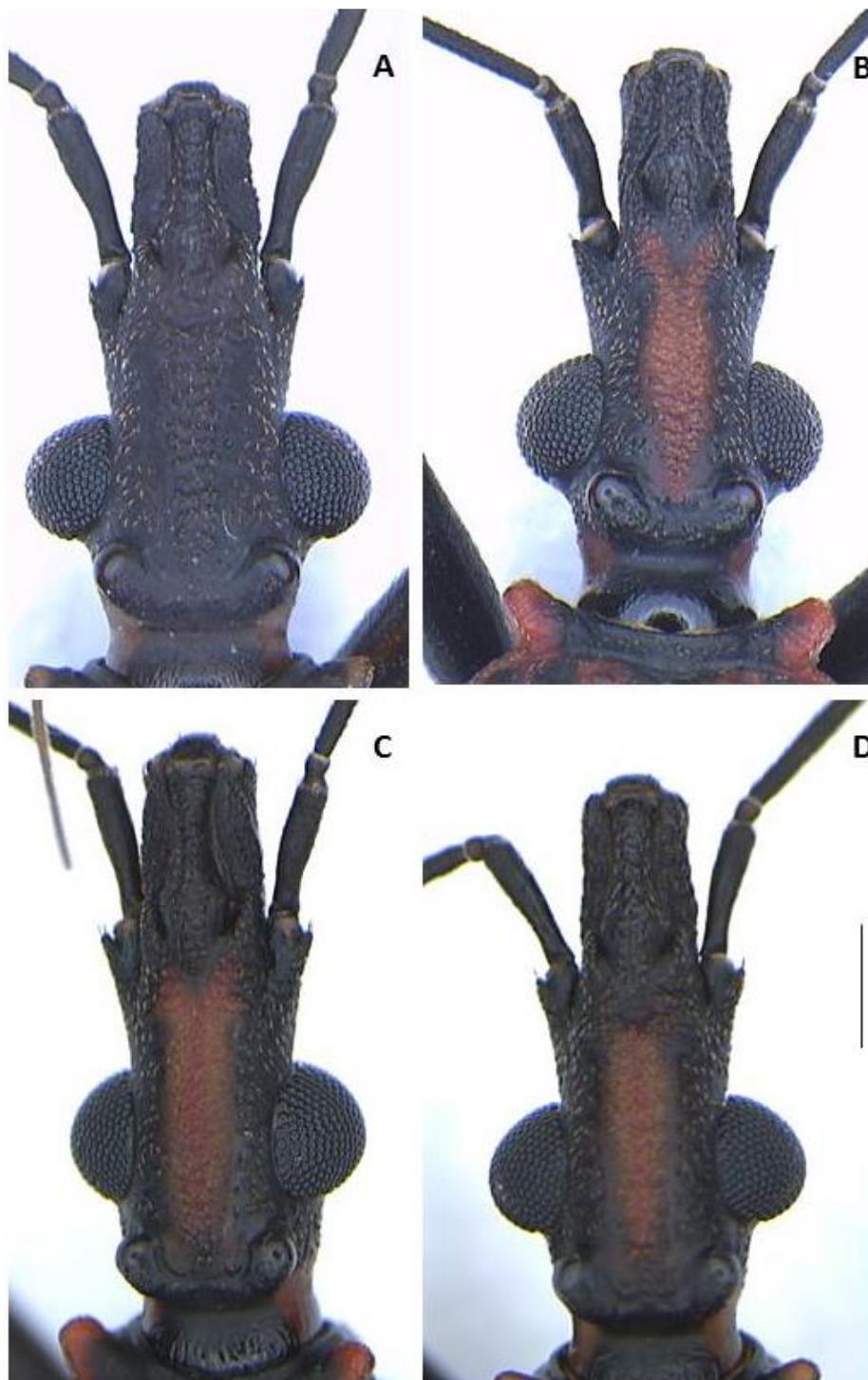


Figura 8. Caracterização morfológica da cabeça de (A) *T. melanocephala*, (B) *T. vitticeps*, (C) híbrido macho e (D) híbrido fêmea resultantes do cruzamento entre ♀ *T. melanocephala* x *T. vitticeps* ♂. Observe que os híbridos apresentam o mesmo padrão de coloração que *T. vitticeps* (manchas vermelhas em faixa longitudinal dorsal que vão desde atrás do clipeo até o sulco interocular). Barra: 1 mm.

Já a caracterização morfológica do pronoto dos híbridos (Figura 9C-F) demonstrou que houve segregação das características tanto de *T. melanocephala* (Figura 9A) como de *T. vitticeps* (Figura 9B), uma vez que os híbridos machos (Figura 9C e 9E) e fêmeas (Figuras 9D e 9F) apresentaram 1+1 manchas amarelas na metade anterior do lobo posterior do pronoto entre as carenas e os bordos laterais (como em *T. melanocephala*) e 1+1 manchas entre as carenas (Figura 9E) e 2+2 entre elas e as bordas laterais (Figura 9C-F) (como em *T. vitticeps*).

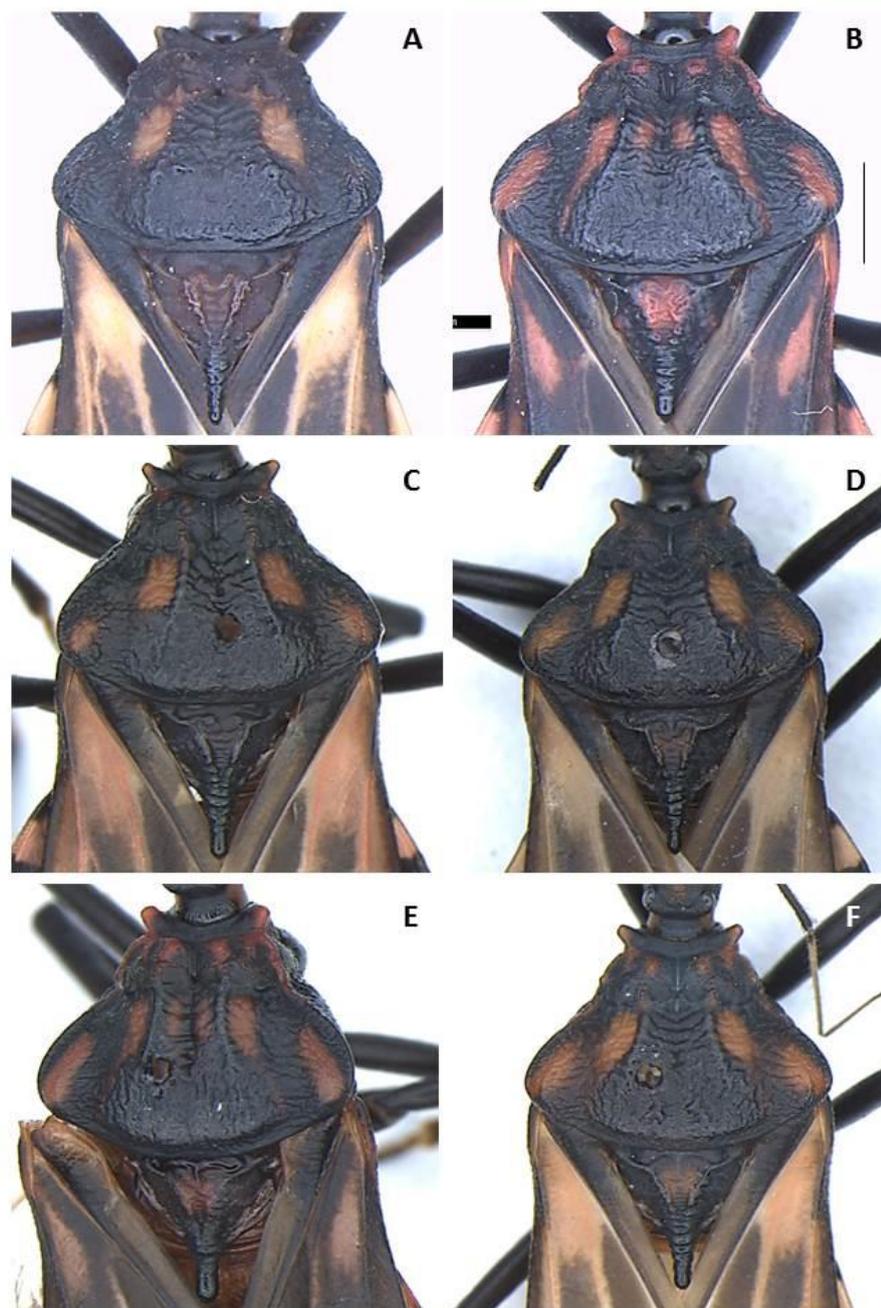


Figura 9. Caracterização morfológica do pronoto de (A) *T. melanocephala*, (B) *T. vitticeps*, (C e E) híbrido macho e (D e F) híbrido fêmea resultantes do cruzamento entre ♀ *T. melanocephala* x *T. vitticeps* ♂. Observe que os híbridos apresentam tanto características de (C-F) *T. melanocephala* como de (E) *T. vitticeps*. Barra: 1 mm.

5. DISCUSSÃO

Eventos alopátricos, sejam por dispersão, sejam por vicariância, foram de

grande importância para a especiação de Triatominae (JUSTI et al., 2016). Sistema pebas, sistema Acre, elevação da cordilheira dos Andes, ponte terrestre de Bering, antiga conexão entre Mata Atlântica e Floresta Amazônica e alteração no nível do mar são exemplos de alterações geológicas/climáticas que permitiram a dispersão/isolamento e, conseqüentemente, diversificação de diversas espécies de triatomíneos (JUSTI et al., 2016).

Embora a elevação dos Andes tenha sido associada com muitos eventos de especiação (DÍAZ et al., 2014; JUSTI et al., 2016) e polimorfismos intraespecíficos (PANZERA et al., 2004, 2014) para Triatominae, Justi et al. (2016) sugerem que a diversificação das espécies do subcomplexo *T. vitticeps* ocorreu antes da elevação do norte Andino (23-10 Ma). Levando em consideração que o ancestral comum tenha 22 cromossomos (20A + XY), Alevi et al. (2018) ressaltam que eventos evolutivos de agmatoploidia foram importantes para a diversificação cromossômica das espécies do subcomplexo *T. vitticeps* (cariótipo $2n = 24$) quando comparadas às espécies do complexo *infestans* ($2n = 22$).

As espécies do subcomplexo *T. vitticeps* são endêmicas do Brasil, sendo *T. melanocephala* notificada nos estados da Bahia, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Sergipe e *T. vitticeps* registrada na Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de Janeiro (GALVÃO, 2014). Embora, até o momento, apenas no estado da Bahia seja possível que essas espécies se encontrem e/ou vivam em simpatria, ações antropogênicas (como dispersão passiva, bem como alterações ambientais e climáticas) podem influenciar diretamente na dinâmica de distribuição dos vetores da doença de Chagas.

Levando em consideração que híbridos de *Meccus* spp. apresentaram maior potencial de infecção e transmissão do *T. cruzi* que os parentais (MARTINEZ-

IBARRA et al., 2016), assim como a importância desses organismos para eventos de especiação, extinção e introgressão (CHUNCO, 2014), conhecer um pouco mais sobre os aspectos associados com eventos de hibridização (como a capacidade de produzir híbridos e os fenômenos evolutivos associados com a quebra desses organismos) mostra-se de grande importância, principalmente diante da notificação de possíveis híbridos naturais provenientes do cruzamento entre *T. vitticeps* e *T. melanocephala* (ALEVI et al., 2017).

Os cruzamentos entre ♀ *T. vitticeps* x *T. melanocephala* ♂ não produziram híbridos, destacando que essas espécies apresentam isolamento reprodutivo pré-zigótico para essa direção do cruzamento. Isolamento pré-zigótico em apenas uma das direções do cruzamento já foi descrito para diversos cruzamentos entre os triatomíneos (USINGER, 1966; ABALOS, 1948; PÉREZ et al. 2005; SCHREIBER et al., 1974; DÍAZ et al., 2014) e, em geral, está associado com barreira mecânica por incompatibilidade das genitálias (PÉREZ et al. 2005; DÍAZ et al., 2014). O registro das cópulas interespecíficas contradiz a hipótese de isolamento mecânico, sendo, possivelmente, eventos de isolamento gamético [uma vez que divergências nas espermátides de *T. vitticeps* e *T. melanocephala* já foram descritas por Alevi et al. (2014)] e/ou divergências genômicas que inviabilizam a correta embriogênese dos híbridos, os fenômenos responsáveis pela ausência de híbridos experimentais.

Por outro lado, alta taxa de eclosão de híbridos foi observada para o cruzamento entre ♀ *T. melanocephala* x *T. vitticeps* ♂, ressaltando que não existe barreira pré-zigótica instalada para essa direção do cruzamento. A presença de híbridos, mesmo que em apenas uma das direções, confirma a relação filogenética presente entre as espécies parentais (JUSTI et al., 2016). Como não ocorreu inviabilidade do híbrido [assim como descrito para o cruzamento entre *T. mexicana*

(Herrich-Schaeffer, 1848) e as seis espécies de *Meccus* spp. (MARTÍNEZ-IBARRA et al., 2011)], uma vez que cerca de 30% da prole passou por todos os estádios ninfais (N1-N5) e atingiu a fase adulta, intercruzamentos híbridos foram realizados para avaliar a presença da barreira pós-zigótica de esterilidade do híbrido, como descrito por Pérez e colaboradores (2005) para os híbridos resultantes do cruzamento entre *T. infestans* (Klug, 1834) e *T. rubrovaria* (Blanchard, 1843).

Todas as tentativas de cruzamento resultaram em ovos inférteis, confirmando que os híbridos de ♀ *T. melanocephala* x *T. vitticeps* ♂ são estéreis. A esterilidade híbrida é um fator de grande importância do ponto de vista taxonômico [por evidenciar que *T. melanocephala* e *T. vitticeps* apresentam isolamento reprodutivo, satisfazendo, dessa forma, o conceito biológico de espécie (MAYR, 1963; DOBZHANSKY, 1970)], evolutivo (por demonstrar que *T. melanocephala* e *T. vitticeps* estão isoladas reprodutivamente, ou seja, não existe fluxo gênico interespecífico), bem como ecológicos e epidemiológicos (uma vez que híbridos estéreis – caso apresentem alto valor adaptativo – podem copular com os parentais na natureza, levando a um declínio da população natural de vetores da doença de Chagas).

Esse fenômeno pode estar associado com fatores relacionados com a atrofia das gônadas (ALMEIDA e CARARETO, 2002) e/ou erros meióticos que acarretam em gametas inviáveis (PÉREZ et al., 2005). Para Triatominae, todos os casos de esterilidade foram associados apenas com erros durante a meiose (PÉREZ et al., 2005; DÍAZ et al., 2014). Contudo, os híbridos machos provenientes do cruzamento entre ♀ *T. melanocephala* x *T. vitticeps* ♂ apresentaram disgenesia gonadal – evento bastante comum para drosofilídeos (SVED, 1976; KIDWELL e KIDWELL, 1976), sendo, muitas vezes, associado à ação de elementos de transposição (geralmente da

família P) (ENGELS, 1989). Além disso, embora não tenha sido possível avaliar se os ovários estavam atrofiados [pois o desenvolvimento ovariano está diretamente relacionado com as fases da ovogênese (ATELLA et al., 2005)], retrocruzamentos demonstraram que as fêmeas também eram estéreis.

A partir das análises citogenéticas e morfológicas, observou-se que, além da atrofia dos testículos, a espermatogênese não estava ocorrendo (uma vez que as fases da espermatocitogênese, meiose e espermiogênese estavam ausentes), destacando que gônadas atrofiadas de triatomíneos não realizam gametogênese [diferente do descrito para drosofilídeos que ressalta que em caso de disgenesia gonadal pode ocorrer esterilidade parcial ou total, com quebras cromossômicas, altas taxas de mutações, reversão de mutações e recombinações em machos (SVED, 1976; KIDWELL e KIDWELL, 1976)].

Por fim, a caracterização da morfologia externa dos híbridos demonstrou diferentes padrões de segregação para as principais características utilizadas na chave de classificação que diferenciam *T. melanocephala* e *T. vitticeps*, sendo os padrões fenotípicos da cabeça segregando como em *T. vitticeps* e os padrões do pronoto segregando com características observadas para ambas as espécies. Usinger (1966) analisou a segregação de caracteres morfológicas de *T. infestans* e *T. rubrovaria* em híbridos e observou que a maioria das características examinadas foram herdadas de *T. rubrovaria*, sendo apenas o padrão de cor das pernas dos adultos igual a *T. infestans*. Por outro lado, Mendonça et al. (2014) também observaram diferentes padrões de segregação das características morfológicas em híbridos experimentais resultantes do cruzamento entre *T. lenti* Sherlocki & Serafim, 1967 e *T. sherlocki* Papa et al., 2002, principalmente relacionados com ao tamanho do hemiélitro [uma vez que *T. sherlocki* é braquiptera e incapaz de voar (ALMEIDA et al., 2012)] e a

coloração dos anéis femorais. Além disso, um recente estudo utilizando cruzamentos experimentais entre *Mepraia spinolai* (Porter, 1934) e *M. gajardoi* Frias, Henry & Gonzalez, 1998 demonstra que machos ápteros de *M. spinolai* produzem tanto machos ápteros como alados (CAMPOS-SOTO et al., 2016), derrubando, dessa forma, a hipótese de Frias e Átria (1998) que relacionam os genes ligados as asas com o cromossomo sexual Y [como as fêmeas de *Meccus* spp. são sempre ápteras ou micrópteras, os autores haviam sugerido que o polimorfismo alar presente nos machos de *M. spinolai* estaria relacionado com uma possível quebra do cromossomo sexual Y (fragmento Y1 resultava em exemplares com asas e fragmento Y2 em exemplares sem asas)].

6. CONCLUSÃO

Com base no exposto, foi possível caracterizar as barreiras reprodutivas que inviabilizam o fluxo gênico entre *T. vitticeps* e *T. melanocephala*, a saber, barreira pré-zigótica para o cruzamento entre ♀ *T. vitticeps* x *T. melanocephala* ♂, possivelmente associada com isolamento gamético ou incompatibilidade genômica, e barreira pós-zigótica por esterilidade do híbrido entre ♀ *T. melanocephala* x *T. vitticeps* ♂, confirmando o *status* específico das espécies do subcomplexo *T. vitticeps*, com base no conceito biológico de espécie.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABALOS JW. Sobre híbridos naturales y experimentales de *Triatoma*. Anais do Instituto Regional, v.2, p. 209-223, 1948.
- ABALOS JW, WYGODZINSKY P. Las Triatominae argentinas. Monographia Inst. Med. Reg. Tucuman, v.1, p. 1-178, 1951.

ALEVI KCC, OLIVEIRA J, ROSA JA, AZEREDO-OLIVEIRA MTV. Karyotype Evolution of Chagas Disease Vectors (Hemiptera, Triatominae). *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, v. 99, p. 87-89, 1951.

ALEVI KCC, MENDONÇA PP, SUCI M, PEREIRA NP, ROSA JA, AZEREDO-OLIVEIRA MTV. 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 KCC, OLIVEIRA J, AZEREDO-OLIVEIRA MTV, ROSA JA. *Triatoma vitticeps* subcomplex (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), a new grouping of Chagas disease vectors from South America. *Parasites & Vectors*, v. 10, p. 180, 2017.

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). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 98, p. 475-477, 2018.

ALEVI KCC, ROSA JA, AZEREDO-OLIVEIRA MTV. Cytotaxonomy of the *Brasiliensis* subcomplex and the *Triatoma brasiliensis* complex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Zootaxa*, v. 3838, p. 583-589, 2014.

ALEVI KCC, MENDONÇA PP, PEREIRA NP, ROSA JA, AZEREDO-OLIVEIRA MTV. Heteropyknotic filament in spermatids of *Triatoma melanocephala* and *T. vitticeps* (Hemiptera, Triatominae). *Invertebrate, Reproduction & Development*, v. 58, p. 9–12, 2014.

ALMEIDA CE, OLIVEIRA HL, CORREIA N, DORNAK LL, GUMIEL M, NEIVA VL, HARRY M, MENDONÇA VJ, COSTA J, Galvão C. Dispersion capacity of *Triatoma sherlocki*, *Triatoma juazeirensis* and laboratory-bred hybrids. *Acta Tropica*, v. 122, p. 71-79, 2012.

ALMEIDA LM, CARARETO CMA. Gonadal hybrid dysgenesis in *Drosophila sturtevantii* (Diptera, Drosophilidae). *Ilheringia*, v. 92, p. 71-79, 2002.

AMATO NETO V, Pasternak J. Centenário da doença de Chagas. *Revista de Saude Publica*, v. 43 p. 381-382, 2009.

ARNOLD ML. *Natural Hybridization and Evolution*. University Press, New York, Oxford, v. 215, 1997.

ATELLA GC, GONDIM KC, MACHADO EA, MEDEIROS MN, SILVA-NETO MA, et al. Oogenesis and egg development in triatomines: a biochemical approach. *An Acad Bras Cienc*, v. 77, p. 405–430, 2005.

BARRETTO MP. 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 CJ, D'ÁVILA PESSOA GC, 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.

CAMPOS-SOTO R, PANZERA F, PITA S, LAGES C, SOLARI A, BOTTO-MAHAN. 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.

CARVALHEIRO JR, BARRETTO MP. 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.

CERQUEIRA RL. Estudos sobre populações de triatomíneos silvestres encontrado

em Santo Inácio – Bahia. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 68p, 1982.

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 mórbida do homem. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 1, p. 159-218, 1909.

CHUNCO AJ. Hybridization in a warmer world. Ecology Evolution, v. 4, p. 2019-2031, 2014.

CORRÊA RR, 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 CE, LIMA-NEIVA V, GUMIEL M, LIMA MM, MEDEIROS LMO, MENDONÇA VJ, ROSA JA, 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 CE, DUJARDIN JP, BEARD CB. 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.

DE VAIO ES; GRUCCI B; CASTAGNINO AM; FRANCA ME; MARTINEZ ME. Meiotic differences between three triatomine species (Hemiptera: Reduviidae). Genetica, v. 67, p. 185-191, 1985.

DÍAZ S, PANZERA F, JARAMILLO-O N, PÉREZ R, FERNÁNDEZ R, VALLEJO G, SALDAÑA A, CALZADA JE, 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.

DOBZHANSKY T. Genetics of the Evolutionary Process (New York: Columbia

University Press), pp. 71-93, 1970.

DORN PL, JUSTI SA, DALE C, STEVENS L, GALVÃO C, CORDON RL, MONROY C. Description of *Triatoma mopan* sp. n. (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) from a cave in Belize. *Zookeys*, v. 775, p. 69-95, 2018.

ENGELS WRP, Elements in *Drosophila melanogaster*. in: BERG, D.E. & HOWE, M.M. Mobile DNA, Washington, Amer. Soc. for Microb, 1989.

ESPÍNOLA HN. 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.

FRANCA-RODRÍGUEZ ME, YONGDG, 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.

GALÍNDEZ GI, BARAZARTE R, MÁRQUEZ J, OVIEDO M, MÁRQUEZ Y, MORÓN L, CARCAVALLO RU. 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.

GALVÃO C, Vetores da doença de chagas no Brasil. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014.

GARCÍA M, MENES M, DORN PL, MONROY C, RICHARDS B, PANZERA F, BUSTAMANTE DM. 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.

GARDIM S, ALMEIDA CE, TAKIYA DM, OLIVEIRA J, ARAÚJO RF, CICARELLI RMB, ROSA JA. 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.

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.

HYPSE V, TIETZ D, ZRZAVY J, REGO RO, 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.

INTERNATIONAL CODE ON ZOOLOGICAL NOMENCLATURE (ICZN), 1999. Disponível em: <http://www.nhm.ac.uk/hosted-sites/iczn/code/>, data de acesso: 20 de novembro de 2019.

JUSTI SA, GALVÃO C, SCHRAGO CG, Geological changes of the Americas and their Influence on the diversification of the Neotropical kissing bugs (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *PLoS Neglected Tropical Disease*, v. 10, p. e0004527, 2016.

JUSTI SA, RUSSO CAM, MALLET JRS, OBARA MT, GALVÃO C, Molecular phylogeny of Triatomini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Parasites & Vectors*, v. 7, p. 149, 2014.

KIDWELL MG, KIDWELL JF, Selection for male recombination in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, v. 84, p. 333-338, 1976.

LIMA-CORDÓN RA, MONROY MC, STEVENS L, RODAS A, RODAS GA, DORNI PL, JUSTI SA, Description of *Triatoma huehuetenanguensis* sp. n., a

potential Chagas disease vector (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Zookeys, v. 820, p. 51-70, 2019.

MARTÍNEZ-IBARRA J A, LV VENTURA-RODRÍGUEZ, K MEILLON-ISAIS, H BARAJAS-MARTÍNEZ, R ALEJANDRE-AGUILAR, P LUPERCIOCORONEL, ROCHA-CHÁVEZ, B NOGUEDA-TORRES, 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.

MARTÍNEZ-IBARRA JA, MORALES-CORONA ZY, MORENO-RUIZ MG, DEL RIEGO-RUIZ R, MUNDO-BARAJAS MA, 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 JA, NOGUEDA-TORRES B, SALAZAR-SCHETTINO PM, CABRERA-BRAVO M, VENCES-BLANCO MO, ROCHA-CHAVEZ G. Transmission Capacity of *Trypanosoma cruzi* (Trypanosomatida: Trypanosomatidae) by Three Subspecies of *Meccus phyllosomus* (Heteroptera: Reduviidae) and Their Hybrids. Medical and Veterinary Entomological, v. 53, p. 928-934, 2016.

MARTÍNEZ-IBARRA JA, Y GRANT-GUILLÉN, IN DELGADILLO-ACEVES, FA ZUMAYA-ESTRADA, G ROCHA-CHÁVEZ, PM SALAZAR-SCHETTINO, R ALEJANDRE-AGUILAR, G VILLALOBOS, B NOGUEDA-TORRES. 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., B. NOGUEDA-TORRES, J.C. GARCÍA-LINO, D. ARROYO-REYES, L.F. SALAZAR-MONTAÑO, J.Á. HERNÁNDEZ-NAVARRO,

C.G. DÍAZ-SÁNCHEZ, E.S. DEL TORO-ARREOLA, AND G. ROCHA-CHÁVEZ, Importance of hybrids of *Meccus phyllosomus mazzottii*, *M. p. pallidipennis* and *M. p. phyllosomus* in transmission of *Trypanosoma cruzi* in Mexico. *Japan. J. Infect. Dis.*, v. 69, p. 202–206, 2016.

MAYR E. *Animal Species and Evolution*. Harvard University Press, Cambridge, 1963. MAZZOTTI L, OSORIO MT. Resultados obtenidos en cruzamientos con especies diferentes de *Triatoma*. *Revista da Faculdade de Bogotá*, v. 10, p. 159-160, 1941.

MAZZOTTI L, OSORIO MT. Cruzamientos experimentales entre varias especies de triatomas. *Medicina*, v. 22, p. 215-222, 1942.

MENDONÇA VJ, ALEVI KCC, MEDEIROS LMO, 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). *Infection, Genetics and Evolution*, v. 26, p. 123- 131, 2002.

MENDONÇA VJ, ALEVI KCC, PINOTTI H, GURGEL-GONGALVES R, PITA S, GUERRA AL, PANZERA F, ARAÚJO RF, AZEREDO-OLIVEIRA MTV, ROSA JA. Revalidation of *Triatoma bahiensis* Sherlock & Serafim, 1967 (Hemiptera: Reduviidae) and phylogeny of the *T. brasiliensis* species complex. *Zootaxa*, v. 4107, p. 239-254, 2016.

NASCIMENTO JD, DA ROSA JA, SALGADO-ROA FC, HERNÁNDEZ C, PARDO-DIAZ C, ALEVI KCC, 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*, v. 14, p. e0211285, 2019. OLIVEIRA J, ALEVI KCC. 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.

NEVES JMS, SOUSA PS, OLIVEIRA J, RAVAZI A, MADEIRA FF, REIS YV, OLIVEIRA ABB, PINOTTI H, AZEREDO-OLIVEIRA MTV, ROSA JA, ALEVI KCC. Prezygotic isolation confirms the exclusion of *Triatoma melanocephala*, *T. vitticeps* e *T. tibiamaculata* of the *T. brasiliensis* subcomplex (Hemiptera, Triatominae). *Infection, Genetics and Evolution*, v. 79, p. 104149, 2020.

OLIVEIRA J, AYALA JM, JUSTI SA, ROSA JA, 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.

PANZERA F, FERREIRO MJ, PITA S, CALLEROS L, PÉREZ R, BASMADJIÁN Y, et al. Evolutionary and dispersal history of *Triatoma infestans*, main vector of Chagas disease, by chromosomal markers. *Infection Genetics and Evolution*, v. 27, p. 105–13, 2014.

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.

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.

PINTO C, 1927. Classification de genres d'hémiptères de la famille Triatomidae (Reduvidioidea). *Boletim Biológico*, v. 8, p. 103-114, 1927.

PITA S, LORITE P, NATTERO J, GALVÃO C, ALEVI KCC, TEVES SC, AZEREDO-OLIVEIRA MTV, 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.

ROSA JA, BARATA JMS, BARELLI N, SANTOS JLF, BELDA NETO FM, Sexual distinction between 5th instar nymphs of six species (Hemiptera: Reduviidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 87, p. 257-264, 1992.

RYCKMAN RE, 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.

SCHEREIBER G, PINHO AC, PARENTONI R, SALGADO AA, GODOI JR. TL, 1974. Cytogenetics of Triatominae: II Spermatogenesis in hybrid between *Triatoma infestans* and *Triatoma pseudomaculata* (Hemiptera, Reduviidae). *Revista Brasileira de Biologia*, v. 31, p. 1-9, 1974.

SCHOFIELD, C. J., GALVÃO, C, Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta tropica*, v. 110, p. 88-100, 2009.

SHERLOCK ÍA, GUITTON N, Fauna triatominae do estado da Bahia [Triatominae fauna of the State of Bahia], Brasil: IV. *Triatoma melanocephala* Neiva & Pinto, 1923. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 75, p. 23-31, 1980.

SVED JA, Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*: a possible explanation in terms of spatial organization of chromosomes. *Australian*

Journal of Biological Sciences, v. 29, p. 375-382, 1976.

TURELLI M, ORR HA, The dominance theory of Haldane's rule. Genetics, v. 140, p. 389-402, 1995.

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

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

USINGER RL, WYGODZINSKY RYCKMAN ER, The Biosystematics of Triatominae. Annual Review of Entomology, v. 11, p. 309-329, 1966

WHO - World Health Organization, Weekly Epidemiological Record, v. 90, p. 33-44, 2018.