



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

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

Natália Regina Cesaretto

***Triatoma vitticeps* (Stål, 1859) (Hemiptera, Triatominae): um
vetor da doença de Chagas ou um complexo de vetores?**

Botucatu
2020

Natália Regina Cesaretto

***Triatoma vitticeps* (Stål, 1859) (Hemiptera, Triatominae): um vetor da doença de Chagas ou um complexo de vetores?**

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

Cesaretto, Natália Regina.

Triatoma vitticeps (Stål, 1859) (Hemiptera, Triatominae) : um vetor da doença de Chagas ou um complexo de vetores? / Natália Regina Cesaretto. - 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. Barbeiro (Inseto). 3. Trypanosoma cruzi. 4. Taxonomia numérica. 5. Morfometria.

Palavras-chave: Cruzamentos experimentais; Híbridos; Morfometria geométrica; Taxonomia; Triatomíneos.

Natália Regina Cesaretto

***Triatoma vitticeps* (Stål, 1859) (Hemiptera, Triatominae): um vetor da doença de Chagas ou um complexo de vetores?**

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

Dedico esse trabalho e toda a minha vida, a Deus e aos meus pais, exemplo de caráter e humildade, Orides Maria Cristal Cesaretto e Mario Cesaretto. Agradeço por depositarem em mim toda confiança, por sempre me mostrarem a importância dos estudos e, principalmente, por acreditarem em mim.

Ao meu noivo Gustavo Henrique Soccheta, que não mediu esforços para realização deste sonho, e por não me deixar desistir.

Aos meus irmãos, Sandra Cristina Cesaretto Cristal, Márcio Antônio Cesaretto (*in memorian*) e Lúcia Helena Cesaretto Silveira, por sempre estarem ao meu lado e em meu coração.

Dedico, também, aos meus sobrinhos Heloisa, Daniel, Laura, Heitor e Alice por serem minha luz e alegria.

Aos meus cunhados, sogro e sogra por sempre me apoiarem.

Em especial, ao meu amigo, irmão e orientador de estudos e de vida, Prof. Dr. Kaio Cesar Chaboli Alevi, pela confiança, companheirismo e dedicação.

Mil vidas seriam necessárias para agradecê-los. Amo vocês!

Agradecimentos

Em honra àqueles que melhoram minha concepção, deixando um pouco de si, meu eterno agradecimento:

Aos responsáveis pela minha conduta de vida, Pai, Filho, Espírito Santo e Nossa Senhora.

Aos meus pais, que de forma singular me mostraram os verdadeiros valores do ser humano.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Kaio Cesar Chaboli Alevi, pela amizade, confiança e companheirismo. Obrigada por acreditar em mim.

Ao meu noivo, companheiro e amigo Gustavo Henrique Soccheta e aos nossos filhos de pelo, Mel, Bela, Nego, Branco (*in memorian*), Tica, Sabrina e Sonora.

Aos meus irmãos, cunhados, sobrinhos, a minha sogra e meu sogro, por torcerem sempre pelo meu sucesso.

A todos os meus professores e a FCAV – UNESP, Jaboticabal por minha formação profissional e pessoal, onde formei a minha segunda família.

Agradeço também os meus companheiros de estrada e de vida, Dandrea Mirela Duran Seccoti e Luiz Antonio Filho, que sempre estiveram ao meu lado durante idas e vindas para São José do Rio Preto, tornando elas, horas de alegria e descontração.

A todos os meus familiares que torcem pelo meu sucesso, não podendo deixar de citar o Danilo Cristal (Délo) e Maria Eduarda da Silva Correa Luz (Duda).

A Aparecida Christal (Cida), pelas preces e orações.

Ao Paulo, companheiro de Mestrado, e a todos os amigos que contribuíram para a minha formação pessoal e profissional ao longo dessa caminhada.

Ao Me. Tiago Belintani pela realização das análises de morfometria e morfometria geométrica nas populações de *T. vitticeps*.

Agradeço também aos membros da banca examinadora, Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira e Prof. Dr. Luís Lenin Vicente Pereira, pela disponibilidade e atenção.

Meu muito obrigado! Sem vocês eu não teria conseguido...

Entrega o teu caminho ao Senhor, confia Nele, e Ele o fará.

(Salmos 37:5)

Sumário

1. Introdução.....	12
2. Objetivos.....	21
2.1. Objetivo Geral.....	21
2.2. Objetivos Específicos.....	22
3. Material e Métodos.....	22
3.1. Análises de Morfometria Geométrica.....	22
3.2. Delineamento dos Cruzamentos Experimentais.....	24
3.3. Cruzamentos Experimentais.....	27
3.4. Análises Citogenéticas.....	28
4. Resultados.....	28
4.1. Morfometria Geométrica.....	28
4.2. Cruzamentos Experimentais.....	30
4.3. Regra de Haldane.....	34
4.4. Análises Citogenéticas.....	34
5. Discussão.....	37
6. Conclusão.....	40
7. Referências Bibliográficas.....	40

Lista de abreviaturas

ES – Espírito Santo

RJ – Rio de Janeiro

MG – Minas Gerais

BA – Bahia

T. – *Triatoma*

F1 – Primeira geração híbrida

F2 – Segunda geração híbrida

F3 – Terceira geração híbrida

ACP – Análise multivariada de componentes principais

CP1 – Componente Principal 1

CP2 – Componente Principal 2

N1 - Ninfas de primeiro instar

N5 – Ninfas de quinto instar

P – Cruzamentos experimentais entre os parentais nas duas direções

Resumo

Análises da distância genética de genes mitocondriais *16S*, *Cyt b* e *COI* de *Triatoma vitticeps* provenientes de Minas Gerais (MG), Rio de Janeiro (RJ) e Espírito Santo (ES) revelaram alta distância intraespecífica, o que acarretou na hipótese de que, possivelmente, *T. vitticeps* possa ser um complexo de espécies (ou subespécies) crípticas. A realização de cruzamentos experimentais pode auxiliar em diferentes aspectos, como no entendimento da taxonomia, sistemática e dos mecanismos de isolamento que limitam o fluxo gênico, assim como possibilita avaliar o papel da hibridação natural na geração de novas variantes genéticas (que podem levar à evolução adaptativa e/ou a fundação de novas linhagens evolutivas). Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo analisar se *T. vitticeps* representa apenas uma espécie ou um complexo de espécies, por meio de análises morfométricas da cabeça de fêmeas, por cruzamentos experimentais e pela análise dos híbridos resultantes, com ênfase na dinâmica evolutiva dos cruzamentos experimentais (cópula, oviposição, eclosão e desenvolvimento dos híbridos). Os estudos morfométricos e os cruzamentos experimentais sinalizam que *T.vitticeps* do ES representa um novo táxon. Barreiras pré e/ou pós-zigóticas associadas com incompatibilidades genômicas, mortalidade do híbrido dentro dos ovos e esterilidade do híbrido proveniente de erros cromossômicos foram observadas entre *T. vitticeps* do ES quando cruzado com *T. vitticeps* de MG e RJ (em pelo menos uma direção), o que satisfaz o conceito biológico de espécie. Com base no exposto, é possível destacar que *T. vitticeps* do ES representa uma nova espécie de triatomíneo.

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

Abstract

Analysis of the genetic distance of 16S, Cyt b and COI mitochondrial genes of *Triatoma vitticeps* from Minas Gerais (MG), Rio de Janeiro (RJ) and Espírito Santo (ES) revealed a high intraspecific distance, which led to the hypothesis that, possibly, *T. vitticeps* may be a complex of cryptic species (or subspecies). Experimental crosses can help in different aspects, such as understanding taxonomy, systematics and the isolation mechanisms that limit gene flow, as well as assessing the role of natural hybridization in the generation of new genetic variants (which can lead to evolution adaptive and/or the foundation of new evolutionary lineages). Thus, the present work aimed to analyze whether *T. vitticeps* represents only one species or a complex of species, by means of morphometric analysis of the female head, by experimental crosses and by the analysis of the resulting hybrids, with emphasis on the evolutionary dynamics experimental crosses (copulation, oviposition, hatching and hybrid development). Morphometric studies and experimental crosses indicate that *T.vitticeps* from ES represents a new taxon. Pre and/or post-zygotic barriers associated with genomic incompatibilities, mortality of the hybrid inside the eggs and hybrid sterility from crossomomic errors were observed between *T. vitticeps* from ES when crossed with *T. vitticeps* from MG and RJ (in at least one direction), which satisfies the biological concept of species. Based on the above, it is possible to highlight that *T. vitticeps* from ES represents a new species of triatomine.

Keywords: Triatomines; Taxonomy; Hybrids; Experimental crossings; Geometric Morphometry; Chagas disease

1. INTRODUÇÃO

Os triatomíneos (Hemiptera, Triatominae) são insetos hematófagos de grande importância epidemiológica, pois são considerados como a principal forma de transmissão do protozoário *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), agente etiológico da doença de Chagas (WHO, 2018). Essa doença é negligenciada, não tem cura na fase crônica, atinge cerca de oito milhões de chagásicos e coloca em risco de infecção, aproximadamente, 25 milhões de pessoas no mundo, sendo o tratamento com os antiparasitários (Benznidazol e Nifurtimox) efetivo apenas na fase aguda da doença (que, na maioria dos casos, é assintomática) (WHO, 2018).

Atualmente, existem 154 espécies descritas na subfamília Triatominae (sendo 151 espécies vivas e três espécies fósseis), 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). Embora existam espécies com maior ou menor grau de importância na transmissão da doença de Chagas [com destaque para *Triatoma infestans* Klug, 1834, *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835), *T. brasiliensis* Neiva, 1911, *T. pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964 e *T. sordida* (Stål, 1859) que apresentam maiores competências vetoriais no Brasil (GALVÃO, 2014)], todos os triatomíneos, de ambos os sexos e em qualquer fase do desenvolvimento após o primeiro repasto sanguíneo são considerados como potenciais vetores dessa doença.

Triatoma vitticeps (Stål, 1859) é uma espécie endêmica do Brasil [presente na Bahia (BA), Espírito Santo (ES), Minas Gerais (MG) e Rio de Janeiro (RJ)] (GALVÃO, 2014) que apesar de ter sido inicialmente caracterizada como silvestre (GONÇALVES

et al., 2000), existe relatos de adultos formando colônias em regiões domiciliares (SANTOS et al., 2005) e, sobretudo, de exemplares infectados com *T. cruzi* capturados em residências (GONÇALVES et al., 1998; LOROSA et al., 2003), ressaltando a importância vetorial desse triatomíneo para a doença de Chagas.

Recentemente, Alevi e colaboradores (2018a) analisaram populações de *T. vitticeps* provenientes de MG, RJ e ES, por meio de marcadores mitocondriais (genes *16S*, *Cyt b* e *COI*) e análises citogenéticas (cariótipo e padrão de heterocromatina constitutiva). Apesar da ausência de variações cromossômicas intraespecíficas, as análises moleculares demonstraram alta distância genética entre *T. vitticeps* das diferentes localidades (Tabela 1), o que levou os autores a sugerir que, possivelmente, *T. vitticeps* possa ser um complexo de espécies (ou subespécies) crípticas.

Tabela 1. Distâncias genéticas dos genes mitocondriais *16S*, *Cyt b* e *COI* para *T. vitticeps* provenientes do ES, RJ e MG (ALEVI et al., 2018a).

<i>T. vitticeps</i>	Espírito Santo	Rio de Janeiro	Minas Gerais
Espírito Santo	-	-	-
	Cyt b (5%)		-
Rio de Janeiro	COI (6,8%), 16S (3,1%)	-	
	Cyt b (6,7%)	Cyt b (6,3%)	
Minas Gerais	COI (7,2%) 16S (2,3%)	COI (7,5%) 16S (2,3%)	-

A distância genética tem sido uma ferramenta importante e efetiva para Triatominae, por exemplo, o *status* específico de *T. pintodiasi* Jurberg e colaboradores (2013), espécie afim de *T. circummaculata* (Stål, 1859), foi corroborado pela análise da distância do gene *16S* (ALEVI et al., 2017). Além desses autores, Panzera et al. (2015) sugeriram especiação críptica para *T. sordida* pela análise com o gene *COI*. Abad-Franch e colaboradores (2013) também utilizaram a alta distância genética para o gene *cyt b* observada entre *Rhodnius barretti* Abad-Franch et al. (2013) e as outras espécies de *Rhodnius* Pinto, 1926 agrupadas na linhagem *prolixus*, para caracterizar a espécie nova. No entanto, realizar cruzamentos experimentais pode auxiliar diretamente no estudo taxonômico desses vetores.

Mendonça et al. (2016), por exemplo, avaliaram parâmetros morfológicos, morfométricos, citogenéticos e moleculares (gene *cyt b*) para validar o *status* específico de *T. bahiensis* Sherlock & Serafim, 1967 [espécie que havia sido sinonimizada com *T. lenti* Sherlock & Serafim, 1967 (LENT e WYGODZINSKY, 1979)]. Dessa forma, como as características citogenéticas, morfológicas e morfométricas foram muito sutis e a distância genética não foi alta (2,48%), os autores realizaram cruzamentos experimentais e observaram barreiras reprodutivas que viabilizassem a revalidação do táxon.

O *status* específico de diversas espécies agrupadas nos subcomplexos *T. brasiliensis* (COSTA et al., 2003, 2009; CORREIA et al., 2013; MENDONÇA et al., 2014, 2016; ALEVI et al., 2018b), *Meccus phyllosoma* (MARTÍNEZ-IBARRA et al., 2005, 2008, 2011) e *T. dimidiata* (GARCÍA et al., 2013), por exemplo, também foram corroborados por meio de cruzamentos experimentais. Com base no exposto, fica claro que a realização de cruzamentos experimentais e a análise dos híbridos, com ênfase na

taxa de eclosão e mortalidade, bem como na viabilidade reprodutiva e proporção entre machos e fêmeas [uma vez que a regra de Haldane prediz que caso haja eclosão de híbridos, o sexo heterogamético (XY) é o primeiro afetado pelos eventos evolutivos que inviabilizam ou levam a esterilidade desse organismo (TURELLI e ORR, 1995)] 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)”.

Classificar corretamente esses vetores permite que espécies de importância primária (geralmente associadas a regiões domiciliares) e secundária (geralmente silvestres) para a transmissão do *T. cruzi* sejam diferenciadas (DIAS e SCHOFIELD, 1998), o que pode direcionar as atividades dos programas de controle de vetores. Como exemplo, pode-se destacar a importância da aplicação de cruzamentos experimentais e análise dos híbridos para ressaltar o *status* específico de *T. petrocchia* Pinto & Barretto, 1925 (ESPÍNOLA, 1971), pois, por muito tempo, essa espécie foi considerada como sinônima de *T. brasiliensis* (LUCENA, 1970). No entanto, do ponto de vista epidemiológico, enquanto *T. petrocchia* é considerada, até o momento, silvestre e sem importância vetorial, *T. brasiliensis* é a principal espécie vetora da doença de Chagas no nordeste brasileiro (GALVÃO, 2014).

Diversos outros exemplos de cruzamentos experimentais podem ser observados em triatomíneos (Tabela 2) (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). 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 pode ajudar a compreender a sistemática deste grupo de vetores, pode ser usado para analisar os mecanismos de isolamento que limitam o fluxo gênico entre as diferentes espécies, assim como pode ser empregada para estabelecer o papel da hibridação natural na geração de novas variantes que podem levar à evolução adaptativa e/ou a fundação de novas linhagens evolutivas (ARNOLD, 1997; PÉREZ et al., 2005).

Tabela 2. Cruzamentos experimentais realizados na subfamília Triatominae.

Cruzamentos experimentais				Resultados
	<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 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. macromesoma</i>	♀	F1 e F2
♂	<i>Triatoma b. macromesoma</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. macromesoma</i>	X	<i>Triatoma melanica</i>	♀	F1 e F2
♂	<i>Triatoma melanica</i>	X	<i>Triatoma b. macromesoma</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. macromesoma</i>	X	<i>Triatoma juazeirensis</i>	♀	F1 e F2
♂	<i>Triatoma juazeirensis</i>	X	<i>Triatoma b. macromesoma</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.

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

a) Isolamento ecológico

Como exemplo clássico para esse tipo de isolamento reprodutivo, podemos utilizar *T. infestans* e *T. platensis* Neiva, 1913 que são espécies que derivaram de um

ancestral comum (JUSTI et al., 2014), mas apresentam hábitos diferentes, a saber, *T. infestans* está associado a regiões domiciliares e se alimenta de sangue de mamíferos (GALVÃO, 2014) e *T. platensis* está associado com ninhos de aves e se alimenta, preferencialmente, do sangue desses vertebrados (ABALOS e WYGODZINSKY, 1951). O único elo que permite a relação entre essas espécies são os galinheiros (ABALOS, 1948; BARRETTO, 1976).

b) Isolamento mecânico

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

c) Isolamento gamético

Embora nunca analisado entre os triatomíneos, esse tipo de isolamento pré-zigótico pode ser o mecanismo que inviabiliza a produção de híbridos em diversos cruzamentos experimentais, como, por exemplo, entre *T. lenti* e *T. infestans* (CERQUEIRA, 1982) e entre *T. brasiliensis* e *T. petrocchiai* (ESPÍNOLA, 1971), pois, equivocadamente, quando os cruzamentos não resultam em híbridos (mesmo que em apenas uma das direções), é sugerido que a incompatibilidade das genitálias tenha ocorrido entre os parentais, sem que a morfologia dos gametas ou, até mesmo, das genitálias seja analisada.

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

a) Inviabilidade do híbrido

Embora os mecanismos pré-zigóticos não tenham inviabilizado a produção de híbridos, nesse tipo de isolamento os híbridos que eclodem dos ovos têm viabilidade extremamente reduzida (baixo valor adaptativo), não chegando até a fase adulta da primeira geração (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 que é extremamente importante do ponto de vista taxonômico, pois ressalta o *status* de cada gênero [o gênero *Meccus* Stål, 1859, por exemplo, por muito tempo, foi considerado como *Triatoma* Laporte, 1832 (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 a segunda geração híbrida (F2), pois são estéreis (disgenesia gonadal) ou produzem gametas inviáveis (resultantes de anomalias cromossômicas durante a espermatogênese), como acontece, por exemplo, para os híbridos resultantes entre o cruzamento experimental entre *T. infestans* e *T. rubrovaria* (Blanchard, 1843) (que apresentam ausência de pareamento ou pareamento trivalente entre os cromossomos homeólogos) (PÉREZ et al., 2005), assim como para os híbridos do cruzamento entre *T.*

sordida e *T. pseudomaculata* (que apresentaram espermátides e espermatozoides gigantes e anômalos) (SCHREIBER et al., 1975).

c) Desmoronamento do híbrido

Esse tipo de isolamento pós-zigótico foi recentemente descrito para os triatomíneos e está relacionado com a inviabilidade híbrida a partir da F2, ressaltando a importância das análises da viabilidade híbrida até, pelo menos, a F3 antes de sugerir eventos de sinonimização entre espécies de triatomíneos que não apresentaram isolamento reprodutivo. Mendonça et al. (2014) analisaram a espermatogênese de híbridos em F1 [resultantes do cruzamento experimental entre *T. lenti* e *T. sherlocki* Papa et al. (2002)] e observaram 100% de pareamento entre os cromossomos homeólogos. No entanto, quando os autores analisaram o grau de pareamentos em F2, observaram erros nos pareamentos de diversos cromossomos (univalentes), por incompatibilidade genética, o que resulta em gametas inviáveis (fenômeno confirmado pela taxa de eclosão dos ovos que resultariam em F3).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar se *T. vitticeps* representa apenas uma espécie ou um complexo de espécies, por meio de estudos morfométricos, cruzamentos experimentais e análise das possíveis barreiras de isolamento reprodutivo (pré e pós-zigóticas).

2.2 Objetivos específicos

- a. Analisar a morfometria geométrica da cabeça de *T. vitticeps* proveniente dos estados de RJ, MG e ES;
- b. 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;
- c. Avaliar a aplicação da regra de Haldane em cada direção dos cruzamentos experimentais;
- d. 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;
- 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 Análise da morfometria geométrica

Espécimes fêmeas adultas de cada localidade [ES (n=12) proveniente de Garapari/ES, MG (n=15), MG com variação cromática (MG 2) (n=11) e RJ (n=11) proveniente de Santa Maria Madalena/RJ] mantidas em colônias vivas no Insetário de Triatominae da FACFAR/UNESP, Araraquara, São Paulo foram utilizadas no estudo da morfometria geométrica da cabeça. Essas análises foram realizadas de acordo com Oliveira et al. (2017): as imagens foram feitas em Microscópio Estereoscópio Leica MZ 250 com sistema de análise de imagem *Motic Advanced 3.2 plus* acoplado. Posteriormente, por meio do *software tpsDig* [*tpsDig* 2.32 (ROHLF, 1999)], foram estabelecidos dez pontos anatômicos de referências (*Landmarks*) como coordenada para

as análises morfométricas (Figura 1). Na sequência, as coordenadas foram incluídas em um método ortogonal generalizado de superposição de mínimos quadrados de “Procrustes”, a fim de ajustar as figuras sobre um ponto comum (tamanho centroide), por meio de movimentos de rotação, translação e escalamento. Para cada espécime, foi calculado o tamanho centroide e, componentes uniformes X e Y, onde o componente uniforme X mostrou o esticamento ao longo do eixo X da configuração e, o componente Y explica a dilatações ou compressões ao longo do eixo Y. As coordenadas foram submetidas a uma análise multivariada de componentes principais (ACP). A partir dos ACP obtidos nas análises foi construído um mapa fatorial com os dois primeiros ACP [“eigenvalues”, Componente Principal 1 (CP1) e Componente Principal 2 (CP2)] e um fenograma de similaridade morfológicas com base nas distâncias de Mahalanobis resultantes das análises discriminantes. Todas as análises foram realizadas no *software MorphoJ* (KLINGENBERG, 2011).

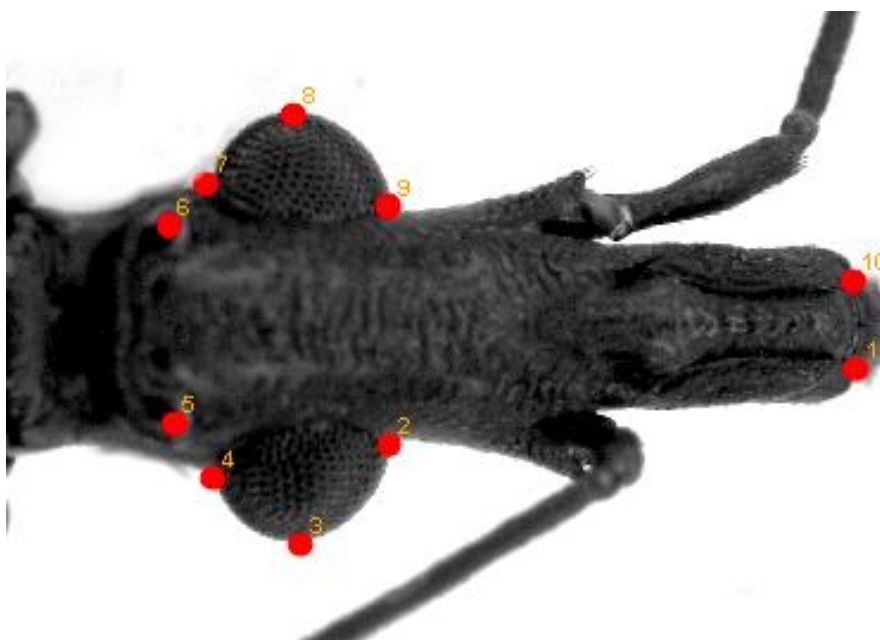


Figura 1: Cabeça de *T. vitticeps*: 1-10 círculos vermelhos representam os marcos anatômicos de referência (*Landmarks*) (BELINTANI et al., 2021).

3.2 Delineamento dos cruzamentos experimentais

O experimento foi realizado no Insetário de Triatominae da FCFAR/UNESP, Araraquara que apresenta toda a infraestrutura e biossegurança necessária para a realização do projeto de pesquisa. Os cruzamentos experimentais entre *T. vitticeps* provenientes dos estados de MG, RJ, ES (exemplares da BA não foram utilizados pela indisponibilidade desses insetos nos insetários de Triatominae do Brasil) foram realizados em ambas as direções (Figura 2A) [assim como cruzamentos entre os parentais provenientes do mesmo estado também foram realizados e utilizados como parâmetro de comparação (grupo controle) (MARTINEZ-IBARRA et al., 2008)]. Para garantir que toda a prole fosse resultante do cruzamento experimental, ninfas de quinto instar (N5) machos e fêmeas [caracterizadas de acordo com a metodologia de Rosa et al. (1992)] para ambas as espécies parentais foram utilizadas (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 cilindro de papelão (para maior movimentação e facilidade na alimentação desses insetos) (BELISÁRIO et al., 2007) (Figura 3), em temperatura ambiente e foram alimentados semanalmente com sangue de roedor (rato e/ou camundongo).

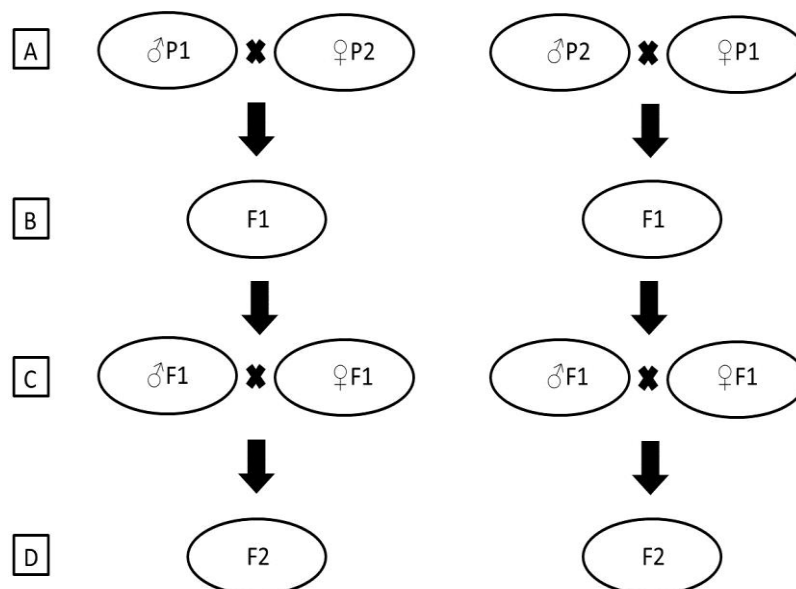


Figura 2. Fluxograma representando os cruzamentos experimentais que foram realizados durante o experimento. A: Cruzamentos experimentais entre os parentais (P), nas duas direções. B: Híbridos que eclodiram dos cruzamentos experimentais (F1). C: Cruzamentos experimentais que foram realizados entre os híbridos (F1) provenientes de cada geração. D: Segunda geração híbrida (F2) que poderá eclodir, caso não exista barreira intraespecífica pré ou pós-zigótica para *T. vitticeps* dos diferentes estados.

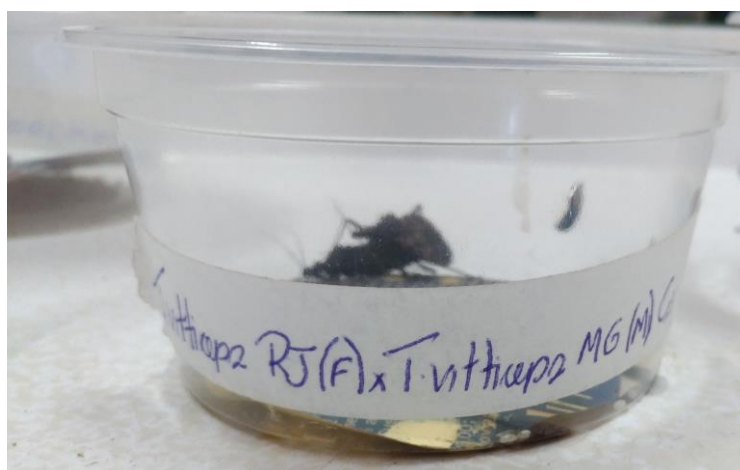


Figura 3. Exemplo de recipiente em que os cruzamentos experimentais entre *T. vitticeps* de diferentes estados foram realizados.

Os casais foram acompanhados rotineiramente para análise e possível fotodocumentação das cópulas, assim como realizado por Campos-Soto et al. (2016). Além disso, semanalmente os ovos foram coletados, contabilizados e separados em um novo cristalizador para avaliar a taxa de eclosão. Com a eclosão das ninfas, o desenvolvimento (N1 até N5) e a taxa de mortalidade também foram acompanhados semanalmente (BELISÁRIO et al., 2007). Após os híbridos F1 (Figura 2B) atingirem a N5, três casais de ninfas resultantes de cada direção dos cruzamentos experimentais foram separados em potes de plástico para realização dos novos cruzamentos (Figura 2C) e obtenção de F2 (Figura 2D), sendo os mesmos parâmetros, descritos acima, utilizados na avaliação.

Esses cruzamentos foram acompanhados e as ninfas F1 foram mantidas isoladas (Figura 2) 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)] seja avaliada, ou seja, a viabilidade/fertilidade dos machos híbridos será especificamente avaliada em cada geração dos cruzamentos, pois caso os machos híbridos estejam presentes, mas estéreis, as análises citogenéticas das gônadas permitirão demonstrar as alterações cromossômicas e meióticas relacionadas à regra de Haldane. Justificamos que para todos os dados quantitativos coletados, a frequência relativa (%) foi calculada.

3.3 Cruzamentos experimentais

Cruzamento 1

♂	<i>T. vitticeps</i> RJ	X	<i>T. vitticeps</i> ES	♀
♂	<i>T. vitticeps</i> ES	X	<i>T. vitticeps</i> RJ	♀

Cruzamento 2

♂	<i>T. vitticeps</i> RJ	X	<i>T. vitticeps</i> MG	♀
♂	<i>T. vitticeps</i> MG	X	<i>T. vitticeps</i> RJ	♀

Cruzamento 3

♂	<i>T. vitticeps</i> MG	X	<i>T. vitticeps</i> ES	♀
♂	<i>T. vitticeps</i> ES	X	<i>T. vitticeps</i> MG	♀

Cruzamento 4

♂	<i>T. vitticeps</i> MG	X	<i>T. vitticeps</i> MG	♀
---	------------------------	---	------------------------	---

Cruzamento 5

♂	<i>T. vitticeps</i> ES	X	<i>T. vitticeps</i> ES	♀
---	------------------------	---	------------------------	---

Cruzamento 6

♂	<i>T. vitticeps</i> RJ	X	<i>T. vitticeps</i> RJ	♀
---	------------------------	---	------------------------	---

3.4 Análises citogenéticas

Dez híbridos machos adultos de cada cruzamento 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)]. 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.

4. RESULTADOS

4.1 Morfometria geométrica

Os resultados das análises dos ACP para fêmeas de *T. vitticeps* do RJ, ES, MG e MG 2 demonstram que os valores de CP1 e CP2 foram de 73,43% e 18,14%, respectivamente. Esses valores juntos, correspondem a 85,8% da variabilidade total da forma e tamanho da cabeça, permitindo a distinção de, pelo menos, um novo táxon (*T. vitticeps* do ES) dentro do que hoje se denomina *T. vitticeps* (Figura 4).

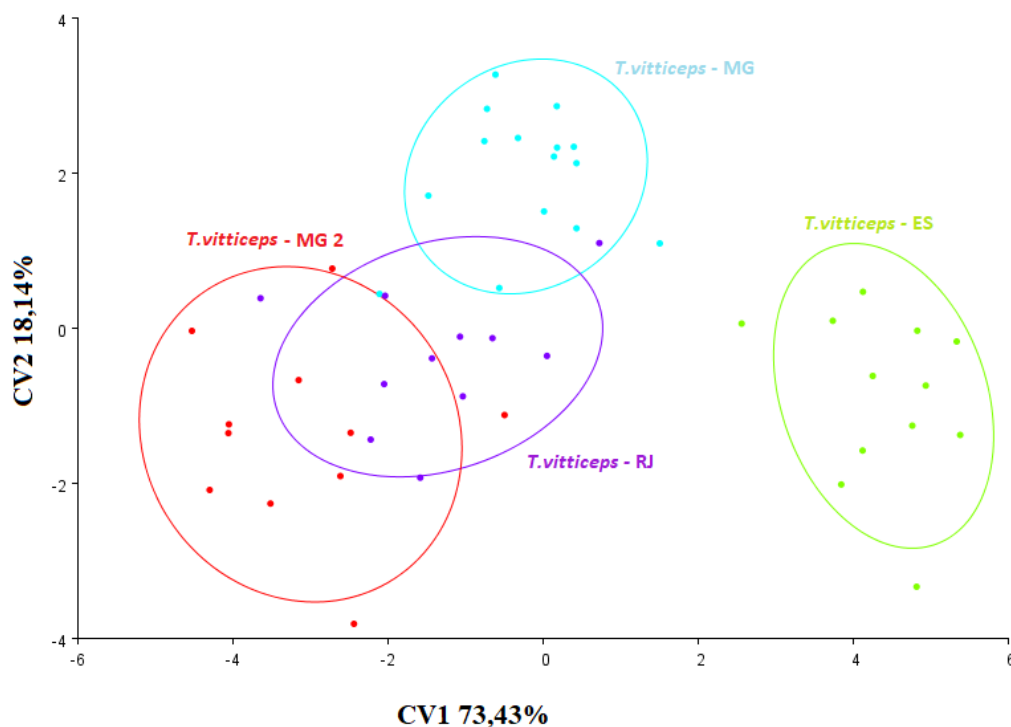


Figura 4. Diagrama de dispersão mostrando a variação de forma das cabeças de fêmeas em relação à análise de componentes principais (ACP). Os eixos representam o componente principal 1 (CP1) e o componente principal 2 (CP2) derivados da análise das deformações parciais de *T. vitticeps* Espírito Santo (ES) (círculo verde), *T. vitticeps* Minas Gerasi (MG) (círculo esmeralda), *T. vitticeps* Rio de Janeiro (RJ) (círculo roxo) e *T. vitticeps* Minas Gerais 2 (MG 2) (círculo vermelho) (BELINTANI et al., 2021).

Além disso, análises de discriminação entre as populações foram realizadas, por meio dos valores das distâncias de Mahalanobis (Figura 5). Os valores das baixas probabilidades para cada combinação indicam que as separações dos grupos possuem poucas chances de terem ocorrido ao acaso. Assim, pode-se observar a distância entre as populações nos fenogramas de similaridade morfológicas construídos com base nas distâncias de Mahalanobis, notando-se que, por meio dos valores estimados, temos dois

clados distintos, sendo que o primeiro agrupa os espécimes de *T. vitticeps* do RJ, MG e MG 2 e o segundo agrupa *T. vitticeps* ES (Figura 5), confirmando que *T. vitticeps* ES representa uma nova espécie.

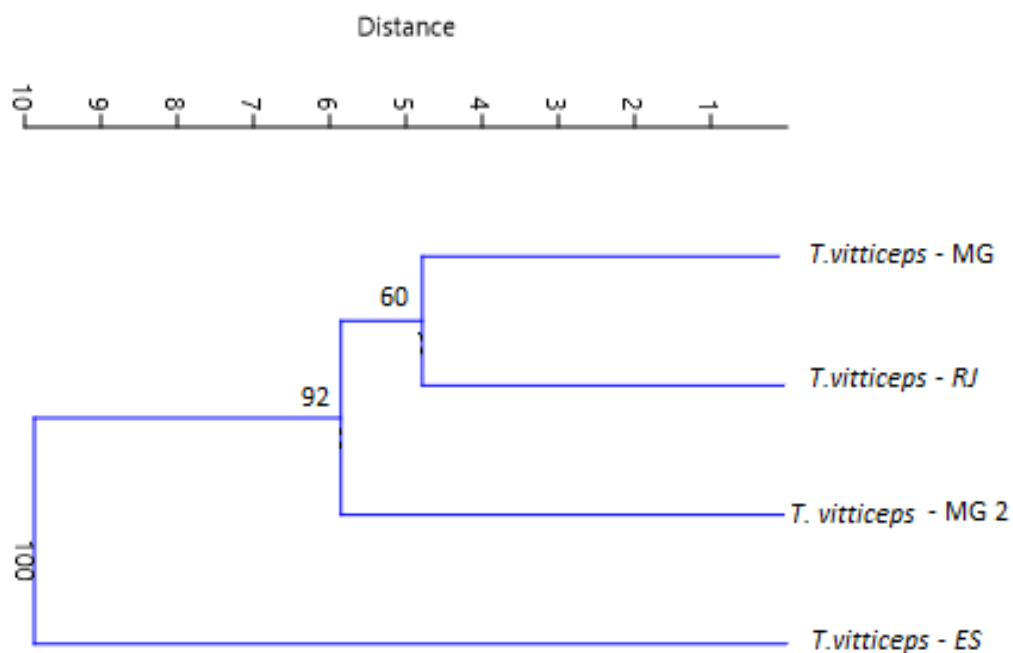


Figura 5. Fenograma de similaridade morfológica gerado por meio dos valores da distância Mahalanobis obtida nas análises discriminantes (BELINTANI et al., 2021).

4.2 Cruzamentos experimentais

Cruzamentos experimentais entre *T. vitticeps* provenientes dos estados de MG, RJ e ES foram realizados em ambas as direções (Tabela 3).

Tabela 3. Cruzamentos experimentais realizados entre *T. vitticeps* provenientes de MG, RJ e ES.

Cruzamentos experimentais	Número de ovos	Número de ninfas	Taxa de eclosão
Intraespecíficos (diferentes localidades)			
♀ <i>T. vitticeps</i> ES x <i>T. vitticeps</i> MG ♂	486	102	21%
♀ <i>T. vitticeps</i> MG x <i>T. vitticeps</i> ES ♂	379	145	38%
♀ <i>T. vitticeps</i> ES x <i>T. vitticeps</i> RJ ♂	528	309	58%
♀ <i>T. vitticeps</i> RJ x <i>T. vitticeps</i> ES ♂	393	151	38%
♀ <i>T. vitticeps</i> RJ x <i>T. vitticeps</i> MG ♂	758	329	43%
♀ <i>T. vitticeps</i> MG x <i>T. vitticeps</i> RJ ♂	517	286	55%
Intercruzamentos (F1)			
♀ Híbrido x Híbrido ♂ ¹	214	60	28%
♀ Híbrido x Híbrido ♂ ²	133	0	0%
♀ Híbrido x Híbrido ♂ ³	284	11	4%
♀ Híbrido x Híbrido ♂ ⁴	213	97	45%
♀ Híbrido x Híbrido ♂ ⁵	195	56	29%
♀ Híbrido x Híbrido ♂ ⁶	172	91	53%
Intraespecíficos (controle)			
♀ <i>T. vitticeps</i> ES x <i>T. vitticeps</i> ES ♂	340	221	65%
♀ <i>T. vitticeps</i> MG x <i>T. vitticeps</i> MG ♂	355	245	69%
♀ <i>T. vitticeps</i> RJ x <i>T. vitticeps</i> RJ ♂	353	249	70%

*Cruzamentos em andamento; ¹Cruzamento entre híbridos provenientes do cruzamento entre ♀ *T. vitticeps* ES x *T. vitticeps* MG ♂, ²Cruzamento entre híbridos provenientes do cruzamento entre ♀ *T. vitticeps* MG x *T. vitticeps* ES ♂, ³Cruzamento entre híbridos provenientes do cruzamento entre ♀ *T. vitticeps* ES x *T. vitticeps* RJ ♂, ⁴Cruzamento entre híbridos provenientes do cruzamento entre ♀ *T. vitticeps* RJ x *T. vitticeps* ES ♂, ⁵Cruzamento entre híbridos provenientes do cruzamento entre ♀ *T. vitticeps* RJ x *T. vitticeps* MG ♂, ⁶Cruzamento entre híbridos provenientes do cruzamento entre ♀ *T. vitticeps* MG x *T. vitticeps* RJ ♂.

Cópulas entre *T. vitticeps* de diferentes localidades foram observadas (Figura 6) e híbridos F1 foram obtidos para todas as direções (Figura 7), demonstrando que não existe barreira pré-zigótica instalada entre *T. vitticeps* do ES, MG e RJ.

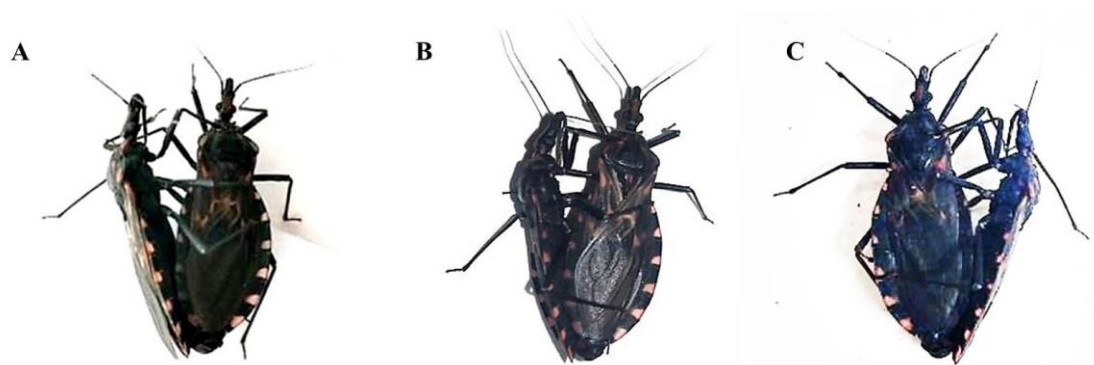


Figura 6. Cópulas observadas entre *T. vitticeps* de diferentes localidades: (A) ♀ *T. vitticeps* MG x *T. vitticeps* RJ ♂, (B) ♀ *T. vitticeps* ES x *T. vitticeps* RJ ♂ e (C) ♀ *T. vitticeps* ES x *T. vitticeps* MG ♂.

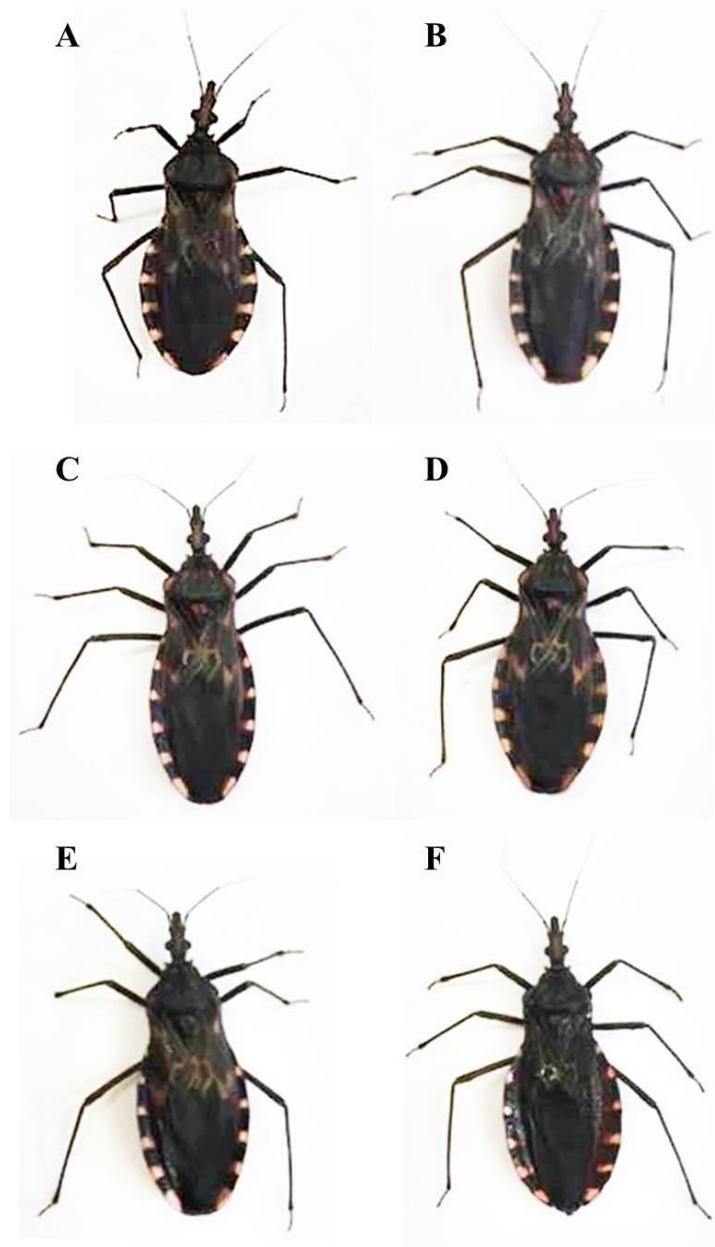


Figura 6. Híbridos provenientes dos cruzamentos entre (A) ♀ *T. vitticeps* RJ x *T. vitticeps* MG ♂, (B) ♀ *T. vitticeps* MG x *T. vitticeps* RJ ♂, (C) ♀ *T. vitticeps* ES x *T. vitticeps* RJ ♂, (D) ♀ *T. vitticeps* RJ x *T. vitticeps* ES ♂, (E) ♀ *T. vitticeps* MG x *T. vitticeps* ES ♂ e (F) ♀ *T. vitticeps* ES x *T. vitticeps* MG ♂.

No entanto, a baixa fertilidade (em pelo menos uma direção) observada para o cruzamento inicial entre *T. vitticeps* do ES com MG e, principalmente, entre o

intercruzamento da prole F1 provenientes do cruzamento ente ES com MG e RJ (Tabela 3) demonstra que existem barreiras pós-zigóticas atuando entre esses triatomíneos, confirmando, mais uma vez, que *T. vitticeps* do ES representa um novo táxon.

4.3 Regra de Haldane

A partir da sexagem da prole F1, não foi possível aplicar a regra de Haldane para os cruzamentos de *T. vitticeps* (Tabela 4), pois a proporção entre fêmeas e machos foi maior do que 80% para toda a F1 obtida.

Tabela 4. 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. vitticeps</i> ES x <i>T. vitticeps</i> MG ♂	79	58	136%
♀ <i>T. vitticeps</i> MG x <i>T. vitticeps</i> ES ♂	30	34	88%
♀ <i>T. vitticeps</i> ES x <i>T. vitticeps</i> RJ ♂	14	14	100%
♀ <i>T. vitticeps</i> RJ x <i>T. vitticeps</i> ES ♂	59	50	118%
♀ <i>T. vitticeps</i> RJ x <i>T. vitticeps</i> MG ♂	46	35	131%
♀ <i>T. vitticeps</i> MG x <i>T. vitticeps</i> RJ ♂	87	66	132%

4.4 Análises citogenéticas

A análise citogenética dos híbridos provenientes do cruzamento entre ♀ *T. vitticeps* ES x *T. vitticeps* MG ♂ possibilitou observar tanto metáfases com 100% de pareamento entre os cromossomos homeólogos (Figura 7A), como metáfases com erros de pareamento entre os autossomos (Figura 7B, setas). Por outro lado, todas as

metáfases dos híbridos machos adultos provenientes do cruzamento entre ♀ *T. vitticeps* MG x *T. vitticeps* ES ♂ demonstraram erros de pareamento entre três pares de autossomos (Figura 7C, setas). Já os híbridos machos resultantes do cruzamento entre ♀ *T. vitticeps* ES x *T. vitticeps* RJ ♂ apresentaram metáfases com erro de pareamento entre os homeólogos (Figura 7D, setas) e metáfases com 100% de pareamento (Figura 7E). Por fim, os machos híbridos provenientes dos cruzamentos entre ♀ *T. vitticeps* RJ x *T. vitticeps* ES ♂ (Figura 7F), ♀ *T. vitticeps* RJ x *T. vitticeps* MG ♂ (Figura 7G) e ♀ *T. vitticeps* MG x *T. vitticeps* RJ ♂ (Figura 7H e 7I) apresentaram 100% de pareamento entre os cromossomos homeólogos.

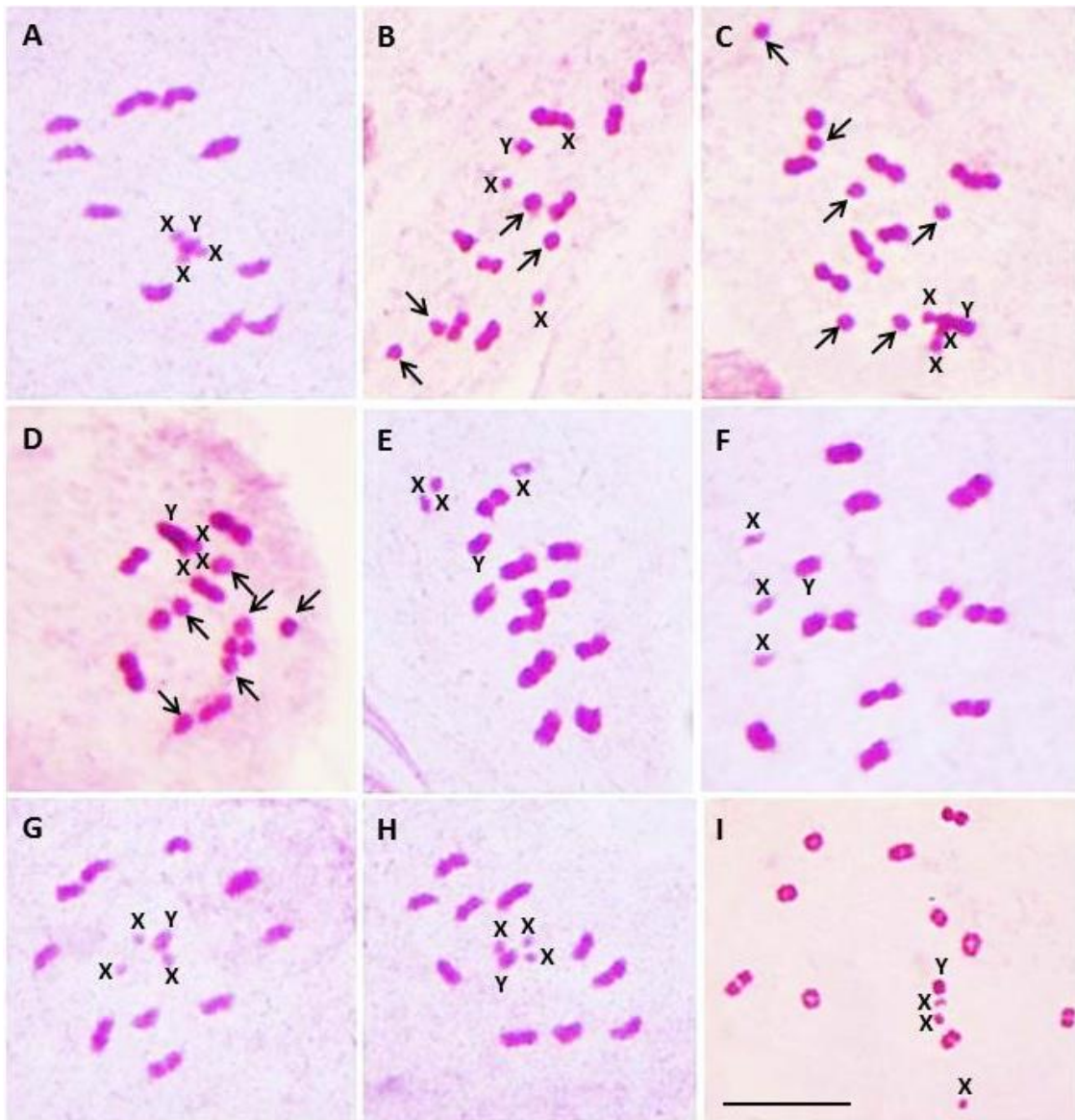


Figura 7. Metáfases provenientes dos cruzamentos entre (A, B) ♀ *T. vitticeps* ES x *T. vitticeps* MG ♂, (C) ♀ *T. vitticeps* MG x *T. vitticeps* ES ♂, (D, E) ♀ *T. vitticeps* ES x *T. vitticeps* RJ ♂, (F) ♀ *T. vitticeps* RJ x *T. vitticeps* ES ♂, (G) ♀ *T. vitticeps* RJ x *T. vitticeps* MG ♂, (H, I) ♀ *T. vitticeps* MG x *T. vitticeps* RJ ♂. Notar que os híbridos provenientes dos cruzamentos entre (B, setas) ♀ *T. vitticeps* ES x *T. vitticeps* MG ♂, (C, setas) ♀ *T. vitticeps* MG x *T. vitticeps* ES ♂ e (D, setas) ♀ *T. vitticeps* ES x *T. vitticeps* RJ ♂ apresentaram erros de pareamento entre os cromossomos homeólogos. X: cromossomo sexual X, Y: cromossomo sexual Y. Barra: 100 µm.

5. DISCUSSÃO

A taxonomia de Triatominae foi inicialmente pautada em estudos morfológicos e morfométricos (USINGER et al., 1966; LENT e WYGODZINSKY, 1979). Passados mais de cinquenta anos, essas análises clássicas continuam importantes para diferenciar os vetores da doença de Chagas, sendo que todas as espécies descritas nos últimos dez anos, a saber, *R. zeledoni* Jurberg et al. (2009), *P. martinezorum* Ayala (2009), *Mepraia parapatrícia* Frias-Lasserre (2010), *R. montenegrensis* Rosa et al. (2012), *R. barretti* Abad-Franch et al. (2013), *T. jatai* Gonçalves et al. (2013), *T. pintodiasi* Jurberg et al. (2013) e *R. marabaensis* Souza et al. (2016), apresentam dados morfológicos e/ou morfométricos (JURBERG et al., 2009; AYALA, 2009; FRÍAS-LASSERRE, 2010; ROSA et al., 2012; ABAD-FRANCH et al., 2013; GONÇALVES et al., 2013; JURBERG et al., 2013; SOUZA et al., 2016; ROSA et al. 2017; DORN et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2018; LIMA-CORDÓN et al., 2019).

No entanto, com o desenvolvimento de novas ferramentas [como estudos isoenzimáticos (NOIREAU et al., 1998), citogenéticos (PANZERA et al., 2010; ALEVI et al., 2018) e moleculares (GARDIM et al. 2014; JUSTI et al. 2014; OLIVEIRA et al., 2017)], a taxonomia integrativa vem sendo a principal ferramenta para a caracterização de novas espécies de triatomíneos (DORN et al., 2018; LIMA-CORDÓN et al., 2019), principalmente diante de eventos evolutivos que podem resultar em erros taxonômicos, como especiação crípticas e plasticidade fenotípica (ABAD-FRANCH et al., 2013).

Diversos estudos caracterizaram aspectos epidemiológicos (SANTOS et al., 2006), ecológicos (GONÇALVES et al., 1998), comportamentais (GONÇALVES et al., 2000) de *T. vitticeps* dos diferentes estados sem nunca levantar o questionamento de que poderia ser mais de um táxon. Apenas no ano de 2018, após Alevi e colaboradores

(2018) analisarem a distância genética de *T. vitticeps* do RJ, MG e ES, foi sugerido que *T. vitticeps* poderia ser um complexo de espécies (ou subespécies) crípticas. Essa mesma hipótese foi inicialmente apresentada para *T. dimidiata* (Latreille, 1811) proveniente de diferentes localidades (CALDERÓN et al., 2004; FERNANDEZ et al., 2005; DORN et al., 2006, 2007, 2009; PANZERA et al. 2006; BARGUES et al., 2008; BLANDON-NARANJO et al., 2010; GARCÍA et al. 2013; JUSTI et al., 2018) que resultou na descrição de duas novas espécies relacionadas a esse táxon, a saber, *Triatoma mopan* Dorn et al. (2018) e *Triatoma huehuetenanguensis* Lima-Cordón et al. (2019) (DORN et al., 2018; LIMA-CORDÓN et al., 2019).

Entre os estudos que inicialmente sinalizaram variação intraespecífica em *T. dimidiata* pode-se destacar a aplicação da morfometria (FERNANDEZ et al., 2005). As análises morfométricas aplicadas em *T. vitticeps* também demonstram variação intraespecífica e indicaram que *T. vitticeps* do ES é um novo táxon, uma vez que tanto no diagrama de dispersão como no fenograma fica evidente a divergência dos exemplares do ES dos triatomíneos provenientes de MG e RJ. Recentemente, dados morfométricos também foram aplicados no estudo de *T. sordida* de diferentes localidades (Brasil, Bolívia e Argentina) e confirmou que os exemplares da Argentina representam um novo táxon, assim como sugerido por estudos cromossômicos (PANZERA et al., 1997, 2015), isoenzimáticas (NOIREAU et al., 1998) e pelo padrão de hidrocarbonetos cuticulares (CALDERÓN-FERNÁNDEZ e JUÁREZ, 2013).

A realização de cruzamentos experimentais confirmou que *T. vitticeps* do ES representa um novo táxon, uma vez que barreiras pré e/ou pós-zigóticas foram observadas entre esses insetos quando cruzados com espécimes de MG e RJ. Possivelmente, os fenômenos evolutivos associados com incompatibilidades genômicas

(que resultam na ausência de zigoto) ou mortalidade do híbrido dentro do ovo atuaram como barreira pré-zigótica entre ♀ *T. vitticeps* ES e *T. vitticeps* MG ♂, uma vez que a taxa de eclosão dos ovos foi menor que 30%, o que é incompatível com as taxas de fertilidade intraespecíficas observadas para outras espécies: 71,2% em *Triatoma matogrossensis* Leite & Barbosa, 1953 (MARASSÁ et al., 1998), 70% em *T. vitticeps* do RJ e 95% em *R. prolixus* Stål, 1859 (ALDANA et al., 2009). Além disso, a barreira pós-zigótica de esterilidade do híbrido observada para os cruzamentos entre ♀ *T. vitticeps* MG e *T. vitticeps* ES ♂, bem como ♀ *T. vitticeps* ES e *T. vitticeps* RJ ♂, podem estar associadas com erros no pareamento dos cromossomos, que resultam em gametas inviáveis [assim como observado para o cruzamento entre *T. lenti* Sherlock & Serafim, 1967 e *T. bahiensis* Sherlock & Serafim, 1967 (ALEVI et al., 2018)].

O uso de barreiras reprodutivas para sinalizar táxons distintos agrupados dentro de uma mesma espécie já foi aplicado entre os triatomíneos: populações de *T. dimidiata* da Guatemala foram cruzadas e barreiras pré-zigóticas foram observadas pela ausência de eclosão dos ovos (GARCÍA et al. 2013). Além disso, ausência total de barreira reprodutiva foi recentemente utilizada como dado complementar para sinonimizar as espécies *R. taquarussuensis* Rosa et al. (2017) e *R. neglectus* Lent, 1954 (NASCIMENTO et al., 2019). Esses dados mostram-se de grande importância taxonômica por demonstrarem os eventos evolutivos que possivelmente inviabilizam a formação de híbridos e/ou a quebra desses organismos na natureza, satisfazendo o conceito biológico de espécie (MAYR et al., 1963; DOBZHANSKY, 1970).

A regra de Haldane não pôde ser aplicada para os cruzamentos de *T. vitticeps*. Essa regra, descrita em 1922 (HALDANE, 1922), prediz que "quando na descendência híbrida um sexo está ausente, é raro ou estéril, esse sexo é o heterogamético", ou seja,

no caso dos triatomíneos em que o sistema de determinação do sexo é do tipo XY (ALEVI et al., 2018), o primeiro sexo afetado deveria ser o macho (alterando a proporção entre machos e fêmeas). Selivon et al. (1999) ressaltam que a esterilidade ou inviabilidade do sexo heterogamético é o primeiro passo na evolução de processos associados com inviabilidade ou esterilidade completa, sendo o estudo da ocorrência da regra de Haldane, em espécies incipientes ou espécies evolutivamente relacionadas, de particular interesse para o conhecimento dos processos associados com a especiação.

6. CONCLUSÃO

Os estudos morfométricos, citogenéticos e os cruzamentos experimentais sinalizaram que *T. vitticeps* do ES representa uma nova espécie de triatomíneo, pois barreiras pré e/ou pós-zigóticas que podem estar relacionadas com incompatibilidades genômicas, mortalidade do híbrido dentro dos ovos, assim como inviabilidade e/ou esterilidade do híbrido – associada com erros cromossômicos – foram observadas entre *T. vitticeps* do ES quando cruzado com *T. vitticeps* de MG e RJ (em pelo menos uma das direções).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD-FRANCH F, PAVAN MG, JARAMILLO N, PALOMEQUE FS, DALE C, CHAVERRA D, MONTEIRO FA. *Rhodnius barretti*, a new species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) from western Amazonia. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 108, p. 92-99, 2013.

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.

ALDANA E, JÁCOME D, LIZANO E. Efecto de la alternación de fuentes sanguíneas sobre la fecundidad y la fertilidad de *Rhodnius prolixus* Stal (Heteroptera: Reduviidae). Entomo Brasiliis, v. 2, p. 17-23, 2009.

ALEVI KCC, GARCIA ACC, GUERRA AL, MOREIRA FFF, OLIVEIRA J, ROSA JA, AZEREDO-OLIVEIRA MTV. *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) (Hemiptera, Triatominae): a Chagas disease vector or a complex of vectors? The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 99, p. 954-956, 2018a.

ALEVI KCC, GUERRA AL, IMPERADOR CHL, JURBERG J, MOREIRA FFF, AZEREDO-OLIVEIRA MTV. Mitochondrial Gene Confirms the Specific Status of *Triatoma pintodiasi* Jurberg, Cunha, and Rocha, 2013 (Hemiptera, Triatominae), an Endemic Species in Brazil. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 96, p. 200-201, 2017.

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, 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, 2018b.

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, 2018.

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

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

AYALA JM. Una nueva especie de *Panstrongylus* Berg de Venezuela (Hemiptera: Reduviidae, Triatominae). *Entomotropica*, v. 24 (3), p. 105-9, 2009.

BARGUES MD, KLISIEWICZ DR, GONZALEZ-CANDELAS F, RAMSEY J, MONROY C, PONCE C. 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 Disease*, v. 2, p. 233, 2008.

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.

BELINTANI T. Morphometric and morphometry geometric *Triatoma vitticipes* populations. *Mendeley Data*, v. 1, 2021. doi: 10.17632/mkfhndrthf.1

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.

BLANDON-NARANJO M, ZURIAGA MA, AZOFEIFA G, ZELEDON R, BARGUES MD. Molecular evidence of intraspecific variability in different habitat-related

populations of *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) from Costa Rica. *Parasitol Res*, v. 106, p. 895–905, 2010.

CALDERÓN C, DORN P, MELGAR S, CHÁVEZ J, RODAS A, ROSALES R. A preliminary assessment of genetic differentiation of *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) in Guatemala by RAPD-PCR. *J Med Entomol*, v. 41, p. 882–887, 2004.

CALDERÓN-FERNÁNDEZ, G.M., JUÁREZ, M.P. The cuticular hydrocarbons of the *Triatoma sordida* species subcomplex (Hemiptera: Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 108, p. 778-784, 2013.

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, p. 68, 1982.

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.

DIASJCP, SCHOFIELD CJ. Controle da transmissão transfusional da doença de Chagas na Iniciativa do Cone Sul. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 31, p. 373-383, 1998.

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: e87493, 2014.

DOBZHANSKY, T. *Genetics of the Evolutionary Process* (New York: Columbia University Press), p. 71-93, 1970.

DORN PL, CALDERON C, MELGAR S, MOGUEL B, SOLORZANO E, DUMONTEIL E. Two distinct *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) taxa are found in sympatry in Guatemala and Mexico. *Plos Negl Trop Dis*, v. 3, p. e393, 2009.

DORN PL, MONROY C, CURTIS A. *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811): a review of its diversity across its geographic range and the relationship among populations. *Infect Genet Evol*, v. 7, p. 343–352, 2007.

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.

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.

FERNANDEZ GC, JUAREZ GC, MONROY C, MENES M, BUSTAMANTE DM. Intraspecific variability in *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) populations from Guatemala based on chemical and morphometric analyses. *J Med Entomol*, v. 42, p. 29–35, 2005.

FRANCA-RODRÍGUEZ ME, YONG DG, 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.

FRÍAS-LASSERRE D. A new species and karyotype variation in the bordering distribution of *Mepraia spinolai* (Porter) and *Mepraia gajardo* Frías et al (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in Chile and its parapatric model of speciation. *Neotropical Entomology*, v. 39(4), p. 572-83, 2010.

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.

GONÇALVES TCM, OLIVEIRA E, DIAS LS, ALMEIDA MD, NOGUEIRA WO, PIRES FDA. An investigation on the ecology of *Triatoma vitticeps* (Stål, 1859) and its possible role in the transmission of *Trypanosoma cruzi* in the locality of Triunfo, Santa Maria Madalena municipal district, state of Rio de Janeiro, Brazil. *Memória do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 93, p. 711-717, 1998.

GONÇALVES TCM, OLIVEIRA E, DIAS LS, D'ALMEIDA M, NOGUEIRA WO, PIRES FA. An investigation on the ecology of *Triatoma vitticeps* (Stal. 1859) and its possible role in the transmission of *Trypanosoma cruzi*, in the locality of Triunfo, Santa Maria Madalena municipal district, state of Rio de Janeiro. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 93, p. 711-717, 1998.

GONÇALVES TCM, ROCHA DC, CUNHA RA. Feeding patterns of *Triatoma vitticeps* in the state of Rio de Janeiro Brazil. *Revista de Saúde Pública*, v. 34, p. 384-52, 2000.

GONÇALVES TCM, TEVES-NEVES SC, SANTOS-MALLET JR, CARBAJAL-DE-LA-FUENTE AL, LOPES CM. *Triatoma jatai* sp. nov. in the state of Tocantins, Brazil

(Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 108(4), p. 429-37, 2013.

HALDANE, J.B.S. Sex ratio and unisexual sterility in animal hybrids. J. Genet, v. 12, p. 101-109, 1922.

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.

HYPSA 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.

JURBERG J, CUNHA V, CAILLEAUX S, RAIGORODSCHI R, LIMA MS, ROCHA DS, et al. *Triatoma pintodiasi* sp. nov. do subcomplexo *T. rubrovaria* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Rev Pan-Amaz Saúde, v. 4(1), p. 43-56, 2013.

JURBERG J, ROCHA DS, GALVÃO C. *Rhodnius zeledoni* sp. nov. afim de *Rhodnius paraensis* Sherlock, Guitton & Miles, 1977 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Biota Neotropical, v. 9(1), p. 123-8, 2009.

JUSTI SA, CAHAN S, STEVENS L, MONROY C, LIMA-CORDÓN R, DORN PL. Vectors of diversity: Genome wide diversity across the geographic range of the Chagas disease vector *Triatoma dimidiata sensu lato* (Hemiptera: Reduviidae). Molecular Phylogenetics and Evolution, v. 120, p. 144–150, 2018.

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

KLINGENBERG CP. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*, v. 11, p. 353-357, 2011.

LENT H, WYGODZINSKY 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. 125-529, 1979.

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.

LOROSA ES, VALENTE MVMP, CUNHA V, LENT H, JURBERG J. Foco de doença de Chagas em Arcádia, estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 98, p. 885-887, 2003.

LUCENA DT. Estudos sobre a doença de Chagas no Brasil. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*, v. 22, p. 3-173, 1970.

MARTÍNEZ-IBARRA J A, LV VENTURA-RODRÍGUEZ, K MEILLON-ISAIS, H BARAJAS-MARTÍNEZ, R ALEJANDRE-AGUILAR, P LUPERCIOCORONEL, G 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, GARCÍA-LIN JC, ARROYO-REYS D, SALAZAR-MONTAÑO LF, HERNÁNDEZ-NAVARRO JA, DÍAZ-SNCHES CG, TORO-ARREOLA ES, 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, 2016.

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 SALAZARSCHETTINO, 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.

MASSARÁ AM, VEIGA-BARREIROS RMO, PINTO-MORAES RH, ANDRADE RMG, CASTILHO A, CORRÊA FMA. A study on egg laying, egg hatching and life span of *Triatoma matogossensis* Leite & Barbosa, 1953 (Hemiptera-Reduviidae), influenced by blood-meal on both pigeons and rabbits. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 31, p. 361-365, 1998.

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, 2014.

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(2):e0211285, 2019.

NOIREAU F, GUTIERREZ T, ZEGARRA M, FLORES R, BRENIÈRE F, CARDOZO L. Cryptic speciation in *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) from the Bolivian Chaco. Tropical Medicine & International Health, v. 3, p. 364-72, 1998.

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.

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.

OLIVEIRA J, MARCER PL, TAKIYA DM, MENDONÇA VJ, BELINTANI T, BARGUES MD, MATEO L, CHAGAS V, FOLLY-RAMOS E, CORDEIRO-ESTRELA P, GURGEL-GONÇALVES R, COSTA J, ROSA JA, ALMEIDA CE. Combined phylogenetic and morphometric information to delimit and unify the *Triatoma brasiliensis* species complex and the Brasiliensis subcomplex. *Acta Tropica*, v. 170, p. 140-148, 2017.

PANZERA F, FERRANDIS I, RAMSEY J, ORDOÑEZ R, SALAZAR-SCHETTINO PM, ET AL. Chromosomal variation and genome size support existence of cryptic species of *Triatoma dimidiata* with different epidemiological importance as Chagas disease vectors. *Trop Med Int Health*, v. 11, p. 1092–1103, 2006.

PANZERA, F., PÉREZ, R., PANZERA, Y., FERRANDIS, I., FERREIRO, M.J., CALLEROS, L. Cytogenetics and genome evolution in the subfamily Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). *Cytogenetics and Genome Research* 128, 77–87, 2010.

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. *Parasites & Vectors*, v. 8, p. 495-504, 2015.

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

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.

ROHLF FJ. TPSDIG, version 1.18. Stony Brook, NY, Department of Ecology and Evolution, State University of New York, 1999. Disponível em: <http://life.bio.sunysb.edu/morph>, Acesso em 17/11/2019.

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.

ROSA JA, JUSTINO HHG, NASCIMENTO JD, MENDONÇA VJ, ROCHA CS, CARVALHO DB, FALCONE R, AZEREDO-OLIVEIRA MTV, ALEVI KCC, DE OLIVEIRA J. A new species of *Rhodnius* from Brazil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Zookeys*, v. 675, p. 01-25, 2017.

ROSA JA, ROCHA CS, GARDIM S, PINTO MC, MENDONÇA VJ, FERREIRA-FILHO JCR, et al. Description of *Rhodnius montenegrensis* n. sp. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the state of Rondônia, Brazil. *Zootaxa*, v. 3478, p. 62-76, 2012.

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.

SANTOS CB, FERREIRA AL, LEITE GR, FERREIRA GEM, RODRIGUES AAF, FALQUETO A. Peridomiciliary colonies of *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) infected with *Trypanosoma cruzi* in rural areas of the state of Espírito Santo, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 100, p. 471-473, 2005.

SANTOS GRL, FERREIRA GEM, FERREIRA AL. Natural infection of *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) with flagellates morphologically similar to *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) in Espírito Santo state. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 39(1), p. 89–91, 2006.

SCHEREIBER G, PINHO AC, PARENTONI R, SALGADO AA, GODOI JR. TL. 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 CJ, GALVÃO C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. Acta tropica, v. 110, p. 88-100, 2009.

SELIVON D, PERONDINI ALP, MORGANTE JS. Haldane's rule and other aspects of reproductive isolation observed in the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae). Genetics Molecular Biology, v. 22, p. 507–510, 1999.

SOUZA ES, VON ATZINGEN NCB, FURTADO MB, DE OLIVEIRA J, NASCIMENTO JD, VENDRAMI DP, et al. Description of *Rhodnius marabaensis* sp. n. (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) from Pará State, Brazil. Zookeys, v. 621, p. 45-62, 2016.

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.