



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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS (IBILCE/UNESP)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

Luisa Martins Sensato Azevedo

**Primeira evidência de esterilidade híbrida por disgenesia gonadal em
Triatominae (Hemiptera, Reduviidae)**

São José do Rio Preto

2023

Luisa Martins Sensato Azevedo

**Primeira evidência de esterilidade híbrida por disgenesia gonadal em
Triatominae (Hemiptera, Reduviidae)**

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

Orientador: Profa Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Kaio Cesar Chaboli Alevi

Agência financiadora: CAPES

São José do Rio Preto

2023

A994p

Azevedo, Luisa Martins Sensato

Primeira evidência de esterilidade híbrida por disgenesia gonadal em
Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) / Luisa Martins Sensato Azevedo. --
São José do Rio Preto, 2023

34 f. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto
de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientadora: Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira

Coorientador: Kaio Cesar Chaboli Alevi

1. Triatoma. 2. Barbeiros (Inseto). 3. Genética. 4. Evolução. 5. Gonadas. I.
Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

Luisa Martins Sensato Azevedo

**Primeira evidência de esterilidade híbrida por disgenesia gonadal em
Triatominae (Hemiptera, Reduviidae)**

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

Comissão examinadora

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

Prof. Dr. Cleber Galvão Ferreira
IOC/FIOCRUZ

Profa. Dra. Elaine Folly Ramos
UFPB

São José do Rio Preto

24 de abril de 2023

Dedicatória

Dedico esta conquista á minha família, que esteve sempre ao meu lado, me assistindo nos momentos difíceis e compartilhando, também, a alegria de todas as vitórias.

Agradecimentos

Agradeço ao meu pai, por todo amor, apoio e ensinamentos. Obrigada por sempre acreditar em mim e estar ao meu lado em todos os passos dessa jornada.

À minha mãe, que me incentivou a ser quem sou, por todo seu amor e dedicação. Obrigada por estar sempre ao meu lado, especialmente nos momentos em que mais precisei do seu colo e zelo.

À Júlia, minha companheira. Obrigada por ser minha irmã e estar presente todos os dias, mesmo com a distância. Obrigada por todo cuidado, pelas risadas e também pelos momentos difíceis que nos fizeram crescer.

Aos meus avós, Dalva e Irineu, que são o meu refúgio e inspiração. Obrigada por todos os puxões de orelha, amor, incentivos e ensinamentos que fizeram ser quem sou.

Ao meu tio, Fabricio, meu exemplo, por toda orientação e ajuda.

Ao meu primo, Fábio, por ser alegria e motivação.

À minha avó Jesuína, por sempre me motivar e acompanhar, e meu avô, Mané, que sempre esteve em meu coração.

À minha amiga e confidente, Kelly. Sua amizade é imprescindível. Obrigada por tudo que vivemos ao longo desses anos e por toda paciência e carinho.

Agradeço a minha professora e orientadora, Profa Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira, pelo acolhimento e todo o ensinamento.

Agradeço ao meu amigo e coorientador, Prof. Dr. Kaio Cesar Chaboli Alevi, por toda dedicação, paciência e, principalmente, pela oportunidade de realizar esse estudo junto a você.

Ao meu companheiro de vida, Giovani, que me acompanha e motiva todos os dias. Obrigada por todo carinho. A vida é leve ao seu lado.

Por fim, agradeço aos diferentes Câmpus da UNESP (IBB, IBILCE e FCFAR), onde o estudo foi realizado e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Código de Financiamento 001, pela bolsa de mestrado concedida.

Resumo

Eventos de hibridação entre espécies de *Triatoma* foram observados em condições naturais e de laboratório. A capacidade de produzir híbridos pode influenciar diferentes aspectos das espécies parentais, podendo, inclusive, resultar em eventos de introgressão, especiação e extinção. Entre as barreiras reprodutivas que resultam na quebra do híbrido, a esterilidade híbrida pode ser decorrente tanto de gametas inviáveis (por erros de pareamento cromossômico), como do fenômeno da disgenesia gonadal (DG). Até o momento, nenhum híbrido de triatomíneos analisado apresentou DG. No entanto, a análise de gônadas masculinas de híbridos resultantes de cruzamentos entre *T. longipennis* e *T. mopan*, demonstrou que os testículos estavam atrofiados. Assim, descrevemos, pela primeira vez, o evento de DG em híbridos de triatomíneos e destacamos suas implicações taxonômicas e evolutivas. Híbridos foram obtidos apenas para cruzamentos entre ♀ *T. mopan* x *T. longipennis* ♂. Além disso, intercruzamentos e retrocruzamentos não resultaram em descendentes. Curiosamente, as fêmeas híbridas não puseram ovos. Análises morfológicas das gônadas masculinas dos híbridos confirmaram que o fenômeno que resultou na esterilidade do híbrido foi DG bilateral. Análises citogenéticas dos testículos desses híbridos também confirmaram a DG, uma vez que não foram observadas células germinativas. No caso dos híbridos fêmeas, a ausência de oviposição é um fator que confirma que os ovários também estão atrofiados. Com base no exposto, caracterizamos, pela primeira vez, a DG em triatomíneos e demonstramos que a gametogênese não ocorre em gônadas atrofiadas. A caracterização de DG em híbridos resultantes do cruzamento de ♀ *T. mopan* x *T. longipennis* ♂ destaca a importância de avaliar tanto a morfologia, quanto a citogenética das gônadas para confirmar qual evento resultou na esterilidade do híbrido: DG (que não produz gametas) ou erros meióticos (que resultam em gametas inviáveis).

Palavras chave: Cruzamentos experimentais. Barreiras pré-zigóticas. Esterilidade do híbrido.

Abstract

Hybridization events between species of *Triatoma* were observed under natural and laboratory conditions. The ability to produce hybrids can influence different aspects of the parent species, and may even result in introgression, speciation and extinction events. Among the reproductive barriers that result in the breakdown of the hybrid, hybrid sterility may be due both to unviable gametes (due to chromosomal pairing errors) and to the phenomenon of gonadal dysgenesis (GD). So far, none of the triatomine hybrids analyzed showed GD. However, the analysis of male gonads from hybrids resulting from crosses between *T. longipennis* and *T. mopan*, demonstrated that the testes were atrophied. Thus, we describe, for the first time, the event of GD in triatomine hybrids and highlight its taxonomic and evolutionary implications. Hybrids were obtained only for crosses between ♀ *T. mopan* x *T. longipennis* ♂. Furthermore, intercrosses and backcrosses did not result in offspring. Interestingly, the hybrid females did not lay eggs. Morphological analyzes of the male gonads of the hybrids confirmed that the phenomenon that resulted in the sterility of the hybrid was bilateral GD. Cytogenetic analyzes of the testes of these hybrids also confirmed GD, since no germ cells were observed. In the case of female hybrids, the absence of oviposition is a factor that confirms that the ovaries are also atrophied. Based on the above, we characterized, for the first time, GD in triatomines and demonstrated that gametogenesis does not occur in atrophied gonads. The characterization of GD in hybrids resulting from the crossing of ♀ *T. mopan* x *T. longipennis* ♂ highlights the importance of evaluating both the morphology and the cytogenetics of the gonads to confirm which event resulted in the sterility of the hybrid: DG (which does not produce gametes) or meiotic errors (which result in non-viable gametes).

Keywords: Experimental crosses. Prezygotic barriers. Hybrid sterility.

Sumário

Resumo.....	07
Abstract.....	08
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivos gerais.....	14
2.2 Objetivos específicos.....	14
3. RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	15
3.1 Artigo científico.....	15
4. CONCLUSÕES GERAIS.....	30
REFERÊNCIAS.....	31

1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas (DC) é uma doença negligenciada causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) (CHAGAS, 1909; WHO, 2022). Embora seja encontrada, principalmente, em áreas endêmicas de 21 países continentais da América Latina, estima-se que seis a sete milhões de pessoas estejam infectadas com o parasito em todo o mundo e que 75 milhões de pessoas vivam em risco de infecção (WHO, 2022).

Existem diferentes formas de infecção pelo *T. cruzi*, a saber, por via oral (consumo de carne de animal silvestre contaminado com o *T. cruzi* crua ou mal cozida e aleitamento realizado por mães portadoras da doença de Chagas), oral-vetorial (consumo de alimentos processados com as fezes/triatomíneos infectados com o *T. cruzi*), por meio de transfusão de sangue/derivados, pela transmissão de mãe para filho (congênita), pelo transplante de órgãos de pacientes contaminados e por acidentes de laboratório (WHO, 2022). No entanto, a transmissão vetorial, a partir de fezes e/ou urina de triatomíneos contaminada com o *T. cruzi*, é considerada como a principal via de infecção pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO, 2022).

A DC tem cura quando o tratamento com os antitripanosomatídeos benznidazol ou nifurtimox é iniciado logo após a infecção (fase aguda) (WHO, 2022). No entanto, essa fase é assintomática ou apresenta sintomas inespecíficos, o que dificulta o diagnóstico precoce da DC (WHO, 2022). Na fase crônica, até 30% das pessoas infectadas desenvolvem alterações cardíacas e até 10% desenvolvem alterações digestivas e/ou neurológicas que podem requerer tratamento específico (WHO, 2022). Nesses pacientes, o tratamento antiparasitário auxilia no controle da progressão da doença, além de prevenir a transmissão de forma congênita (WHO, 2022).

Entre as diversas estratégias necessárias para mitigar a DC, o controle de vetores é considerado pela OMS como um dos métodos-chave para prevenir novos casos da doença na América Latina (WHO, 2022). Os triatomíneos são insetos hematófagos e grande parte das espécies tem o hábito de defecar/urinar durante ou após o repasto sanguíneo [liberando o parasito próximo

ao orifício da picada, caso estejam infectados] (WHO, 2022). As espécies de maior importância epidemiológica vivem em ambientes domiciliares, associadas a rachaduras de paredes ou telhados de casas, ou vivem associadas ao peridomicílio de áreas rurais ou suburbanas, habitando diferentes locais/construções, como galinheiros, currais e armazéns (WHO, 2022). De forma geral, esses vetores se escondem durante o dia e se tornam ativos à noite, quando saem em busca de alimento (WHO, 2022).

Atualmente, existem 158 espécies de triatomíneos, agrupadas em 18 gêneros e cinco tribos (ALEVI et al., 2021; GIL-SANTANA et al., 2022; OLIVEIRA CORREIA et al., 2022; TÉLLEZ-RENDÓN et al., 2023). *Triatoma* Laporte, 1832, *Rhodnius* Stål, 1859 e *Panstrongylus* Berg, 1879 são os gêneros que agrupam o maior número de espécies com importância epidemiológica (JUSTI et al., 2014). *Triatoma* é o gênero mais diversificado em número de espécies (ALEVI et al., 2021). Por ser um gênero parafilético, agrupamentos monofiléticos (complexos e subcomplexos) foram propostos para auxiliar no entendimento da relação evolutiva desses vetores (JUSTI et al., 2014, 2016; PITA et al., 2016) (Tabela 1).

Tabela 1. Complexos e subcomplexos propostos para a tribo Triatomini.

Complexos	Subcomplexos
<i>Triatoma phyllosoma</i>	<i>Triatoma phyllosoma</i> <i>Triatoma dimidiata</i>
<i>Nesotriatoma flavida</i>	
<i>Triatoma rubrovaria</i>	
<i>Triatoma protracta</i>	
<i>Paratriatoma lecticularia</i>	
<i>Triatoma dispar</i>	
<i>Triatoma infestans</i>	<i>Triatoma brasiliensis</i> <i>Triatoma infestans</i> <i>Triatoma maculata</i> <i>Triatoma pseudomaculata</i> <i>Triatoma rubrovaria</i> <i>Triatoma sordida</i> <i>Triatoma vitticeps</i>

O complexo *T. phyllosoma* é um grupo monofilético composto por diversas espécies que fazem parte dos subcomplexos *T. phyllosoma* e *T. dimidiata* (JUSTI et al., 2014, 2016; REIS et al., 2023) (Figura 1). Esse grupo foi alvo de diversas mudanças taxonômicas e nomenclaturais (LENT e WYGODZINSKY, 1979; CARCAVALLO et al., 2000; HYPSE et al., 2012; CESARETTO et al., 2021, 2022). Estudos de cruzamentos experimentais demonstram que diversas espécies desse complexo são capazes de cruzar e produzir híbridos (CESARETTO et al., 2021, 2022) (Table 2).

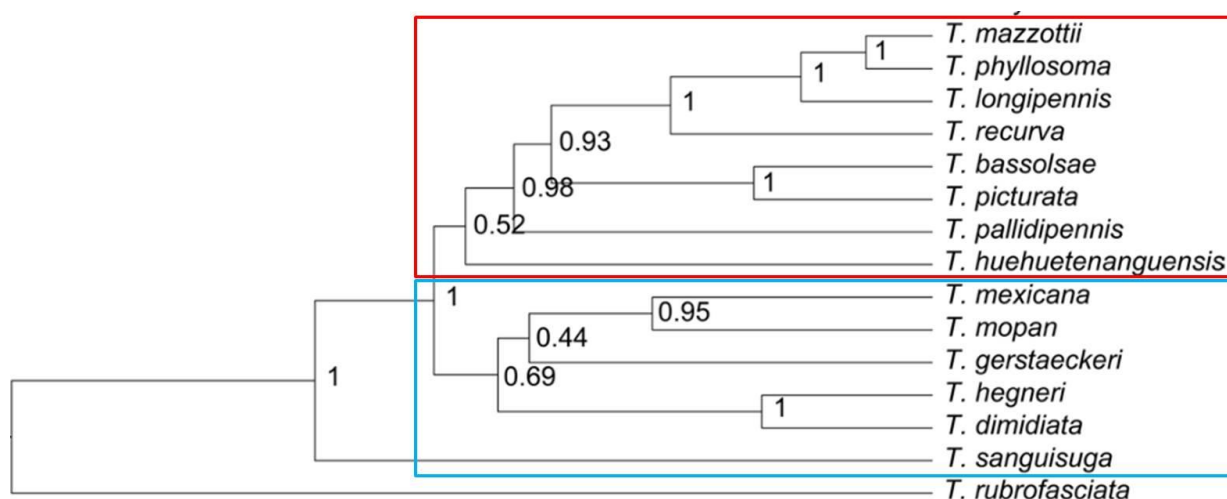


Figura 1. Espécies que compõem o subcomplexo *T. phyllosoma*. Retângulo vermelho: espécies do complexo *T. phyllosoma*; retângulo azul: espécies do complexo *T. dimidiata*. Grupo externo: *T. rubrofasciata*. Adaptado de Reis et al. (2023).

Existem diversas barreiras reprodutivas que impedem a formação e/ou resultam na quebra do híbrido em condições naturais, entre elas, barreiras pré-zigóticas e pós-zigóticas (MAYR, 1963, 1970). Em Triatominae, barreiras ecológicas (DELGADO et al., 2021) e mecânicas (USINGER et al., 1966) já foram observadas. Além disso, os fenômenos de inviabilidade (MARTÍNEZ-IBARRA et al., 2011; ALEVI et al., 2020; RAVAZI et al., 2021), esterilidade (PÉREZ et al., 2005; RAVAZI et al., 2021) e desmoronamento (MENDONÇA et al., 2014; ALEVI et al., 2018) do híbrido também foram notificados em condições de laboratório. Entre as espécies do complexo *T. phyllosoma*, barreiras pré-zigóticas [possivelmente incompatibilidade mecânica] e pós-zigóticas

[esterilidade e desmonoramento do híbrido] já foram observadas (CESARETTO et al., 2021, 2022). Além disso, já foi sugerido que isolamento ecológico esteja presente em condições naturais (MARTINEZ-HERNANDEZ et al., 2021).

Tabela 2. Cruzamentos interespecíficos realizados no complexo *T. phyllosoma* e as possíveis barreiras reprodutivas detectadas em condição de laboratório. Adaptado de Cesaretto et al. (2022).

Cruzamentos experimentais	Barreiras pré-zigóticas	Barreiras pós-zigóticas
♀ <i>T. mazzottii</i> x ♂ <i>T. longipennis</i>	Ausente	Presente
♂ <i>T. mazzottii</i> x ♀ <i>T. longipennis</i>	Ausente	Presente
♀ <i>T. mazzottii</i> x ♂ <i>T. picturata</i>	Ausente	Presente
♂ <i>T. mazzottii</i> x ♀ <i>T. picturata</i>	Ausente	Presente
♀ <i>T. mazzottii</i> x ♂ <i>T. pallidipennis</i>	Ausente	Presente
♂ <i>T. mazzottii</i> x ♀ <i>T. pallidipennis</i>	Ausente	Presente
♀ <i>T. mazzottii</i> x ♂ <i>T. bassolsae</i>	Ausente	Presente
♀ <i>T. phyllosoma</i> x ♂ <i>T. pallidipennis</i>	Ausente	Presente
♀ <i>T. pallidipennis</i> x ♂ <i>T. phyllosoma</i>	Ausente	Presente
♀ <i>T. phyllosoma</i> x ♂ <i>T. bassolsae</i>	Ausente	Presente
♀ <i>T. bassolsae</i> x ♂ <i>T. phyllosoma</i>	Ausente	Presente
♀ <i>T. mopan</i> x ♂ <i>T. longipennis</i>	Ausente	Presente
♀ <i>T. longipennis</i> x ♂ <i>T. picturata</i>	Ausente	Ausente
♂ <i>T. longipennis</i> x ♀ <i>T. picturata</i>	Ausente	Ausente
♀ <i>T. phyllosoma</i> x ♂ <i>T. longipennis</i>	Ausente	Ausente
♀ <i>T. longipennis</i> x ♂ <i>T. phyllosoma</i>	Ausente	Ausente
♀ <i>T. phyllosoma</i> x ♂ <i>T. picturata</i>	Ausente	Ausente
♀ <i>T. picturata</i> x ♂ <i>T. phyllosoma</i>	Ausente	Ausente
♀ <i>T. phyllosoma</i> x ♂ <i>T. mazzottii</i>	Ausente	Ausente
♀ <i>T. mazzottii</i> x ♂ <i>T. phyllosoma</i>	Ausente	Ausente
♀ <i>T. bassolsae</i> x ♂ <i>T. pallidipennis</i>	Ausente	Ausente
♀ <i>T. pallidipennis</i> x ♂ <i>T. bassolsae</i>	Ausente	Ausente
♀ <i>T. bassolsae</i> x ♂ <i>T. longipennis</i>	Ausente	Ausente
♀ <i>T. longipennis</i> x ♂ <i>T. bassolsae</i>	Ausente	Ausente
♀ <i>T. bassolsae</i> x ♂ <i>T. picturata</i>	Ausente	Ausente
♀ <i>T. picturata</i> x ♂ <i>T. bassolsae</i>	Ausente	Ausente
♀ <i>T. longipennis</i> x ♂ <i>T. pallidipennis</i>	Ausente	Ausente
♀ <i>T. pallidipennis</i> x ♂ <i>T. longipennis</i>	Ausente	Ausente
♀ <i>T. pallidipennis</i> x ♂ <i>T. picturata</i>	Ausente	Ausente
♀ <i>T. picturata</i> x ♂ <i>T. pallidipennis</i>	Ausente	Ausente

Cesaretto et al. (2021) realizaram cruzamentos entre *T. mopan* e *T. longipennis* e, a partir da eclosão de híbridos em uma das direções, confirmaram a proposta de reorganização genérica do gênero *Meccus* para *Triatoma* [proposta por Justí et al. (2014) a partir de dados filogenéticos]. Ao analisarmos as gônadas masculinas desses híbridos, observamos atrofia dos testículos (sinalizando para o possível fenômeno de esterilidade do híbrido por disgenesia gonadal). Esse fenômeno, nunca antes relatado nos triatomíneos, pode resultar na atrofia de uma ou ambas as gônadas dos híbridos (podendo ser uni ou bilateral) [ALMEIDA; CARARETO, 2022].

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a capacidade reprodutiva de híbridos resultantes do cruzamento entre *T. mopan* e *T. longipennis*, realizando intercruzamentos (híbrido x híbrido) e retrocruzamentos (híbrido x parentais) e caracterizar a morfologia e citologia das gônadas masculinas, com ênfase no fenômeno de disgenesia gonadal.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Realizar cruzamentos experimentais entre *T. mopan* e *T. longipennis*;
- ✓ Realizar intercruzamentos entre os híbridos machos e fêmeas resultantes do cruzamento entre ♀ *T. mopan* x ♂ *T. longipennis*;
- ✓ Realizar retrocruzamentos entre os híbridos machos e fêmeas e os parentais (*T. mopan* e *T. longipennis*);
- ✓ Avaliar a morfologia das gônadas masculinas dos híbridos machos adultos resultantes do cruzamento entre ♀ *T. mopan* x ♂ *T. longipennis*;
- ✓ Avaliar a citologia das gônadas masculinas dos híbridos machos adultos resultantes do cruzamento entre ♀ *T. mopan* x ♂ *T. longipennis*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO (apresentado na forma de artigo científico)

3.1 Artigo científico submetido para publicação na revista internacional “*Parasites & Vectors*” (FI 4)

FIRST EVIDENCE OF GONADAL HYBRID DYSGENESIS IN CHAGAS DISEASES VECTORS (HEMIPTERA, TRIATOMINAE): GONADS ATROPHY THAT PREVENT THE EVENTS OF INTERSPECIFIC GENE FLOW AND INTROGRESSION

ABSTRACT

Background: Hybridization events between *Triatoma* spp. have been observed under natural and laboratory conditions. The ability to produce hybrids can influence different aspects of the parent species, and may even result in events of introgression, speciation and extinction. Hybrid sterility can be resultant from unviable gametes (from chromosomal pairing errors) or the phenomenon of gonadal dysgenesis (GD). All the triatomine hybrids analyzed so far did not present GD. However, when we analyze the male gonads of hybrids resulting from crosses between *T. longipennis* and *T. mopan*, we observed that the testes were atrophied. Thus, we describe for the first time the event of GD in triatomine hybrids and highlight its taxonomic and evolutionary implications. **Methods:** Reciprocal experimental crosses were conducted between *T. longipennis* and *T. mopan*. Furthermore, intercrosses were performed between the hybrids and backcrosses were performed between the hybrids and the parental species. In addition, morphological and cytogenetic analyzes were performed on the atrophied gonads of the hybrids. **Results:** Hybrids were obtained only for crosses between ♀ *T. mopan* x *T. longipennis* ♂. Intercrosses and backcrosses did not result in offspring. Interestingly, hybrid females did not lay eggs. Morphological analyzes of the male gonads of the hybrids confirmed that the phenomenon that resulted in the sterility of the hybrid was bilateral GD (the gonads of the hybrids were completely atrophied). Furthermore, cytogenetic analyzes of the testes hybrids also confirmed GD, once no germ cells were observed (only somatic

cells, which make up the peritoneal sheath). In the case of female hybrids, the absence of egg production is a factor that confirms that the ovaries are also atrophied. **Conclusions:** Based on the above, we characterized, for the first time, GD in triatomine and demonstrated that gametogenesis does not occur in atrophied gonads. The characterization of DG in hybrids resulting from the crossing of ♀ *T. mopan* x *T. longipennis* ♂ highlights the importance of evaluating both the morphology and the cytogenetics of the gonads to confirm which event resulted in the sterility of the hybrid: GD (which results in no gamete production) or meiotic errors (which results in non-viable gametes).

Keywords: experimental crosses, prezygotic barriers, hybrid sterility

BACKGROUND

Chagas disease (CD) is a neglected disease caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) that affects about 6-7 million people worldwide [1]. Although there are different ways of contamination (such as by blood transfusion, organ transplantation and oral [1]), vector transmission (through the feces and/or urine of triatomines contaminated with *T. cruzi*) is considered by the World Health Organization as the main one, being the vector control the main measure to mitigate new cases of CD [1].

Currently, there are 158 species described in the subfamily Triatominae (with 155 extant species and three fossil species), grouped into 18 genera and five tribes (Alberproseniini, Bolboderini, Cavernicolini, Rhodniini and Triatomini) [2–5]. The Triatomini tribe is composed of nine genera (*Dipetalogaster* Usinger, 1939, *Eratyrus* Stål, 1859, *Hermanlenticia* Jurberg & Galvão, 1997, *Linshcosteus* Distant, 1904, *Mepraia* Mazza, Gajardo & Jörg, 1940, *Nesotriatoma* Usinger, 1944, *Panstrongylus* Berg, 1879, *Paratriatoma* Barber, 1938 and *Triatoma* Laporte, 1832) [2], with *Triatoma* being the most diversified and with the largest number of species [2].

Hybridization events between species of the genus *Triatoma* have been observed under

natural [6–8] and laboratory conditions [9–14]. The ability to produce hybrids can influence different aspects of the parent species, and may even result in events of introgression, speciation, and extinction [15]. Thus, several studies have the proposal to evaluate the hybridization capacity and, above all, the reproductive barriers that prevent the formation of hybrids or make hybrids unviable (causing mortality, infertility or lower fitness for these organisms) [9–14, 16–18].

Among the reproductive barriers already characterized in Triatominae, we can highlight the habitat [18,19] and mechanical isolation [19,20] as prezygotic barriers, and the infeasibility [21], sterility [17,20] and collapse [22,23] of the hybrid as postzygotic barriers. Hybrid sterility can be resultant from unviable gametes (from chromosomal pairing errors) [17,20] or the phenomenon of gonadal dysgenesis (GD) [24].

GD is associated with factors related to gonad atrophy in hybrids and can be unilateral or bilateral [24]. All the triatomine hybrids analyzed so far did not present GD [14,15], being the cases of hybrid sterility associated only with errors during meiosis [17,20,25–27]. However, when we analyze the male gonads of hybrids resulting from crosses between *T. longipennis* (Usinger, 1939) and *T. mopan* Dorn et al., 2018, we observed that the testes were atrophied. Thus, we describe for the first time the event of GD in triatomine hybrids and highlight its taxonomic and evolutionary implications.

METHODS

Experimental crosses

Reciprocal experimental crosses were conducted between *T. longipennis* (origin: Mexico) and *T. mopan* (origin: Central America, Belize) (Figure 1A, Table 1). In addition, intercrosses were performed between the hybrids (Figure 1B, Table 1) and backcrosses were performed between the hybrids and the parental species (Figure 1C, Table 1). The insects used in the experiment came from colonies kept in the Triatominae insectary of the School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University (UNESP), Araraquara, São Paulo, Brazil. The experimental crosses were

conducted in the Triatominae insectary, according to the experiments of Mendonça et al. [22]: the insects were sexed as fifth instar nymphs (N5), and males and females were kept separately until they reached the adult stage to guarantee the virginity of the insects used in the crosses. For the experimental crosses, five couples from each set were placed in plastic jars (diameter 5 cm × height 10 cm) and kept at room temperature. Weekly the eggs were collected, counted and the hatching rate was evaluated. As the eggs from the cross between *T. longipennis* ♀ × *T. mopan* ♂ were infertile (Table 1), the N5 hybrids resulting from the cross between *T. mopan* ♀ × *T. longipennis* ♂ (Figure 1A) were sexed, separated and, after the imago molt, five intercrosses (Figure 1B) were performed to assess hybrid fertility (Table 1). In addition, ten backcrosses with *T. longipennis* (five for each direction) and ten with *T. mopan* (five for each direction) were also performed to assess hybrid fertility (Table 1). In the same way, weekly the eggs were collected, counted and the hatching rate was evaluated.

Morphology of the gonads

The morphology of the male gonads of ten adult male hybrids resulting from the cross between ♀ *T. mopan* × *T. longipennis* ♂ was analyzed under a stereomicroscope (SM) (model MZ APO; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) fitted with the Motic Advanced 3.2 Plus Image Analysis System (Motic, Hong Kong) to evaluate the presence of GD (which may be uni- or bilateral) [26]. Furthermore, the gonads of 10 adult males of the parental species (*T. longipennis* and *T. mopan*) were also dissected and analyzed in SM (control group).

Cytogenetics analysis

Ten males hybrids were dissected, the testes were removed and stored in methanol: acetic acid solution (3: 1). Slides were prepared by the cell crushing technique (as described by Alevi et al. [28]) and the cytogenetic analyzes were applied with the aim to evaluate whether spermatogenesis was normal in gonads with GD, using the Lacto-Acetic Orcein technique [28, 29].

As a control group, the gonads of ten adult males of *T. mopan* and *T. longipennis* were also dissected and analyzed cytogenetically. The slides were examined in light microscopy Jenaval (Zeiss), coupled to the digital camera and the Axio Vision LE 4.8 image analyzer system, with a 400-fold increase.

Table. 1 Experimental crosses performed between *T. mopan*, *T. longipennis* and hybrids.

Crossing experiments					Number of eggs		Egg Fertility
					C1	C2	Total
♀	<i>T. mopan</i>	x	<i>T. longipennis</i>	♂	49	112	161
♀	<i>T. longipennis</i>	x	<i>T. mopan</i>	♂	61	83	144
Intercrossing							
♀	Hybrid ^a	x	Hybrid ^a	♂	00	00	00
Backcrosses							
♀	Hybrid ^a	x	<i>T. mopan</i>	♂	00	00	00
♀	<i>T. mopan</i>	x	Hybrid ^a	♂	33	35	68
♀	Hybrid ^a	x	<i>T. longipennis</i>	♂	00	00	00
♀	<i>T. longipennis</i>	x	Hybrid ^a	♂	54	59	113
Control							
♀	<i>T. mopan</i>	x	<i>T. mopan</i>	♂	35	42	77
♀	<i>T. longipennis</i>	x	<i>T. longipennis</i>	♂	-	-	-

^a Hybrids of the cross between *T. mopan* ♀ x *T. longipennis* ♂. C1 and C2: replicates of experimental crosses.

RESULTS AND DISCUSSION

Hybrids were obtained only for crosses between ♀ *T. mopan* x *T. longipennis* ♂ (Figure 1A) (crosses between ♂ *T. mopan* x *T. longipennis* ♀ showed a prezygotic barrier) (Table 1). Intercrosses (Figure 1B) were performed to evaluate the fertility of the first generation hybrid (F1) and demonstrated that the hybrids are sterile (Table 1). Interestingly, hybrid females did not lay eggs (Table 1). To evaluate whether hybrids of both sexes were sterile, backcrosses were performed with *T. mopan* and *T. longipennis* (Table 1, Figure 1C). Although none of the backcrossing

directions resulted in offspring (confirming the postzygotic barrier of hybrid sterility), we emphasize that the hybrid females also did not perform oviposition (Table 1).



Fig. 1 Examples of experimental crosses between ♀ *T. mopan* x *T. longipennis* ♂ (A), intercross between ♀ hybrid x hybrid ♂ (B) and backcross ♀ hybrid x *T. mopan* ♂ (C). Bar: 1 cm.

Morphological analyzes of the male gonads of the hybrids (Figure 2C) and of the parents (Figure 2A and 2B) confirmed that the phenomenon that resulted in the sterility of the hybrid was bilateral GD. The gonads of the hybrids were completely atrophied (Figure 2C), with a totally different morphology from the testis of the parents (Figure 2A and 2B): triatomine testis are made up of seven testicular follicles (where all phases of spermatogenesis occur [30]) [31] and a transparent peritoneal sheath [32]; on the other hand, the testis of the hybrids showed only the peritoneal sheath (without seminiferous tubules) (Figure 2C).

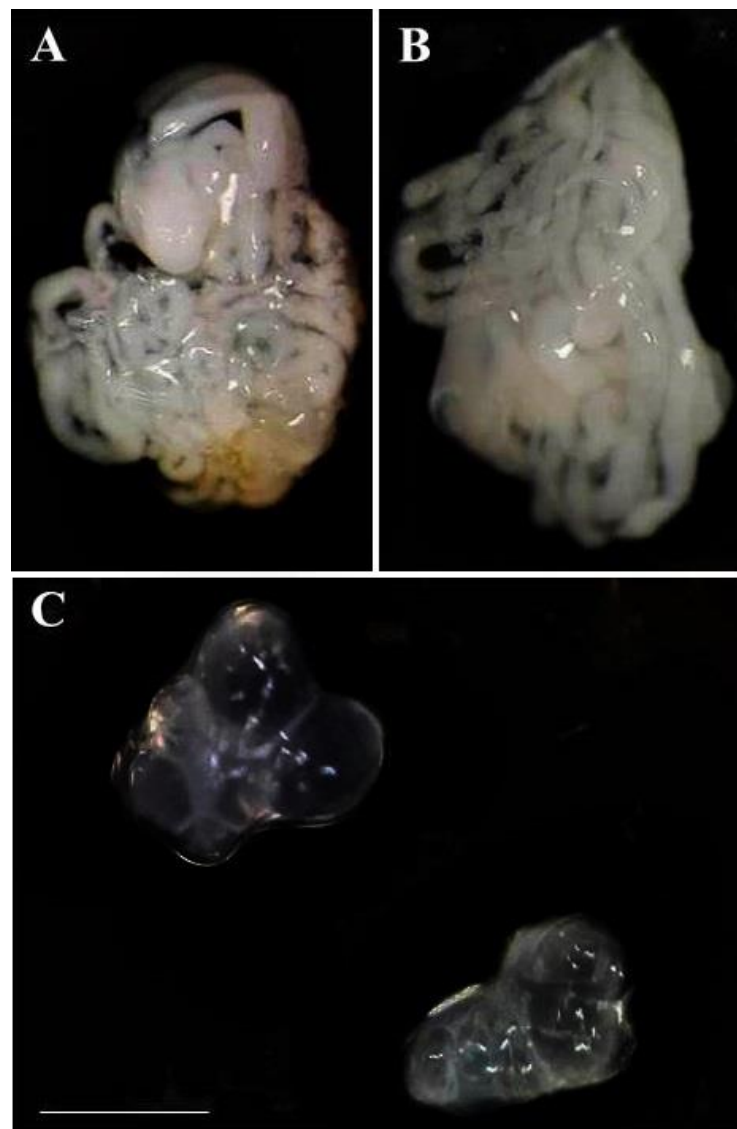


Fig. 2 Male gonads of *T. mopan* (A), *T. longipennis* (B), and hybrid (C). Note that the hybrid's testes are atrophied (C). Bar: 5 mm.

Cytogenetic analyzes of the testis of the hybrids confirmed GD, once no germ cells were observed (only somatic cells, which make up the peritoneal sheath) (Figure 3). On the other hand, the cytogenetic analysis of the gonads of *T. mopan* and *T. longipennis* allowed observing the presence of spermatocytes, spermatids, and spermatozoa (as well as already characterized several times in the subfamily Triatominae [33–36]).

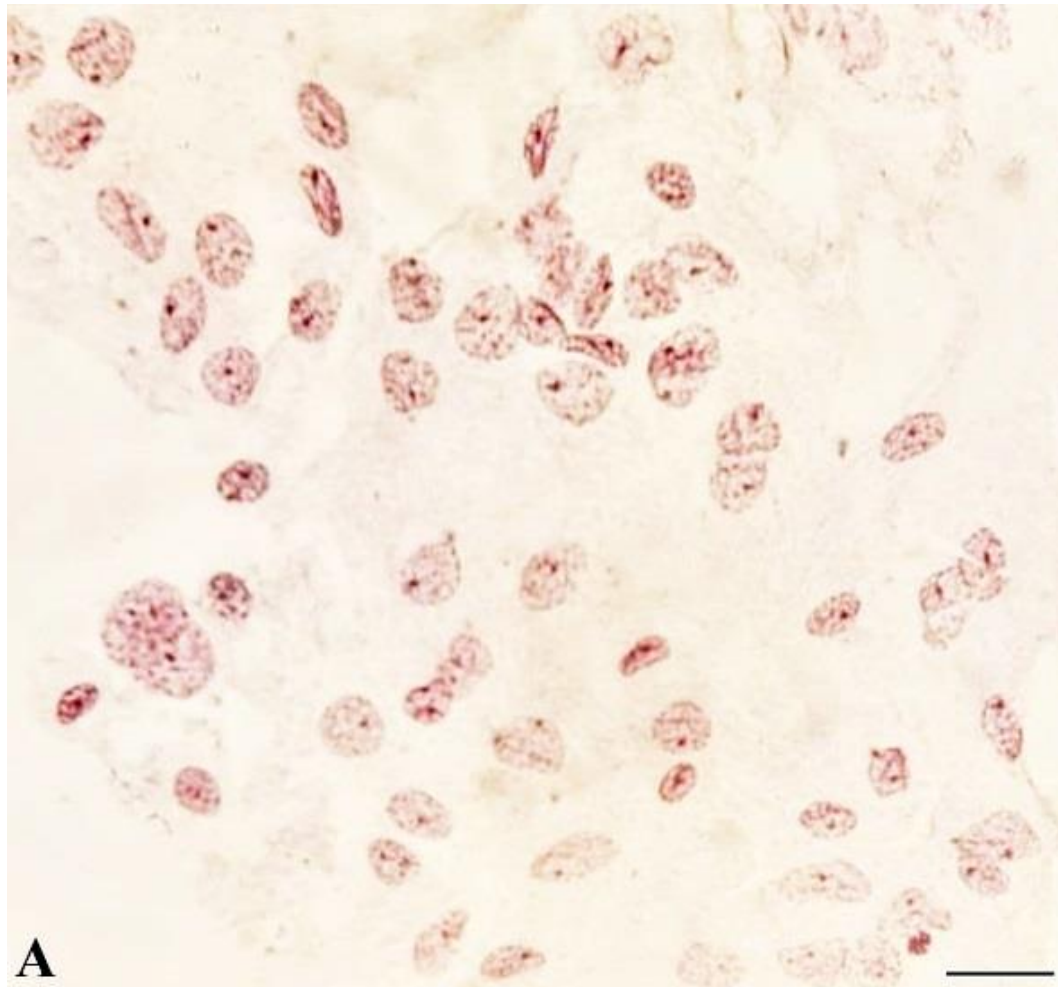


Fig. 3 Somatic cells from the testicular peritoneal sheath. Note the absence of germ cells. Bar: 5 μm .

Furthermore, although it was not possible to assess whether the ovaries of the hybrid females were atrophied from a morphological and cytological point of view (since the meiotic stages are not usually observed [25] and the ovarian development is directly related to the phases of oogenesis [37], which can lead to wrong results when analyzing the hybrid ovaries), the absence of egg

production (Table 1) is a factor that confirms that the ovaries are also atrophied, because egg production in the Triatominae subfamily occurs even without copulation [38,39].

Several interspecific crosses between *Triatoma* spp. [20], *Panstrongylus* spp. [26], *Rhodnius* spp. [25] and *Psammolestes* spp. [17] resulted in sterile hybrids. Most of these studies have cytogenetically analyzed the gonads of male hybrids and observed chromosomal pairing error during meiosis (associating the meiotic errors with the hybrid sterility) [17,20,25,26].

Perlowagora-Szumlewics and Correia [40] and Perlowagora-Szumlewics et al. [41] observed, for example, that male hybrids resulting from crossing *T. pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964 x *T. sordida* (Stål, 1859), *T. pseudomaculata* x *T. infestans* (Klug, 1834), *T. pseudomaculata* x *T. brasiliensis* Neiva, 1911. and *R. prolixus* Stål, 1859 x *R. neglectus* Lent, 1954 are sterile, while females are fertile. In the case of sterile hybrid females [25,26], absence of egg production was observed only for hybrids resulting from the cross between *T. recurva* (Stål, 1868) x *T. mazzottii* (Usinger, 1941) [42].

The study of the interspecific reproductive barriers of the insect vectors of Chagas disease has taxonomic, systematic, genetic, and evolutionary importance [9,11,12,13,16–18,20–23,24–27,42,45]. From a taxonomic point of view, the characterization of pre and/or postzygotic barriers confirms the specific status of the parental species [9,11,13,17,18,20–23, 25–27,42], based on the biological species concept [43,44]. From a systematic point of view, in general, evolutionarily more distant species have prezygotic barriers that prevent the formation of hybrids while evolutionarily closer species can produce hybrids that will be later declined (hybrid breakdown) by postzygotic barriers [14,18,45]. Already from a genetic and evolutionary point of view, the characterization of reproductive barriers directly implies the genetic integrity of the parent species, because it prevents events of interspecific gene flow and, mainly, introgression [11,16,20].

Conclusion

Based on the above, we characterized, for the first time, GD in Triatominae and demonstrated

that gametogenesis does not occur in atrophied gonads. The characterization of DG in hybrids resulting from the crossing of ♀ *T. mopan* x *T. longipennis* ♂ highlights the importance of evaluating both the morphology and the cytogenetics of the gonads to confirm which event resulted in the sterility of the hybrid: GD (which results in no gamete production) or meiotic errors (which results in non-viable gametes).

Declarations

Acknowledgments

We appreciate the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Brazil), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil) – Finance Code 001, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ, Brazil) for financial support.

Funding

The study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Brazil), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil) – Finance Code 001, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ, Brazil).

References

1. World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis). [http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). 2022. Accessed 17 Feb 2023.
2. Alevi KCC, de Oliveira J., Rocha D.S., Galvão C. Trends in taxonomy of Chagas disease

- vectors (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae): from Linnaean to integrative taxonomy. *Pathogens*. 2021;10:1627.
3. Correia JPSO, Gil-Santana HR, Dale C, Galvão C. *Triatoma guazu* Lent and Wygodzinsky is a junior synonym of *Triatoma williami* Galvão, Souza and Lima. *Insects*. 2022; 13:591.
 4. Gil-Santana HR, Chavez T, Pita S, Panzera F, Galvão C. *Panstrongylus noireau*, a remarkable new species of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) from Bolivia. *ZooKeys*. 2022;1104:203–25.
 5. Téllez-Rendón J, Esteban L, Rengifo-Correa L, Díaz-Albiter H, Huerta H, Dale C. *Triatoma yelapensis* sp. nov. (Hemiptera: Reduviidae) from Mexico, with a Key of *Triatoma* Species Recorded in Mexico. *Insects*. 2023; in press.
 6. Martínez-Fernandez F, Martínez-Ibarra JA, Catalá S, Villalobos G, de La Torre P, et al. Natural crossbreeding between sympatric species of the *Phyllosoma* complex (Insecta: Hemiptera: Reduviidae) indicate the existence of only one species with morphologic and genetic variations. *Am J Trop Med Hyg*. 2010; 82:74–82.
 7. Noireau F, Gutierrez T, Zegarra M, Flores R, Brenière F, et al. Cryptic speciation in *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) from the Bolivian Chaco. *Trop Med Int Health*. 1998;3:364–72.
 8. Abalos JW. Sobre híbridos naturales y experimentales de *Triatoma*. *An Inst Reg*. 1948; 2:209–23.
 9. Alevi KCC, Oliveira J, Garcia ACC, Cristal DC, Delgado LMG, Bittinelli IF, et al. *Triatoma rosai* sp. nov. (Hemiptera, Triatominae): a new species of Argentinian Chagas disease vector described based on integrative taxonomy. *Insects*. 2020;11:830.
 10. Vicente RD, Madeira FF, Borsatto KC, Garcia ACC, Cristal DC, Delgado LMG, et al. Morphological, Cytological and Molecular Studies and Feeding and Defecation Pattern of Hybrids from Experimental Crosses between *Triatoma sordida* and *T. rosai* (Hemiptera, Triatominae). *PathogenS*. 2022;11:1302.

11. Cesaretto NR, Reis YV, Oliveira J, Galvão C, Alevi KCC. Revisiting the Genetic, Taxonomic and Evolutionary Aspects of Chagas Disease Vectors of the *Triatoma phyllosoma* Subcomplex (Hemiptera, Triatominae). *Diversity*. 2022;14:978.
12. Pinotti H, Alevi KCC, Oliveira J, Ravazi A, Madeira FF, Reis YV, et al. Segregation of phenotypic characteristics in hybrids of *Triatoma brasiliensis* species complex (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Infect Gen Evol*. 2021;91:104798.
13. Cesaretto NR, Oliveira J, Ravazi A, Madeira FF, Reis YV, et al. Trends in taxonomy of Triatomini (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae): reproductive compatibility reinforces the synonymization of *Meccus* Stål, 1859 with *Triatoma* Laporte, 1832. *Paras Vec*. 2021;14:340.
14. Pinotti H, Alevi KCC, Oliveira J, Ravazi A, Madeira FF, Reis YV, et al. Revisiting the hybridization processes in the *Triatoma brasiliensis* complex (Hemiptera, Triatominae): Interspecific genomic compatibility point to a possible recent diversification of the species grouped in this monophyletic complex. *PLoS One*. 2021;16:e0257992.
15. Chunco AJ. Hybridization in a warmer world. *Ecol Evol*. 2014;4:2019–31.
16. Reis YV, Oliveira J, Madeira FF, Ravazi A, Oliveira ABB, et al. Trends in evolution of the Triatomini tribe (Hemiptera, Triatominae): reproductive incompatibility between four species of *geniculatus* clade. *Parasit Vect*. 2022;15:403.
17. Ravazi A, Oliveira J, Campos FF, Madeira FF, Reis YV, et al. Trends in evolution of the Rhodniini tribe (Hemiptera, Triatominae): experimental crosses between *Psammolestes tertius* Lent & Jurberg, 1965 and *P. coreodes* Bergroth, 1911 and analysis of the reproductive isolating mechanisms. *Parasit Vect*. 2021;14:350.
18. Delgado LMG, Oliveira J, Ravazi A, Madeira FF, Reis YV, et al. Revisiting the Hybridization Processes in the *Triatoma brasiliensis* Complex (Hemiptera, Triatominae): Reproductive Isolation between *Triatoma petrocchiai* and *T. b. brasiliensis* and *T. lenti*. *Insects*, 2021;12:1015.
19. Usinger RL, Wygodzinsky P, Ryckman RE. The biosystematics of Triatominae. *Annu Rev*

- Entomol.1966;11:309–30.
20. Pérez R, Hernández M, Quintero O, Scvortzoff E, Canale D, et al. Cytogenetic analysis of experimental hybrids in species of Triatominae (Hemiptera-Reduviidae). *Genetica*. 2005;125:261–70.
 21. Martínez-Ibarra JA, Grant-Guillén Y, Delgadillo-Aceves IN, Zumaya-Estrada FA, Rocha-Chávez G, et al. Biological and genetic aspects of crosses between phylogenetically close species of Mexican Triatomines (Hemiptera: Reduviidae). *J Med Entomol*. 2011;48:705–07.
 22. Mendonça VJ, Alevi KCC, Medeiros LMO, Nascimento JD, Azeredo-Oliveira MTV, et al. Cytogenetic and morphologic approaches of hybrids from experimental crosses between *Triatoma lenti* Sherlock & Serafim, 1967 and *T. sherlocki* Papa et al., 2002 (Hemiptera: Reduviidae). *Inf Gen Evol*. 2014;26:123–31.
 23. Alevi KCC, Pinotti H, Araújo RF, Azeredo-Oliveira MTV, Rosa JA, et al. Hybrid collapse confirm the specific status of *Triatoma bahiensis* Sherlock and Serafim, 1967 (Hemiptera, Triatominae). *Am J Trop Med Hyg*. 2018;98:475–77.
 24. Almeida LM, Carareto CMA. Gonadal hybrid dysgenesis in *Drosophila sturtevantii* (Diptera, Drosophilidae). *Ilheringia*, 2002;92:71–9.
 25. Díaz S, Panzera F, Jaramillo-O N, Pérez R, Fernández R, et al. Genetic, Cytogenetic and Morphological Trends in the Evolution of the *Rhodnius* (Triatominae: Rhodniini) Trans-Andean Group. *PLoS ONE*. 2014;9:87493.
 26. Villacís AG, Dujardin JP, Panzera F, Yumiseva CA, Pita S, Santillán-Guayasamín S, et al. Chagas vectors *Panstrongylus chinai* (Del Ponte, 1929) and *Panstrongylus howardi* (Neiva, 1911): chromatic forms or true species? *Parasit Vectors*. 2020;13:226.
 27. Campos-Soto R, Panzera F, Pita S, Lages C, Solari A, et al. Experimental crosses between *Mepraia gajardoi* and *M. spinolai* and hybrid chromosome analyses reveal the occurrence of several isolation mechanisms. *Inf Gen Evol*. 2016;45:205-212.
 28. Alevi KCC, Mendonça PP, Pereira NP, Rosa JA, Azeredo-Oliveira MTV. Karyotype of

- Triatoma melanocephala* Neiva & Pinto (1923). Does this species fit in the Brasiliensis subcomplex? Infect Genet Evol. 2012;12:1652-1653.
29. De Vaio ES, Grucchi B, Castagnino AM, Franca ME, Martinez ME. Meiotic differences between three triatomine species (Hemiptera:Reduviidae). Genetica. 1985;67:185-191.
 30. Davey KG. La reproducción em los insectos. Madrid: Editorial Alhambra; 1968.
 31. Alevi KCC. Morphology of Testicular Follicles as Taxonomic Tool in the Subfamily Triatominae. Entomol Ornithol Herpetol. 2015;4:e110.
 32. Alevi KCC, Oliveira J, Rosa JA, Azeredo-Oliveira MTV. Coloration of the testicular peritoneal sheath as a synapomorphy of triatomines (Hemiptera, Reduviidae) Biota Neotrop. 2014;14:1–3.
 33. Alevi KCC, Rosa JA, Azeredo-Oliveira MTV. Spermatogenesis in *Triatoma melanica* Neiva and Lent, 1941 (Hemiptera, Triatominae). J Vect Ecol. 2014;39:231–33.
 34. Alevi KCC, Mendonça PP, Pereira NP, Rosa JA, Azeredo-Oliveira MTV. Spermatogenesis in *Triatoma melanocephala* (Hemiptera: Triatominae). Gen Mol Res. 2013;12:4944–47.
 35. Alevi KCC, Mendonça PP, Pereira NP, Rosa JA, Azeredo-Oliveira MTV. Heteropyknotic filament in spermatids of *Triatoma melanocephala* and *T. vitticeps* (Hemiptera, Triatominae). Invert Reprod Devel, 2013;58:1–4.
 36. Alevi KCC, Mendonça PP, Pereira NP, Fernandes ALVZ, Rosa JA, Azeredo-Oliveira MTV. Analysis of spermiogenesis like a tool in the study of the triatomines of the Brasiliensis subcomplex. Comp Rend Biol. 2013;336:46–50.
 37. 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. 2005;77:405–30.
 38. Davey KG. Copulation and egg-production in *Rhodnius prolixus*: the role of the spermathecae. J Exp Biol. 1965;42:373–78.
 39. Davey KG. Some consequences of copulation in *Rhodnius prolixus*. J Insect Physiol.

1967;13:1629–36.

40. Perlowagora-Szumlewics A, Correia MV. Induction of male sterility manipulation of genetic mechanisms present in vector species of Chagas disease (remarks on integrating sterile-male release with insecticidal control measures against vectors of Chagas disease). *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1972;14:360–71.
41. Perlowagora-Szumlewicz A, Correia MV, Trinchet AMR. Induction of male sterility through manipulation of genetic mechanisms present in vector species of triatominae. II. Partial restoration of male fertility. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1976;10:367–83.
42. Martinez-Ibarra JA, Noqueda-Torres B, Licón-Trillo A, Alejandre-Aguilar R, Salazar-Schettino PM, et al. Biological aspects of crosses between *Triatoma recurva* (Stål), 1868 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) and other members of the *Phyllosoma* complex. *J Vector Ecol*. 2015;40:117–22.
43. Mayr, E. *Populações, Espécies e Evolução*, 1st ed.; Editora Nacional: São Paulo, Brazil, 1963.
44. Mayr, E. *Populations, Species, and Evolution*; Harvard University Press: Cambridge, MA, USA, 1970.
45. Neves JMS, Sousa PS, Oliveira J, Ravazi A, Madeira FF, Reis YV, et al. Prezygotic isolation confirms the exclusion of *Triatoma melanocephala*, *T. vitticeps* and *T. tibiamaculata* of the *T. brasiliensis subcomplex* (Hemiptera, Triatominae). *Infect Genet Evol*. 2020;79:104149.

4. CONCLUSÕES GERAIS

Com base no exposto, confirmamos a presença de barreira reprodutiva pós-zigótica por disgenesia gonadal em híbridos resultantes do cruzamento entre *T. mopan* x *T. longipennis* – confirmando, assim, o *status* específico dos parentais, pelo conceito biológico de espécie. Além disso, demonstramos que durante o fenômeno de disgenesia gonadal, as gônadas estão totalmente atrofiadas e não realizam gametogênese.

REFERÊNCIAS

ALEVI, K.C.C.; OLIVEIRA, J.; GARCIA, A.C.C.; CRISTAL, D.; DELGADO, L.M.G.; BITTINELLI, I.F.; REIS, Y.V.; RAVAZI, A.; OLIVEIRA, A.B.B.; GALVÃO, C.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V.; MADEIRA, F.F. *Triatoma rosai* sp. nov. (Hemiptera, Triatominae): A New Species of Argentinian Chagas Disease Vector Described Based on Integrative Taxonomy. **Insects**, v. 11, p. 830, 2020.

ALEVI, K.C.C.; OLIVEIRA, J.; ROCHA, D.S.; GALVÃO, C. Trends in taxonomy of Chagas disease vectors (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae): From Linnaean to integrative taxonomy. **Pathogens**, v. 10, p. 1627, 2021.

ALEVI, K.C.C.; PINOTTI, H.; ARAÚJO, R.F.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V.; ROSA, J.A.; MENDONÇA, V.J. Hybrid collapse confirm the specific status of *Triatoma bahiensis* Sherlock and Serafim, 1967 (Hemiptera, Triatominae). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, p. 475-477, 2018.

ALMEIDA, L.M.; CARARETO, C.M.A. Gonadal hybrid dysgenesis in *Drosophila sturtevantii* (Diptera, Drosophilidae). **Ilheringia**, v. 92, p. 71-79, 2002.

CARCAVALLO, R.U.; JURBERG, J.; LENT, H.; NOIREAU, F.; GALVÃO, C. Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). Proposals for taxonomic arrangements **Entomolgia y Vectores**, v. 7, p. 1-99, 2000.

CESARETTO NR, REIS YV, OLIVEIRA J, GALVÃO C, ALEVI KCC. Revisiting the Genetic, Taxonomic and Evolutionary Aspects of Chagas Disease Vectors of the *Triatoma phyllosoma*

Subcomplex (Hemiptera, Triatominae). **Diversity**, v. 14, p. 978, 2022.

CESARETTO, N.R.; OLIVEIRA, J.; RAVAZI, A.; MADEIRA, F.F.; REIS, Y.V.; OLIVEIRA, A.B.B.; VICENTE, R.D.; CRISTAL, D.C.; GALVÃO, C.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V.; ROSA, J.A.; ALEVI, K.C.C. Trends in taxonomy of Triatomini (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae): reproductive compatibility reinforces the synonymization of *Meccus* Stål, 1859 with *Triatoma* Laporte, 1832. **Parasites & Vectors**, v. 14, p. 340, 2021.

CHAGAS, C.R.J. Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen. n. esp., agente da nova entidade mórbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159-218, 1909.

CORREIA; J.P.S.O.; GIL-SANTANA, H.R.; DALE, C.; GALVÃO, C. *Triatoma guazu* Lent and Wygodzinsky is a junior synonym of *Triatoma williamsi* Galvão, Souza and Lima. **Insects**, v. 13, p. 591, 2022.

DELGADO, L.M.G.; OLIVEIRA, J.D.; RAVAZI, A.; MADEIRA, F.F.; REIS, Y.V.D.; PINOTTI, H.; OLIVEIRA, A.B.B.D.; MASARIN, I.D.S.; LILIOSO, M.; FOLLY-RAMOS, E.; et al. Revisiting the Hybridization Processes in the *Triatoma brasiliensis* Complex (Hemiptera, Triatominae): Reproductive Isolation between *Triatoma petrocchiae* and *T. b. brasiliensis* and *T. lenti*. **Insects**, v. 12, p. 1015, 2021.

GIL-SANTANA, H.R.; CHAVEZ, T.; PITA, S.; PANZERA, F.; GALVÃO, C. *Panstrongylus noireau*, a remarkable new species of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) from Bolivia. **ZooKeys**, v. 1104, p. 203-225, 2022.

HYPSE, V.; TIETZ, D.; ZRZAVY, J.; REGO, R.O.; GALVÃO, C.; JURBERG, J. Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae): Molecular evidence of a New World origin of the Asiatic clade. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 23, p. 447-457, 2012.

JUSTI, S.A.; GALVÃO, C.; SCHRAGO, C.G. Geological Changes of the Americas and their Influence on the Diversification of the Neotropical Kissing Bugs (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, p. e0004527, 2016.

JUSTI, S.A.; RUSSO, C.A.M.; SANTOS-MALLET, J.R.; OBARA, M.T.; GALVÃO, C. Molecular phylogeny of Triatomini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Parasites & Vectors**, v. 7, p. e149, 2014.

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. 123-520, 1979.

MARTINEZ-HERNANDEZ, F.; VILLALOBOS, G.; MARTÍNEZ-IBARRA, J.A. Population structure and genetic diversity of *Triatoma longipennis* (Usinger, 1939) (Heteroptera: Reduviidae: Triatominae) in Mexico. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 89, p. 104718, 2021.

MARTÍNEZ-IBARRA, J.A.; GRANT-GUILLÉN, Y.; DELGADILLO-ACEVES, I.N.; ZUMAYA-ESTRADA, F.A.; ROCHA-CHÁVEZ, G.; SALAZARSCHETTINO, P.M.; ALEJANDRE-AGUILAR, R.; VILLALOBOS, G.; NOGUEDA-TORRES, B. Biological and genetic aspects of crosses between phylogenetically close species of Mexican Triatomines (Hemiptera: Reduviidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 48, p. 705-707, 2011.

MAYR, E. **Populações, Espécies e Evolução**, 1sted.; Editora Nacional: São Paulo, Brazil, 1963.

MAYR, E. **Populations, Species, and Evolution**; Harvard University Press: Cambridge, MA, USA, 1970.

MENDONÇA, V.J.; ALEVI, K.C.C.; MEDEIROS, L.M.O.; NASCIMENTO, J.D.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V.; ROSA, J.A. Cytogenetic and morphologic approaches of hybrids from experimental crosses between *Triatoma lenti* Sherlock & Serafim, 1967 and *T. sherlocki* Papa et al., 2002 (Hemiptera: Reduviidae). **Infection, Genetics and Evolution**, v. 26, p. 123-131, 2014.

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.

PITA, S.; LORITE, P.; NATTERO, J.; GALVÃO, C.; ALEVI, K.C.C.; TEVES, S.C.; et al. 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.

RAVAZI, A.; OLIVEIRA, J.; CAMPOS, F.F.; MADEIRA, F.F.; REIS, Y.V.; OLIVEIRA, A.B.B.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V.; ROSA, J.A.; ALEVI, K.C.C. Trends in evolution of the Rhodniini tribe (Hemiptera, Triatominae): experimental crosses between *Psammolestes tertius* Lent & Jurberg, 1965 and *P. coreodes* Bergroth, 1911 and analysis of the reproductive isolating mechanisms. **Parasites & Vectors**, v. 14, p. 350, 2021.

REIS, Y.V.D.; OLIVEIRA, J.; MADEIRA, F.F.; RAVAZI, A.; OLIVEIRA, A.B.B.D.; BITTINELLI,

I.D.S.; DELGADO, L.M.G.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V.; ROSA, J.A.D.; GALVÃO, C.; et al. Karyotype Evolution in Triatominae (Hemiptera, Reduviidae): The Role of Chromosomal Rearrangements in the Diversification of Chagas Disease Vectors. **International Journal of Molecular Science**, v. 24, p. 6350, 2023.

TÉLLEZ-RENDÓN, J.; ESTEBAN, L.; RENGIFO-CORREA, L.; DÍAZ-ALBITER, H.; HUERTA, H.; DALE, C. *Triatoma yelapensis* sp. nov. (Hemiptera: Reduviidae) from Mexico, with a Key of *Triatoma* Species Recorded in Mexico. **Insects**, v. 14, p. 331, 2023.

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

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. 2022. Disponível em: [http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Acesso em 25 de abril de 2023.