



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

Amanda Ravazi

**Estudo sobre hibridização na tribo Rhodniini (Hemiptera,
Reduviidae): dinâmica evolutiva, viabilidade reprodutiva,
caracterização morfo-molecular e suas implicações taxonômicas**

São José do Rio Preto
2019

Amanda Ravazi

**Estudo sobre hibridização na tribo Rhodniini (Hemiptera,
Reduviidae): dinâmica evolutiva, viabilidade reprodutiva,
caracterização morfo-molecular e suas implicações taxonômicas**

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

Financiadora: CAPES

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

Co-orientador: Prof. Dr. Kaio Cesar Chaboli Alevi

São José do Rio Preto
2019

R252e

Ravazi, Amanda

Estudo sobre hibridização na tribo Rhodniini (Hemiptera, Reduviidae): dinâmica evolutiva, viabilidade reprodutiva, caracterização morfo-molecular e suas implicações taxonômicas / Amanda Ravazi. -- São José do Rio Preto, 2019

67 f. : il., 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. Genética Animal. 2. Cruzamentos (Genética). 3. Triatomíneo. 4. Doença de Chagas. 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.

Amanda Ravazi

**Estudo sobre hibridização na tribo Rhodniini (Hemiptera,
Reduviidae): dinâmica evolutiva, viabilidade reprodutiva,
caracterização morfo-molecular e suas implicações taxonômicas**

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

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

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

Prof. Dr. João Aristeu da Rosa
UNESP – Câmpus Araraquara (FCFAR)

Prof. Dr. Luis Lênin Vicente Pereira
União das Faculdades dos Grandes Lagos - UNILAGO

São José do Rio Preto
22 de fevereiro de 2019

Local de Realização

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Celular do Departamento de Biologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto – IBILCE/UNESP e no Laboratório de Parasitologia do Departamento de Ciências Biológicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – FCFAR/UNESP.

Dedicatória

Dedico esta conquista aos meus pais Valéria e Ricardo, que mesmo diante de toda dificuldade nunca deixaram de acreditar em mim. Ao meu irmão Pedro, que sempre me apoiou e esteve presente em cada passo da minha vida. Ao meu querido tio Valdemar Rebollo Júnior (*in memoriam*), dedico todo o meu sonho e realização. A Deus, dedico toda minha gratidão por tamanho amor.

"Nem olhos viram, nem ouvidos ouviram, nem jamais penetrou em coração humano o que Deus tem preparado para aqueles que o amam." 1 Coríntios 2:9

Agradecimentos

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

Agradeço primeiramente a Deus, por toda bondade e amor comigo, que sempre me proporcionou o necessário para o cumprimento dos seus sonhos em minha vida. Agradeço por tamanho carinho e fidelidade de suas promessas.

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Maria Tercilia Vilela de Azeredo Oliveira, agradeço pelo apoio profissional e acolhimento, por me permitir adentrar os caminhos da ciência. A você, o meu muito obrigada!

Ao meu amigo e co-orientador Prof. Dr. Kaio Cesar Chaboli Alevi, agradeço por todas as oportunidades de crescimento pessoal e profissional, por toda a paciência e carinho. Agradeço por me ensinar diariamente o quanto podemos ser justos e o quanto podemos nos esforçar para alcançar aquilo que desejamos. Por muitas vezes, o seu amor pela ciência permitiu que eu acreditasse em mim mesma. A você, o meu muito obrigada!

As minhas amigas e companheiras de laboratório, Fernanda Fernandez Madeira, Ana Letícia Guerra, Ana Beatriz Bortolozo de Oliveira, agradeço por todos os momentos de alegria compartilhados, risadas, também momentos de desespero e por todos auxílios que eu recebi quando precisei. Vocês fizeram e fazem a diferença em todo este tempo. A vocês, o meu muito obrigada!

Aos meus colegas de laboratório, agradeço pela convivência e possibilidade de crescimento pessoal e profissional também. A vocês o meu muito obrigada!

Aos meus pais, Valéria e Ricardo, agradeço por serem a minha base em todos os sentidos, por acreditarem em mim quando eu precisei. Agradeço diariamente por serem vocês os pais que Deus quis me dar, por serem meu modelo de amor e fidelidade. A vocês, o meu muito obrigada!

Ao meu irmão, Pedro, agradeço por me formar como pessoa, por me ensinar o sentido de partilhar e por ter sido um motivo para que eu pudesse seguir em frente. Agradeço por encontrar em você o meu porto seguro. A você, o meu muito obrigada!

Aos meus avós maternos, Neide e Valdemar, e paternos, Maria José e Nelson (*in memorian*), agradeço pela simplicidade no olhar, no falar, no agir e no amar, que em tantos momentos me proporcionaram a vontade de poder dar o meu melhor. Por vezes, no pouco, me fizeram ter a certeza que a vida vale a pena. A vocês, o meu muito obrigada!

As minhas tias, Rosimeire, Renata e Vera e aos meus tios Atayde e Euler, agradeço por toda a ajuda financeira e emocional. Nos momentos mais difíceis estiveram comigo e me estenderam as mãos e também os seus corações quando eu precisei. A vocês, o meu muito obrigada!

De forma especial, agradeço ao meu tio Valdemar Rebollo Junior (*in memorian*), por me fazer entender que a vida merece ser vivida até o último segundo. Por me fazer lembrar o quanto é bom sorrir e o quanto sou capaz de levar alegria onde mora tristeza. Por me fazer acreditar que mereço ser feliz e principalmente, por me mostrar que tenho apenas o hoje. A você, o meu eterno muito obrigada!

Aos meus amigos Maria Izabel Salioni, Matheus Castro, Gabriel Lois, Lais Azevedo, Camila Marques agradeço por darem o seu melhor em minha vida, por dedicarem as suas orações a mim. Agradeço por estarem presentes fisicamente em todas as minhas lutas e conquistas e principalmente, por decidirem passar por todas elas ao meu lado. A vocês, o meu muito obrigada!

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que participaram desta conquista!

RESUMO

Híbridos naturais já foram relatados para a tribo Rhodniini e os estudos acerca dos cruzamentos experimentais podem ajudar a compreender a sistemática deste grupo de vetores. Ainda, podem ser usados para analisar os mecanismos de isolamento que limitam o fluxo gênico entre as diferentes espécies bem como podem ser empregados para o estabelecimento do papel da hibridação natural na geração de novas variantes. O presente projeto teve como objetivo realizar uma análise multidisciplinar de aspectos evolutivos (barreiras pré e pós-zigóticas) e taxonômicos na tribo Rhodniini, por meio de cruzamentos experimentais e análise dos híbridos resultantes até, pelo menos, a terceira geração (F3), com ênfase na análise da dinâmica evolutiva dos cruzamentos experimentais (cópula, oviposição, eclosão e desenvolvimento dos híbridos), bem como na análise da viabilidade reprodutiva (espermatogênese e morfologia das gônadas masculinas e femininas) e do padrão de segregação das características fenotípicas dos parentais nos híbridos experimentais. Os cruzamentos permitiram observar que os gêneros *Rhodnius* e *Psammolestes* estão isolados reprodutivamente por barreiras pré-zigóticas, corroborando o *status* genérico de *Psammolestes*. Além disso, permitiram ressaltar o *status* específico de *P. tertius* e *P. coreodes*, pois embora híbridos em primeira geração (F1) eclodiram, barreiras pós-zigóticas de inviabilidade do híbrido e quebra do híbrido foram relatadas. O *status* específico de *R. nasutus* e *R. prolixus* foi confirmado pelos fenômenos de inviabilidade e esterilidade dos híbridos e o *status* de *R. montenegrensis* por eventos de inviabilidade do híbrido em F1, esterilidade do híbrido para F2 proveniente do cruzamento inicial entre *R. montenegrensis* ♀ x *R. robustus* ♂ e desmoronamento do híbrido atuando em F2 e F3.

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

ABSTRACT

Natural hybrids have been reported for the Rhodniini tribe, and studies of experimental crosses may help to understand the systematics of this group of vectors. Furthermore, they can be used to analyze the mechanisms of isolation that limit the gene flow between the different species and can be used to establish the role of natural hybridization in the generation of new variants. The present project aimed to carry out a multidisciplinary analysis of evolutionary aspects (pre- and post-zygotic) and taxonomic barriers in the Rhodniini tribe, by means of experimental crosses and analysis of the resulting hybrids up to at least the third generation (F3), with (spermatogenesis and morphology of male and female gonads) and the segregation pattern of the phenotypic characteristics of the parents in the hybrids experiments. The crosses showed that the genera *Rhodnius* and *Psammolestes* are reproductively isolated by pre zygotic barriers, corroborating the generic status of *Psammolestes*. In addition, they allowed to highlight the specific status of *P. tertius* and *P. coreodes*, because although hybrids in the first generation (F1) erupted, post zygotic barriers of hybrid unfeasibility and hybrid breakage were reported. The specific status of *R. nasutus* and *R. prolixus* was confirmed by the phenotypes of infeasibility and sterility of the hybrids and the status of *R. montenegrensis* by events of non-viability of the hybrid in F1, hybrid sterility of F2 from the initial cross between *R. montenegrensis* ♀ x *R. robustus* ♂ and collapse of the hybrid acting on F2 and F3.

Keywords: Experimental crosses. Hybrids. Triatomines. Chagas disease.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fluxograma dos cruzamentos experimentais.	21
Figura 2 – Pontos de referência (<i>landmarcks</i>).	24
Figura 3 – Cruzamentos experimentais entre <i>R. nasutus</i> ♀ e <i>R. prolixus</i> ♂.	48
Figura 4 – Híbridos adultos do cruzamento experimental entre <i>R. nasutus</i> e <i>R. prolixus</i> .	49
Figura 5 – Gônadas de híbridos do cruzamento experimental entre <i>R. nasutus</i> e <i>R. prolixus</i> .	49
Figura 6 – Metáfases meióticas do cruzamento experimental entre <i>R. prolixus</i> ♀ e <i>R. nasutus</i> .	50
Figura 7 – Mapa fatorial gerado a partir da morfometria da asa de <i>R. nasutus</i> , <i>R. prolixus</i> , híbridos de <i>R. prolixus</i> ♀ e <i>R. nasutus</i> ♂ e híbridos de <i>R. nasutus</i> ♀ e <i>R. prolixus</i> ♂.	51
Figura 8 – Adultos de <i>R. nasutus</i> e <i>R. prolixus</i> e híbridos adultos do cruzamento entre <i>R. nasutus</i> e <i>R. prolixus</i> .	51
Figura 9 – Cruzamentos experimentais interespecíficos entre <i>R. montenegrensis</i> e <i>R. robustus</i> .	53
Figura 10 – Híbridos adultos provenientes do cruzamento experimental entre <i>R. montenegrensis</i> e <i>R. robustus</i> .	53
Figura 11 – Gônadas não atrofiadas de híbridos provenientes do cruzamento experimental entre <i>R. montenegrensis</i> e <i>R. robustus</i> .	55
Figura 12 – Metáfases meióticas do cruzamento experimental entre <i>R. montenegrensis</i> ♀ x <i>R. robustus</i> ♂ e <i>R. robustus</i> ♀ e <i>R. montenegrensis</i> ♂.	56
Figura 13 – Mapa fatorial gerado a partir da morfometria da asa de <i>R. montenegrensis</i> ♀ x <i>R. robustus</i> ♂ e <i>R. robustus</i> ♀ e <i>R. montenegrensis</i> ♂.	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Cruzamentos experimentais realizados na subfamília Triatominae.	12
Tabela 2 – Cruzamentos experimentais realizados.	22
Tabela 3 – Cruzamentos experimentais realizados entre <i>R. nasutus</i> e <i>R. prolixus</i>	47
Tabela 4 – Cruzamentos experimentais realizados entre <i>R. montenegrensis</i> e <i>R. robustus</i> .	54

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivo Geral.....	20
2.2	Objetivos Específicos	20
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1	Delineamento do estudo.....	21
3.2	Cruzamentos Experimentais.....	23
3.3	Análises Citogenéticas	23
3.4	Análises Morfológicas.....	24
3.4.1	Caracterização Fenotípica.....	24
3.4.2	Morfometria Geométrica	24
3.4.3	Morfologia Interna.....	26
4	RESULTADOS.....	27
4.1	Artigo a ser submetido para a revista <i>Infection, Genetics and Evolution</i>	27
4.2	Artigo a ser submetido para a revista <i>Plos One</i>	33
4.3	Resultados em forma de apresentação	47
4.3.1	Cruzamentos experimentais no gênero <i>Rhodnius</i>	47
4.3.1.1	<i>R. nasutus</i> x <i>R. prolixus</i>	47
4.3.1.2	<i>R. montenegrensis</i> x <i>R. robustus</i>	53
5	CONCLUSÃO.....	59
	REFERÊNCIAS	60

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 pessoas e coloca em risco de infecção, aproximadamente, 25 milhões de pessoas no mundo, sendo o tratamento com os anti-tripanosomatídeos (Benznidazol e Nifurtimox) efetivos apenas na fase aguda da doença (que, na maioria dos casos, é assintomática) (WHO, 2018). Dessa forma, o controle das populações de vetores é considerado como a principal forma de minimizar a incidência de novos casos chagásicos, sendo os estudos relacionados com os triatomíneos de extrema importância para a saúde pública, uma vez que podem gerar subsídios para auxiliar os programas de controle de vetores na profilaxia da doença de Chagas.

Além da importância vetorial, esses hemípteros são modelos biológicos clássicos para estudos celulares (CARVALHO e RECCO-PIMENTEL, 2013) e contribuíram, substancialmente, para o conhecimento da fisiologia (WIGGLESWORTH, 1931) e evolução (GAUNT e MILES, 2002) dos insetos. Diante dos aspectos evolutivos, embora o conceito biológico de espécie apresentado por Mayr (1963) e Dobzhansky (1935) prediz que “espécies são grupos de populações naturais que se inter cruzam real ou potencialmente e que são isoladas reprodutivamente de outros grupos (produzindo qualquer incompatibilidade com os parentais, ou esterilidade dos híbridos, ou ambos)”, são inúmeros os casos de formação de híbridos interespecíficos na literatura (CHUNCO, 2014). Para os insetos vetores da doença de Chagas, por exemplo, diversos casos de hibridação natural e/ou experimental foram observados (Tabela 1) (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., 2008, 2011, 2016a,b; CORREIA et al., 2013; DÍAZ et al., 2014; MENDONÇA et al., 2014, 2016; CAMPOS-SOTO et al., 2016).

Tabela 1. Cruzamentos experimentais realizados na subfamília Triatominae.

(continua)

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

(continuação)

♂	<i>Triatoma infestans</i>	x	<i>Triatoma platensis</i>	♀	F2 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 sórdida</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

(continuação)

<i>Rhodnius prolixus</i>	x	<i>Rodnius 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. macromelasoma</i>	♀	F1 e F2
♂ <i>Triatoma b. macromelasoma</i>	x	<i>Triatoma brasiliensis</i>	♀	F1 e F2
♂ <i>Triatoma brasiliensis</i>	x	<i>Triatoma juazeirensis</i>	♀	F1 e F2
♂ <i>Triatoma juazeirensis</i>	x	<i>Triatoma brasiliensis</i>	♀	F1 e F2
♂ <i>Triatoma b. macromelasoma</i>	x	<i>Triatoma melanica</i>	♀	F1 e F2
♂ <i>Triatoma melanica</i>	x	<i>Triatoma b. macromelasoma</i>	♀	F1 e F2
♂ <i>Triatoma melanica</i>	x	<i>Triatoma juazeirensis</i>	♀	F1 e F2
♂ <i>Triatoma juazeirensis</i>	x	<i>Triatoma melanica</i>	♀	F1 e F2
♂ <i>Triatoma b. macromelasoma</i>	x	<i>Triatoma juazeirensis</i>	♀	F1 e F2
♂ <i>Triatoma juazeirensis</i>	x	<i>Triatoma b. macromelasoma</i>	♀	F1 e F2
♂ <i>Triatoma sherlocki</i>	x	<i>Triatoma juazeirensis</i>	♀	F1
♂ <i>Triatoma juazeirensis</i>	x	<i>Triatoma sherlocki</i>	♀	F1

(conclusão)

♂	<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

Fonte: Elaborado pelo autor.

A realização de cruzamentos experimentais e a análise dos híbridos são importantes ferramentas para a taxonomia dos triatomíneos. Por exemplo, o *status* específico de espécies agrupadas no complexo *Triatoma brasiliensis* (COSTA et al., 2003, 2009; CORREIA et al., 2013; MENDONÇA et al., 2014, 2016), assim como no complexo *Meccus phyllosoma* (MARTÍNEZ-IBARRA et al., 2008, 2011) e no complexo *T. dimidiata* (GARCÍA et al., 2013) foi corroborado por meio de cruzamentos experimentais. 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 dessa metodologia para ressaltar o *status* específico de *T. petrocchiae* 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. petrocchiae* 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).

No entanto, a maioria dos estudos relacionados com a análise da viabilidade dos híbridos de triatomíneos analisa os cruzamentos até a primeira geração (F1) ou, no máximo, a segunda geração (F2), com ênfase, principalmente, na produção ou não de híbridos entre as espécies parentais. Embora essas análises apresentem grande valor científico, principalmente para os cruzamentos resultantes em ovos inférteis (barreira de isolamento reprodutivo pré-zigótico) ou F1 e F2 inviáveis (barreira pós-zigótica), consideramos que cessar os cruzamentos em F1 ou F2 possa ser o principal fator relacionado com os triatomíneos não se adequarem ao conceito biológico de espécie proposto por Mayr (1963), pois existem diversos fatores relacionados com isolamento reprodutivo pós-zigótico que podem inviabilizar os híbridos a partir da F1 [como, por exemplo, o desmoronamento do híbrido, descrito

recentemente na subfamília Triatominae (MENDONÇA et al., 2014)] e, dessa forma, corroborar o conceito de espécie. Assim, sugerimos a necessidade de avaliar a viabilidade híbrida até, pelo menos, a terceira geração (F3) [conforme também sugerido por Mayr (1963)], sobretudo com uma abordagem multidisciplinar, assim como Mendonça et al. (2014) fizeram para o cruzamento experimental entre *T. lenti* Sherlock & Serafim, 1967 e *T. sherlocki* Papa et al. (2012).

Os mecanismos de isolamento reprodutivo são agrupados, principalmente, em pré e pós-zigóticos (DOBZHANSKY, 1935; MAYR, 1963). Na subfamília Triatominae, os principais eventos relatados, até o momento, foram:

a) Isolamento ecológico (barreira pré-zigótica)

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

b) Isolamento mecânico (barreira pré-zigótica)

Na subfamília Triatominae, o isolamento mecânico está associado com a incompatibilidade das genitálias e acontece com certa frequência em apenas uma direção dos cruzamentos, como ocorre no cruzamento entre fêmea de *T. platensis* com machos de *T. delpontei* Romãña & 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 (barreira pré-zigótica)

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. petrocchiaie* (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.

d) Inviabilidade do híbrido (barreira pós-zigótica)

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

e) Esterilidade do híbrido (barreira pós-zigótica)

Nesse caso, os híbridos em F1 chegam até a fase adulta, mas são incapazes de produzir F2, pois são estéreis (disgenesia gonadal) ou produzem gametas inviáveis resultantes de anomalias cromossômicas durante a espermatogênese, como acontece, por exemplo, para os híbridos resultantes entre o cruzamento experimental entre *T. infestans* e *T. rubrovaria* (Blanchard, 1843), que 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* (SCHREIBER et al., 1975), que apresentaram espermátides e espermatozoides gigantes e anômalos.

f) Desmoronamento do híbrido (barreira pós-zigótica)

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*) 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).

A tribo Rhodniini é um grupo monofilético composto por 23 espécies agrupadas nos gêneros *Rhodnius* (20 espécies) e *Psammolestes* (três espécies) (GALVÃO, 2014, SOUZA et al., 2016a; ROSA et al., 2017, POINAR, 2019, NASCIMENTO et al., 2019). Híbridos naturais já foram relatados para essa tribo, especificamente no gênero *Rhodnius* (DIAS et al., 2014). Cruzamentos experimentais, bem como as análises dos híbridos na tribo Rhodniini foram restritos aos cruzamentos entre *R. prolixus* x *R. neglectus*, *R. prolixus* x *R. robustus*, *R. prolixus* x *R. pictipes* (GALÍNDEZ et al., 1994), assim como entre *R. pallescens* x *R. colombiensis* (DÍAZ et al., 2014). Os três primeiros cruzamentos avaliaram apenas a viabilidade dos híbridos (GALÍNDEZ et al., 1994). O cruzamento entre *R. pallescens* fêmeas x *R. colombiensis* machos não produziu híbridos e o cruzamento entre *R. pallescens* machos x *R. colombiensis* fêmeas produziu F1 (DÍAZ et al., 2014). O grau de pareamento entre os cromossomos homeólogos foi analisado nos machos em F1 desse cruzamento e ausência de pareamento entre vários cromossomos foi relatada (diversos cromossomos monovalentes nas metáfases), que resultam em gametas inviáveis para os híbridos (esterilidade do híbrido).

Considerando que os estudos dos cruzamentos experimentais e dos híbridos resultantes podem ajudar a compreender a sistemática deste grupo de vetores, podem ser usados para analisar os mecanismos de isolamento que limitam o fluxo gênico entre as diferentes espécies, assim como podem ser empregados para o estabelecimento do papel da hibridação natural na geração de novas variantes, que por sua vez, podem levar à evolução adaptativa e/ou na fundação de novas linhagens evolutivas (PÉREZ, 2005), o presente projeto teve como objetivo realizar uma análise multidisciplinar e integrada de aspectos evolutivos (barreiras reprodutivas pré e pós-zigóticas) e taxonômicos na tribo Rhodniini, por meio de cruzamentos experimentais interespecíficos e análise dos híbridos até, pelo menos, a terceira geração (F3).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar uma análise multidisciplinar e integrada de aspectos evolutivos (barreiras reprodutivas pré e pós-zigóticas) e taxonômicos na tribo Rhodniini, por meio de cruzamentos experimentais interespecíficos e análise dos híbridos até, pelo menos, a terceira geração (F3).

2.2 Objetivos Específicos

a. Avaliar a dinâmica evolutiva de cruzamentos experimentais, (por meio da análise da cópula interespecífica), a taxa de oviposição, a taxa de eclosão dos ovos e a viabilidade dos híbridos de sete espécies da Tribo Rhodniini;

b. Analisar a viabilidade reprodutiva dos híbridos, por meio de análises citogenéticas da espermatogênese, com ênfase no padrão de pareamento entre os cromossomos homeólogos de machos adultos, bem como por meio da análise morfológica das gônadas masculinas e femininas, com ênfase na disgenesia gonadal;

c. Analisar o padrão de segregação das características fenotípicas dos parentais nos híbridos experimentais.

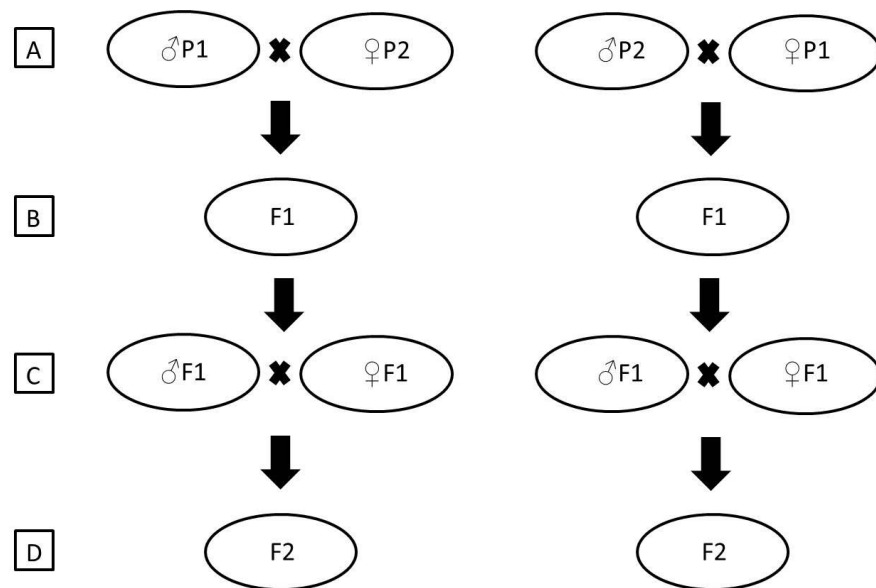
3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Delineamento do estudo

Os cruzamentos experimentais foram realizados no Insetário de Triatominae, instalado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCFAR/UNESP), Câmpus de Araraquara que apresenta toda a infraestrutura e biossegurança necessária para o desenvolvimento da pesquisa. Os cruzamentos experimentais foram realizados em ambas as direções (Figura 1A) [assim como cruzamentos entre os respectivos parentais 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, foram utilizadas ninfas de quinto instar (N5) machos e fêmeas [caracterizadas de acordo com a metodologia de Rosa et al. (1992)] para ambas as espécies parentais (MARTÍNEZ-IBARRA et al., 2011), uma vez que os triatomíneos só atingem a maturidade sexual após a muda imaginal.

Além disso, para garantir a viabilidade dos cruzamentos e a efetividade dos resultados, pelo menos dez casais (sendo cinco réplicas para cada direção) foram formados. Os casais foram mantidos separadamente em recipientes de plástico (5 cm de diâmetro, 10 cm de altura) com uma sanfona vertical de papelão (para maior movimentação e facilidade na alimentação desses insetos) (BELISÁRIO et al., 2007), em temperatura ambiente e foram alimentados semanalmente com sangue de rato e camundongo.

Figura 1. Fluxograma representado os cruzamentos experimentais que foram realizados durante o experimento. A: Cruzamentos experimentais entre os parentais (P), nas duas direções. B: Híbridos que puderam eclodir dos cruzamentos experimental (F1), caso não detectadas barreiras reprodutivas pré-zigóticas. C: Cruzamentos experimentais que puderam ser realizados entre os híbridos (F1) provenientes de cada geração, quando não inviáveis (inviabilidade do híbrido) ou inférteis (esterilidade do híbrido). D: Segunda geração híbrida (F2) que pôde eclodir, quando a barreira intraespecífica pré ou pós-zigótica foi ausente. (Fonte: Elaborada pelo autor).



Os casais foram acompanhados rotineiramente para análise e, quando possível a 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. Após a eclosão das ninfas, o desenvolvimento (N1 até N5) e a taxa de mortalidade também foram acompanhados semanalmente (BELISÁRIO et al., 2007). Quando nenhuma barreira pré-zigótica inviabilizou a formação da F1 (Figura 1B), a medida que os híbridos atingiram a N5, cinco casais de ninfas resultantes de cada direção dos cruzamentos experimentais foram separados em cristalizadores para realização dos novos cruzamentos (Figura 1C) e obtenção de F2 (Figura 1D), sendo os mesmos parâmetros descritos acima utilizados na avaliação.

Assim que foram obtidos híbridos F1 adultos, as análises citogenéticas, morfológicas e morfométricas foram realizadas concomitantemente aos cruzamentos dos híbridos.

3.2 Cruzamentos Experimentais

Para a análise das barreiras pré e pós-zigóticas na tribo Rhodniini, foram realizados os cruzamentos: *R. montenegrensis* x *R. robustus*, *R. nasutus* x *R. prolixus*, *P. tertius* x *R. neglectus*, *P. coreodes* x *R. neglectus* e *P. tertius* x *P. coreodes* (tabela 2). A escolha das espécies foi pautada na literatura: a) analisar a relação entre as espécies agrupadas nos grupos *prolixus* e [que são grupos monofiléticos (ROSA et al., 2012)]; b) avaliar o *status* específico de *R. montenegrensis* [espécie sugerida como apenas uma das linhagens de *R. robustus* por Abad-Franch et al. (2013)], c) bem como analisar a relação entre as espécies do gênero *Psammolestes* [que são espécies irmãs (MONTEIRO et al., 2000)] e a relação intergenérica entre *Rhodnius* e *Psammolestes* [que são filogeneticamente relacionados (MONTEIRO et al., 2000)].

Tabela 2. Cruzamentos experimentais realizados.

Cruzamento 1	
♀ <i>R. montenegrensis</i>	X <i>R. robustus</i> ♂
♀ <i>R. robustus</i>	X <i>R. montenegrensis</i> ♂
Cruzamento 2	
♀ <i>R. prolixus</i>	X <i>R. nasutus</i> ♂
♀ <i>R. nasutus</i>	X <i>R. prolixus</i> ♂
Cruzamento 3	
♀ <i>R. neglectus</i>	X <i>R. coreodes</i> ♂
♀ <i>R. coreodes</i>	X <i>R. neglectus</i> ♂
Cruzamento 4	
♀ <i>R. neglectus</i>	X <i>P. tertius</i> ♂
♀ <i>P. tertius</i>	X <i>R. neglectus</i> ♂
Cruzamento 5	
♀ <i>P. tertius</i>	X <i>P. coreodes</i> ♂
♀ <i>P. coreodes</i>	X <i>P. tertius</i> ♂

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3 Análises Citogenéticas

Pelo menos dez machos adultos de cada geração (F1 e F2) 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 e as análises citogenéticas foram aplicadas com o objetivo de caracterizar a espermatogênese, por meio da técnica de coloração com 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.

3.4 Análises Morfológicas

3.4.1 Caracterização Fenotípica

Para este estudo foram utilizados 10 exemplares adultos (machos) de cada espécie parental e dos híbridos experimentais (F1) de *R. prolixus* x *R. nasutus* (ambas as direções) que tiveram o pronoto analisado de acordo com as características estabelecidas na chave taxonômica descrita por Lent e Wigodzensky (1979) para diferenciar *R. prolixus* e *R. nasutus*. Além disso, foram utilizados híbridos F1 machos provenientes de cada direção do cruzamento entre *P. tertius* x *P. coreodes* (um indivíduo para cada direção, devido ao baixo número de híbridos adultos) que tiveram a cabeça mensurada de acordo com as características estabelecidas na chave taxonômica descrita por Lent e Wigodzensky (1979) para diferenciar *P. tertius* e *P. coreodes*. As análises fenotípicas foram realizadas em microscópio estereoscópio Leica MZ APO com sistema de análise de imagem *Motic Advanced 3.2 plus*.

3.4.2 Morfometria Geométrica

Foram utilizados exemplares machos adultos (parentais e híbridos) para a análise da morfometria geométrica da asa de *R. prolixus* (10 exemplares), *R. nasutus* (10 exemplares), híbrido resultante do cruzamento entre *R. prolixus* fêmea e *R. nasutus* macho (10 exemplares) e híbrido resultante do cruzamento entre *R. nasutus* fêmea e *R. prolixus* macho (2 exemplares, em decorrência do baixo número de adultos nesta direção), bem como de *R. montenegrensis* (10 exemplares), *R. robustus* (10 exemplares), híbrido resultante do cruzamento entre *R. montenegrensis* fêmea (10 exemplares) e *R. robustus* macho e híbrido resultante do

cruzamento entre *R. montenegrensis* macho e *R. robustus* fêmea (10 exemplares). As análises morfométricas foram realizadas de acordo com Oliveira (2015) e Souza et al. (2016b): as asas foram fixadas em uma lâmina de vidro com lamínula para realizar as fotografias em microscópio estereoscópio Leica MZ APO e sistema de análise de imagem *Motic Advanced 3.2 plus*. Posteriormente, por meio do *software tpsDig* [versão 1.27, Rohlf (2001)] foram estabelecidos os pontos 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 mostra 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) e, observou-se que o número de variáveis foi ao menos a metade do valor do número de indivíduos. A partir dos componentes principais obtidos nas análises foi construído um mapa fatorial com os dois primeiros componentes principais (“eigenvalues”, CP1 e CP2) para observar a relação entre as espécies parentais e os híbridos experimentais. Todas as análises foram realizadas no *software MorphoJ* (KLINGENBERG, 2011).

Figura 2. Pontos de referências (*landmarks*) utilizados como coordenada para as análises morfométricas da asa dos híbridos. (Fonte: Elaborado pelo autor).



3.4.3 Morfologia Interna

Assim como realizado por Almeida e Carareto (2002) para híbridos de *Drosophila*, a morfologia das gônadas foi analisada e fotodocumentada em microscópio estereoscópio *Leica MZ APO* com sistema de análise de imagem *Motic Advanced 3.2 plus*, para avaliar a presença do fenômeno de disgenesia gonadal (que pode ser uni ou bilateral). Para isso, foram utilizados, pelo menos, cinco exemplares machos e cinco fêmeas híbridas adultas de cada geração, que foram dissecadas e tiveram suas gônadas analisadas. Como grupo controle, as gônadas de, pelo menos, cinco parentais machos e fêmeas foram dissecadas e caracterizadas.

4 RESULTADOS

4.1 Artigo a ser submetido para a revista *Infection, Genetics and Evolution*

Trends in Evolution of the Rhodniini tribe (Hemiptera, Triatominae): intergeneric genomic incompatibility between *Psammolestes* Bergroth, 1911 and *Rhodnius* Stål, 1859

Short Communication

Chagas disease is a neglected disease caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) which affects about 8 million people worldwide (CDC, 2017; WHO, 2018). The main form of transmission of the protozoan is through hematophagous insects known as triatomines (CDC, 2017; WHO, 2018). Currently 154 species of triatomines are known, divided in 19 genera and five tribes (Galvão, 2014; Oliveira and Alevi, 2017; Oliveira et al., 2018; Dorn et al., 2018; Poinar, 2019) and all are considered as potential Chagas disease vectors.

The tribe Rhodniini Pinto, 1926 is a monophyletic group composed of 23 species grouped in two genera: one with long thin legs and a long head, living mainly in palm trees (genus *Rhodnius* Stål, 1859), and the other having a short head, strong legs, wide femora, a very wide rostrum (the widest in all the subfamily) and living in nests of birds of the family Furnariidae (genus *Psammolestes* Bergroth, 1911) (Lent and Wygodzinsk, 1979), although there are reports of *P. tertius* Lent & Jurberg, 1965 living in sympathy with *R. neglectus* Lent, 1954 in nests of *Phacellodomus ruber* (Vieillot, 1817) (Passeriformes, Furnariidae) present in the crown of *Mauritia flexuosa* Linnaeus 1782 (Arecaceae) (Gurgel-Gonçalves et al., 2004). Based on mitochondrial DNA data, Soares et al., 2001 suggest that *Psammolestes* has derived from an ancestral form similar to *R. robustus* Larrousse, 1927.

Rhodnius is a paraphyletic genus formed by 20 species divided into three groups: trans-Andean *Rhodnius* clade (*pallescens* group) and cis-Andean *Rhodnius* clade (*pictipes* + *prolixus* groups) (Justi and Galvão, 2017). The event of paraphilia is supported by the greater evolutionary proximity of the species of the *prolixus* groups with the genus *Psammolestes* than with the other groups of *Rhodnius* (Justi et al., 2016). Based on this phenomenon, Hypsa et al., 2012 proposed the alteration of the genus of the species of *Psammolestes* to *Rhodnius*: *P. arthuri* (Pinto, 1926) for *R. arthuri* (Pinto, 1926), *P. coreodes* Bergroth, 1911 for *R.*

coreodes (Bergroth, 1911) and *P. tertius* Lent & Jurberg, 1965 for *R. tertius* (Lent & Jurberg, 1965).

Thus, considering that studies of hybridization can help to understand the taxonomy and systematics of species, can be used to analyze the isolating mechanisms that limit gene flow between species, as well as experimental hybridization can be employed to establish the role of natural hybridization in generating new genetic variants (that may lead to adaptive evolution and/or in founding new evolutionary lineages) (Arnold, 1997; Monteiro et al., 2018), we performed experimental crosses between *Psammolestes* and *Rhodnius* to assess the degree of intergeneric genomic compatibility between the species of the Rhodniini tribe.

In order to evaluate the genetic and reproductive compatibility (Mayr, 1963) between the genus of the Rhodniini tribe, reciprocal crossing experiments were conducted between *Rhodnius* and *Psammolestes* (Table 1). The crossing experiments were conducted in the Triatominae insectary of the School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University (UNESP), Araraquara, São Paulo, Brazil, in according to the experiments of Costa et al., 2003 and Mendonça et al., 2014: the insects were sexed as 5th instar nymphs (Rosa et al., 1992), and males and females were kept separately until they reached the adult stage in order to cross adult virgins (Martinez-Ibarra et al., 2011). For the crosses, 3 couples from each set were placed in plastic jars (5 cm in diameter ×10 cm in height) and kept at room temperature. Furthermore, intragenetics crosses were also performed for control (Table 1). The eggs were collected weekly throughout the female's oviposition periods and the egg fertility rate was calculated.

The chromosome evolution of the Rhodniini tribe was quite homogenous and resulted in several identical characteristics for most taxa (karyotype, sex determination system, heterochromatin pattern, AT and CG base pair composition and arrangement of the 45S rDNA probes (Pita et al., 2013; Oliveira et al., 2018), which, at first, could allow the formation of hybrids. However, our results demonstrate that there is a reproductive barrier in the intergeneric hybridization between *Rhodnius* and *Psammolestes* (Table 1).

We suggest that after the divergence of the genera from the common ancestor, genotypic modifications (at the genomic level, which did not lead to changes in the numerical and structural composition of the chromosomes) and phenotypic [excluding mechanical isolation, since intergeneric couplings were observed during the experiment] resulted in reproductive isolation (even if the genres lived in sympathy, as already reported [Cruz-

Gusman et al., 2014]). These observations are of great taxonomic and evolutionary importance, since it supports the particularities observed between the genera and, above all, it corroborates the generic status of *Psammolestes* questioned by Hypsa et al., 2012.

Table 1. Experimental crosses performed between the genus *Rhodnius* and *Psammolestes*

	Number of eggs				Egg Fertility
Intergeneric	C1	C2	C3	Total	
<i>P. coreodes</i> ♀ x <i>R. neglectus</i> ♂	55	74	52	181	0%
<i>R. neglectus</i> ♀ x <i>P. coreodes</i> ♂	60	121	156	337	0%
<i>P. tertius</i> ♀ x <i>R. neglectus</i> ♂	1	26	18	45	0%
<i>R. neglectus</i> ♀ x <i>P. tertius</i> ♂	114	130	97	341	0%
Control experiments	C1	C2	C3	Total	
<i>R. neglectus</i> ♀ x <i>R. neglectus</i> ♂	337	409	174	900	88%
<i>P. coreodes</i> ♀ x <i>P. coreodes</i> ♂	61	10	90	161	68%
<i>P. tertius</i> ♀ x <i>P. tertius</i> ♂	52	48	54	154	77%

C1, C2 and C3 = replicates of experimental crosses.

Based on this, we have demonstrated that *Rhodnius* and *Psammolestes* have intergeneric genomic incompatibility, contributing to the evolutionary and taxonomic knowledge of the Rhodniini tribe, an important group of vectors of Chagas' disease.

References

- Arnold, M.L. 1997. Natural Hybridization and Evolution. Oxford: University Press.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2017. Parasites – American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease). https://www.cdc.gov/parasites/chagas/gen_info/detailed.html (accessed 31 October 2018).
- Costa, J., Almeida, C.E., Dujardin, J.P., Beard, C.B. 2003. Crossing experiments detect genetic incompatibility among populations of *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Heteroptera, Reduviidae, Triatominae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 98, 637–639.
- Cruz-Guzman, P.J., Morocoima, A., Chique, J.D., Ramonis-Quintero, J., Toquero-Uzcátegui, M., Carrasco, H.J. 2014. *Psammolestes arthuri* naturally infected with *Trypanosoma cruzi* found in sympatry with *Rhodnius prolixus* and *Triatoma maculata* on Bird nests in Anzoátegui state, Venezuela. Saber. Univ. Oriente Venezuela. 26, 428–440.
- Dorn, P.L., Just, S.A., Dale, C., Stevens, L., Galvão, C., Cordon, R.L., Monroy, C. 2018. Description of *Triatoma mopan* sp. n. (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) from a cave in Belize. Zookeys. In press.
- Galvão, C. 2014. Vetores da doença de Chagas no Brasil. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, Brasil.
- Gurgel-Gonçalves, R., Duarte, M.A., Ramalho, E.D., Palma, A.R.T., Romaña, C.A., Cuba-Cuba, C.A. 2004. Spatial distribution of Triatominae populations (Hemiptera: Reduviidae) in *Mauritia flexuosa* palm trees in Federal District of Brazil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 37.
- Hypsa, V., Tietz, D., Zrzavy, J., Rego, R.O., Galvão, C., Jurberg, J. 2012. Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the asiatic clade. Mol. Phylog. Evol. 23, 447–457.

- Justi, S.A., Galvão, C. 2017. The evolutionary origin of diversity in Chagas disease vectors. *Trends. Parasitol.* 33, 42–52.
- Justi, S.A., Galvão, C., Schrago, C.G. 2016. Geological changes of the Americas and their influence on the diversification of the Neotropical kissing bugs (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 10(4), e0004527.
- Lent, H., Wygodzinsky, P. 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) and their significance as vector of Chagas's disease. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 163, 123–520.
- Martínez-Ibarra, J.A., Grant-Guillén, Y., Delgadillo-Aceves, I.N., Zumaya-Estrada, F.A., Rocha-Chávez, G., Salazar-Schettino, P.M., et al. 2011. Biological and genetic aspects of crosses between phylogenetically close species of Mexican Triatomines (Hemiptera: Reduviidae). *J. Med. Entomol.* 48, 705–707.
- Mayr, E. 1963. *Populações, Espécies e Evolução*, São Paulo: Editora Nacional.
- Mendonça, V.J., Alevi, K.C.C., Medeiros, L.M., Nascimento, J.D., Azeredo-Oliveira, M.T.V., Rosa, J.A. 2014. Cytogenetic and morphologic approaches of hybrids from experimental crosses between *Triatoma lenti* Sherlock & Serafim, 1967 and *T. sherlocki* Papa et al., 2002 (Hemiptera: Reduviidae). *Infect. Genet. Evol.* 26, 123–131.
- Monteiro, F.A., Weirauch, C., Felix, M., Lazoski, C., Abad-Franch, F. 2018. Evolution, Systematics, and Biogeography of the Triatominae, Vectors of Chagas Disease. *Adv. Parasitol.* 99, 265–344.
- Oliveira, J., Alevi, K.C.C. 2017. Taxonomic status of *Panstrongylus herreri* Wygodzinsky, 1948 and the number of Chagas disease vectors. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 50, 434–435.
- Oliveira, J., Alevi, K.C.C., Ravazi, A., Herrera, H.M., Santos, F.M., Azeredo-Oliveira, M.T.V., Rosa, J.A. 2018. New evidence of the monophyletic relationship of the genus

Psammolestes Bergroth, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Am. J. Trop. Med. Hyg. In press.

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

Pita, S., Panzera, F., Ferrandis, I., Glvão, C., Gómez-Palacio, A., Panzera, Y. 2013. Chromosomal divergence and evolutionary inferences in Rhodniini based on the chromosomal location of ribosomal genes. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 108, 376–382.

Poinar G. A primitive triatomine bug, *Paleotriatoma metaxytaxa* gen. et sp. nov. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), in mid-Cretaceous amber from northern Myanmar. Cret. Res. 2019; 93: 90-97.

Rosa, J.A., Barata, J.M.S., Barelli, N., Santos, J.L.F., Belda-Neto, F.M. 1992. Sexual distinction between 5th instar nymphs of six species (Hemiptera: Reduviidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 87, 257–264.

Soares, R.P.P., Barbosa, S.E., Borges, E.C., Melo-Júnior, T.A., Romanha, A.J., Dujardin, J.P., Schofield, C.J., Diotaiuti, L. 2001. Genetic studies of *Psammolestes tertius* (Hemíptera: Reduviidae: Triatominae) using male genital morphology, morphometry, isoenzymes, and random amplified polymorphic DNA. Biochem. Genet. 39, 1–13.

World Health Organization (WHO), 2018. Chagas disease (American trypanosomiasis). [http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)) (accessed 31 October 2018).

4.2 Artigo a ser submetido para a revista Plos One

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

Introduction

Chagas disease is a neglected disease which affects about 8 million people and puts at risk of infection approximately 25 million people in the world, being the treatment with the anti-trypanosomatids (Benznidazole and Nifurtimox) effective only in the acute phase of the disease [1, 2]. This disease is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) and the main form of transmission is through hematophagous insects known as triatomines [2]. Currently are known 154 species of triatomines, divided in 19 genera and five tribes [3-7] and all are considered as potential Chagas disease vectors.

The tribe Rhodniini Pinto, 1926 is a monophyletic group composed of 23 species grouped in two genera morphologically and ecologically distinct: one with long thin legs and a long head, living mainly in palm trees (genus *Rhodnius* Stål, 1859), and the other having a short head, strong legs, wide femora, a very wide rostrum (the widest in all the subfamily) and living in nests of birds of the family Furnariidae (genus *Psammolestes* Bergroth, 1911) [8]. Soares et al. [9] suggest that *Psammolestes* has derived from an ancestral form similar to *R. robustus* Larrousse, 1927.

Rhodnius is a paraphyletic genus formed by 20 species divided into trans-Andean *Rhodnius* clade (*pallenscens* group) and cis-Andean *Rhodnius* clade (*pictipes* + *prolixus* groups) [10]. The event of paraphilia is supported by the greater evolutionary proximity of the species of the *prolixus* groups with the genus *Psammolestes* which groups these species into a single clade [11]. Based on this phenomenon, Hypsa et al. [12] proposed the alteration of the genus of the species of *Psammolestes* to *Rhodnius*: *P. arthuri* (Pinto, 1926) for *R. arthuri*

(Pinto, 1926), *P. coreodes* Bergroth, 1911 for *R. coreodes* (Bergroth, 1911) and *P. tertius* Lent & Jurberg, 1965 for *R. tertius* (Lent & Jurberg, 1965).

The species of the genus *Psammolestes* present a distribution restricted to Latin America, namely, *P. coreodes* was notified in Argentina, Bolivia, Brazil and Paraguay, *P. tertius* in Brazil and Peru and *P. arthuri* in Colombia and Venezuela [13, 14]. Phylogenetic and cytogenetics analyses suggest that this genus is monophyletic [15, 16]. Monteiro et al. [15] suggest that perhaps *Psammolestes* should be regarded as a specialized lineage from the *prolixus* group of *Rhodnius*, because the genus *Psammolestes* and species of the *prolixus* group share a common ancestral, which highlights the paraphyly of the genus *Rhodnius*.

Soares et al. [9] suggest that *Psammolestes* spp. spread from the Amazon region northward into the llanos of Venezuela (where *P. arthuri* is abundant in furnariidae nests) and southeastward into the caatinga-cerrado path of Central Brazil (with subsequent differentiation of *P. tertius* along a north-south cline and *P. coreodes* in the Chaco region of Argentina and Paraguay) [15, 17].

Events of natural hybridization were reported for the Rhodniini tribe, more specifically for the genus *Rhodnius* [18]. Considering that studies of hybridization can help to understand the taxonomy and systematics of species, can be used to analyze the isolating mechanisms that limit gene flow between species, as well as experimental crosses can be employed to establish the role of natural hybridization in generating new genetic variants (that may lead to adaptive evolution and/or in founding new evolutionary lineages) [19, 20], we performed experimental crosses between *P. tertius* and *P. coreodes* and we analyzed the reproductive and morphological aspects of the hybrids in order to characterize the possible barriers reproductive and the segregation of the phenotypic characters, respectively.

Materials and Methods

Experimental crosses

In order to evaluate the pre and post-zygotic barriers between the species of the Rhodniini tribe, crossing experiments were conducted among between *P. tertius* and *P. coreodes* (Table 1).

The crossing experiments were conducted in the Triatominae insectary of the School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University (UNESP), Araraquara, São Paulo,

Brazil, in according to the experiments of Costa et al. [21] and Mendonça et al. [22]: the insects were sexed as 5th instar nymphs [23], and males and females were kept separately until they reached the adult stage in order to cross adult virgins [24].

For the crosses, three couples from each set were placed in plastic jars (5 cm in diameter × 10 cm in height) and kept at room temperature. Furthermore, intraspecific crosses were also performed for control (Table 1). The eggs were collected weekly throughout the females' oviposition periods and the egg fertility rate and mortality rate of the hybrids was calculated (Table 1). After the hybrids from the first generation (F1) reached the fifth instar (N5), a hybrid pair F1 was formed for each direction (Table 1) and the same parameters described above being used in the evaluation of these crosses.

Cytogenetics analysis

After the experimental crosses, the F1 males were dissected, the testes were removed and stored in methanol: acetic acid solution (3: 1). Slices were prepared by the cell-crushing technique (as described by Alevi et al. [25]) and the cytogenetic analyzes were applied with the aim of characterizing spermatogenesis, with emphasis on the degree of pairing between the homeopathic chromosomes (Pérez et al. 20] and Mendonça et al. [22]), using the Lacto-Acética Orceína technique (De Vaio et al. [26], with modifications according to Alevi et al. [25].) The slides will be examined in light microscopy Jenaval (Zeiss), coupled to the digital camera and the Axio Vision LE 4.8 image analyzer system, with a 1000-fold increase.

Morphology of the gonads

The morphology of the male gonads was analyzed and photodocumented under a Leica MZ APO stereomicroscope microscope with Motic Advanced 3.2 plus image analysis system to evaluate the presence of gonadal dysgenesis (which may be uni or bilateral) [27]. For this, the F1 hybrids of the experimental crosses were used, which were dissected and had their gonads analyzed.

Segregation of phenotypic characteristics

The F1 male hybrids used in the experimental crosses had the head measured in a Leica MZ APO stereomicroscope and Motic Advanced 3.2 plus image analysis system to analyze the segregation of phenotypic characteristics, based on the main parameter used in the taxonomic key of Lent and Wygodzinsky [8] to characterize *P. tertius* (anteocular region

with two to two and a half times the length of the ocular post) and *P. coreodes* (anteocular region no more than twice the length of the post-ocular).

Results and Discussion

It is estimated that the ancestors of the Rhodniini and Triatomini tribes diverged at 48.9-64.4 million of years ago, at about the time when South America was beginning to separate from Antarctica and Australia during the lower tertiary period [28]. It is believed that the radiation of the genus *Rhodnius* occurred from the Amazon region and resulted in three main evolutionary lineages present in the south (Brazilian Cerrado), in the north (Venezuela) and in the northwest (passing through the Andean Cordillera into the Magdalena valley in Colombia) [29]. In addition, the *Psammolestes* adapted to exploit bird nest microhabitats and currently occur over the open ecoregions north and south of the moist Amazon forests – *P. arthuri* in the Orinoco and Venezuelan coastal basins, *P. tertius* primarily in the Cerrado-Caatinga, and *P. coreodes* primarily in the Chaco [15, 30].

Interspecific experimental crosses between *P. tertius* and *P. coreodes* (Figure 1), demonstrated genomic compatibility intrageneric, since hybrids were produced in both directions for all crosses (Table 1) (Figure 2). Likewise, interspecific crosses between *Rhodnius* (*R. prolixus* x *R. neglectus*, *R. prolixus* x *R. robustus*, *R. prolixus* x *R. pictipes* and *R. pallescens* x *R. colombiensis*) also resulted in the production of hair hybrids at least one of the directions [31, 32]. Considering the biological concept of species proposed by Mayr [33], that is, "groups of natural populations that actually or potentially intersect and are reproductively isolated from other groups," this feature is extremely important from an evolutionary point of view because it demonstrates that evolutionary events that result in pre-total zygotic isolation between species have not yet been installed in the Rhodniini tribe.

Table 1. Experimental crosses performed between *P. coreodes* and *P. tertius*.

Crossing experiments	Number of eggs				Egg Fertility	Mortality F1	Mortality F2
	C1	C2	C3	Total			
<i>P. coreodes</i> ♀ x <i>P. tertius</i> ♂	3	24	27	54	43%	91,3%	-
<i>P. tertius</i> ♀ x <i>P. coreodes</i> ♂	40	23	54	117	26%	93,3%	-
Hybrid ♀ x Hybrid ♂ ¹	0	-	-	-	-	-	-
Hybrid ♀ x Hybrid ♂ ²	14	-	-	-	57%	-	100%
Control experiments	C1	C2	C3	Total			
<i>P. coreodes</i> ♀ x <i>P. coreodes</i> ♂	61	10	90	161	68%	-	-
<i>P. tertius</i> ♀ x <i>P. tertius</i> ♂	52	48	54	154	77%	-	-

¹ Hybrids of the cross between *P. tertius* ♀ x *P. coreodes* ♂; ² Hybrids of the cross between *P. coreodes* ♀ x *P. tertius* ♂. C1, C2 and C3 = replicates of experimental crosses.



Figure 1. Interspecific experimental crosses between *P. coreodes* ♀ and *P. tertius* ♂ (A) *P. tertius* ♀ and *P. coreodes* ♂ (B), demonstrating the occurrence of copula between species.



Figure 2. Adult hybrids from the experimental crossing between *P. coreodes* ♀ and *P. tertius* ♂ (A) and *P. tertius* ♀ and *P. coreodes* ♂.

The main mechanisms of pre-zygotic reproductive isolation observed in the subfamily Triatominae are: ecological isolation between *T. infestans* and *T. platensis* Neiva, 1913 which are phylogenetically related [10], but present different habits (*T. infestans* is associated with domiciliary and is fed on mammalian blood [3] and *T. platensis* is associated with bird nests and feeds preferentially from the blood of these vertebrates [34]) and mechanical isolation

that is associated with genitalia incompatibility and happens with a certain frequency in only one direction of the crosses, as occurs, for example, at the crossing of *T. platensis* female with males of *T. delpontei* Romána & Abalos, 1947 [35].

Although intrageneric genomic homology to *P. tertius* and *P. coreodes* was confirmed by the hatching of first-generation hybrids (Table 1), different fertility rates were observed for each specific crossover (Table 1). For crosses that have a very low fertility rate, it is possible to use this tool to corroborate the specific status of the parents (as used by Mendonça et al. [36] to revalidate *Triatoma bahiensis*). In addition, the high mortality rate of F1 hybrids (Table 1) makes it possible to characterize the evolutionary phenomena of the non-viability of hybrids, which consists of extremely low (low adaptive value) viability of F1 hybrids, not reaching the adult stage for the hybrids resulting from the crossing between *T. mexicana* (Herrich-Schaeffer, 1848) and the six species of *Meccus* spp. [37])

The first specimens of F1 that reached adulthood had a dominant phenotypic segregation pattern for *P. tertius* in both directions (anterior region measured at least twice the size of the post-ocular region) (Figure 3). These triatomines were crossed again, with 100% of the F2 offspring infeasible (Table 1), characterizing the hybrid breakage. Although these insects did not present gonadal dysgenesis (Figure 4), cytogenetic analyzes of male gonads demonstrated both metaphases with 100% matching of homeopathic chromosomes (Figure 5A) (which resulted in viable gametes) and metaphases with pairing errors in one (Figure 5B, arrows) (which resulted in non-viable gametes), which justifies the hatching of hybrids in F2 (Table 1).

These results are important from a systematic and taxonomic point of view, since according to Dewey [38], the evaluation of the behavior of the chromosomes in metaphase I in interspecific hybrids, allows the establishment of phylogenetic structures, as well as can be used in the definition of placements taxonomic and evolutionary. In addition, according to Riley [39], two species possess distinct genomes when their chromosomes are different in structure and genetic content, so that there is no pairing between one or more pairs of homeopaths during hybrid meiosis. This behavior leads to sterility and, consequently, to genetic isolation between species.

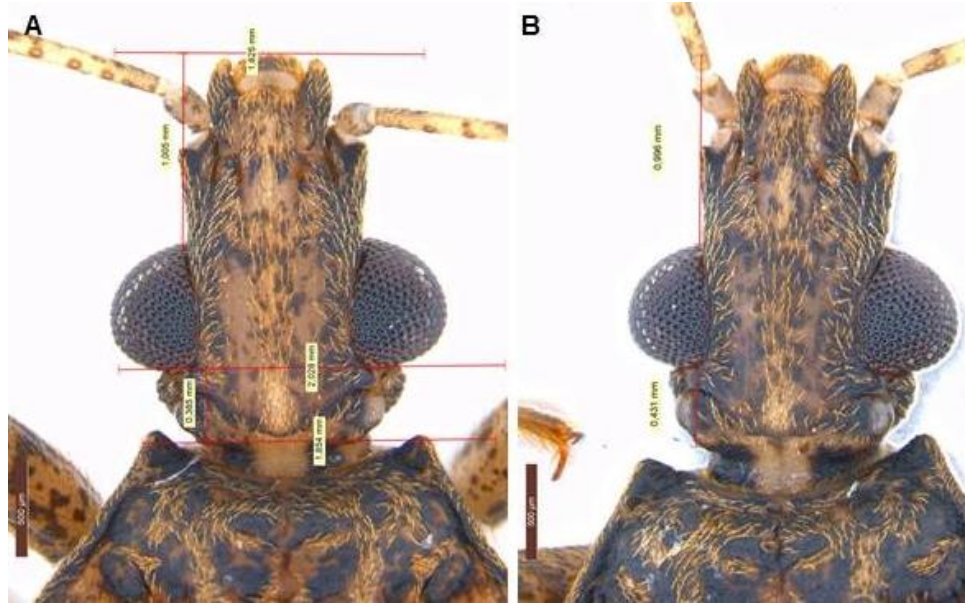


Figure 3. Adult male hybrids of the experimental cross between *P. coreodes* and *P. tertius* submitted to morphometric analysis of the head. A = *P. coreodes* ♀ x *P. tertius* ♂ (anteocular region = 1.005mm; post-ocular region = 0.385 mm. Anteocular region 2.6 times greater than the post-ocular region). B = *P. tertius* ♀ x *P. coreodes* ♂ (anteocular region = 0.996 mm; post-ocular region = 0.431. Anteocular region 2.3 times greater than the post-ocular region).

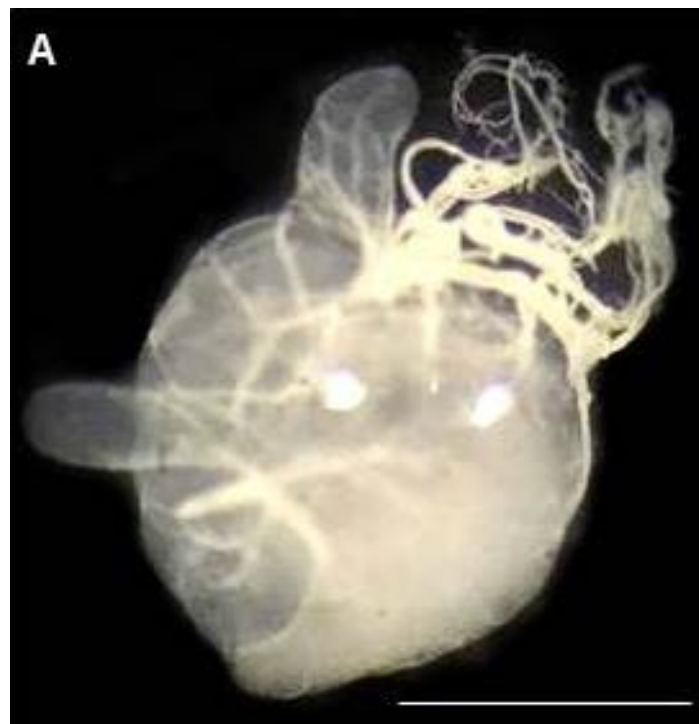


Figure 4. Not atrophied testicle of adult crossbreeding between *P. coreodes* ♀ x *P. tertius* ♂, demonstrating the absence of gonadal dysgenesis at this junction, in both directions.

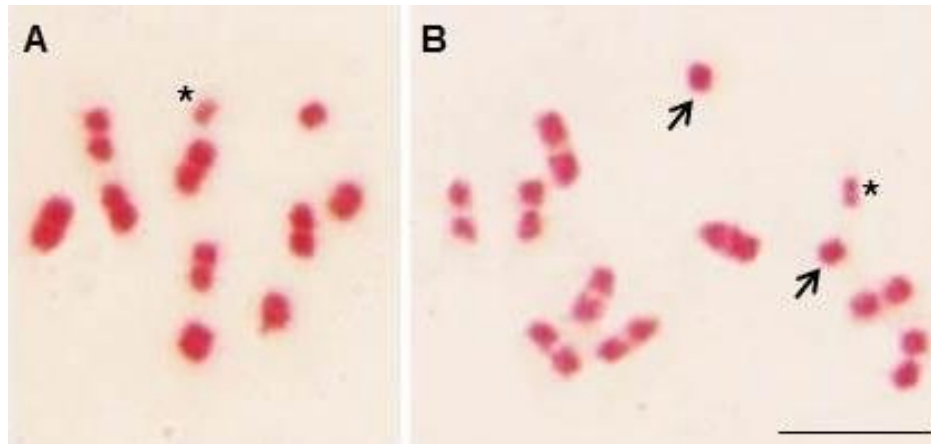


Figure 5. Metaphases meiotics from the experimental crossing between *P. coreodes* and *P. tertius*. A = Metaphases with correct pairing of the homeologous chromosomes of *P. coreodes* ♀ x *P. tertius* ♂. B = Metaphases with chromosome pairing error of *P. tertius* ♀ x *P. coreodes* ♂ as indicated by the arrow. (* = sex chromosomes X and Y).

Based on this, we have demonstrated that *Psammolestes* spp. have compatibility genomic intrageneric, contributing to the evolutionary and taxonomic knowledge of the Rhodniini tribe, an important group of vectors of Chagas' disease.

References

1. Centers for Disease Control and Prevention. Parasites – American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease); 2017 [cited 2018 Mai 23]. Database: Internet. Available from: https://www.cdc.gov/parasites/chagas/gen_info/detailed.html.
2. World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis); 2018 [cited 2018 Mai 23]. Database: Internet. Available from: [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)).
3. Galvão C. Vetores da doença de Chagas no Brasil. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, Brasil; 2014.
4. Oliveira J, Alevi KCC. Taxonomic status of *Panstrongylus herreri* Wygodzinsky, 1948 and the number of Chagas disease vectors. Rev Soc Bras Med Trop. 2017; 50: 434-435.
5. 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). J Vector Ecol. 2018; 43: 148-157.
6. Dorn PL, Just 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. 2018; 775: 69-95.
7. Poinar G. A primitive triatomine bug, *Paleotriatoma metaxytaxa* gen. et sp. nov. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), in mid-Cretaceous amber from northern Myanmar. Cret. Res. 2019; 93: 90-97.
8. Lent H, Wygodzinsky P. Revision of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) and their significance as vector of Chagas's disease. Bull Am Mus Nat Hist. 1979; 163: 123-520.

9. Soares RPP, Barbosa SE, Borges EC, Melo Júnior TA, Romanha AJ, Dujardin JP, Schofield CJ, Diotaiuti L. Genetic studies of *Psammolestes tertius* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) using male genital morphology, morphometry, isoenzymes, and random amplified polymorphic DNA. *Biochem Genet.* 2001; 39: 1-13.
10. Justi SA, Galvão C. The evolutionary origin of diversity in Chagas disease vectors. *Trends Parasitol.* 2017; 33: 42-52.
11. Justi SA, Galvão C, Schrago CG. Geological changes of the Americas and their influence on the diversification of the Neotropical kissing bugs (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 10(4): e0004527.
12. 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. *Mol Phylog Evol.* 2012; 23: 447-457.
- 13 - Galvão C, Carcavallo R, Rocha DS, Jurberg J, 2003. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa*; 202: 1-36.
14. Cabrera R, 2006. Notas breves sobre *Psammolestes tertius* Bergroth, 1911 (Reduviidae: Hemiptera): un triatomino silvestre. *An. Fac. Med. Lima*; 67: 345-365.
15. Monteiro FA, Wesson DM, Dotson EM, Schofield CJ, Beard CB, 2000. Phylogeny and molecular taxonomy of the Rhodniini derived from mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; 62: 460-465.
16. Oliveira J, Alevi KCC, Ravazi A, Miraglia Herrera H, Martins Santos F, Azeredo-Oliveira MTV, Rosa JA, 2018. New Evidence of the Monophyletic Relationship of the

Genus *Psammolestes* Bergroth, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, and Triatominae). Am. J. Trop. Med. Hyg., in press.

17. Schofield CJ, Dujardin JP, 1999. Theories on the evolution of *Rhodnius*. Actual Biol.; 21: 183-197.

18. Dias FBS, Jaramillo N, Diotaiuti L, 2014. Description and characterization of the melanic morphotype of *Rhodnius nasutus* Stål, 1859 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Rev. Soc. Bras. Med. Trop.; 47: 637-641.

19. Arnold ML. Natural Hybridization and Evolution. Oxford: University Press; 1997.

20. Pérez R, Hernández M, Quintero O, Scovortzoff E, Canale D, Méndez L, et al. Cytogenetic analysis of experimental hybrids in species of Triatominae (Hemiptera-Reduviidae). Genetica. 2005; 125: 261-270.

21. Costa J, Almeida CE, Dujardin JP, Beard CB. Crossing experiments detect genetic incompatibility among populations of *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003; 98: 637-639.

22. Mendonça VJ, Alevi KCC, Medeiros LM, Nascimento JD, Azeredo-Oliveira MTV, Rosa JA. Cytogenetic and morphologic approaches of hybrids from experimental crosses between *Triatoma lenti* Sherlock & Serafim, 1967 and *T. sherlocki* Papa et al., 2002 (Hemiptera: Reduviidae). Infect Genet Evol. 2014; 26: 123-131.

23. Rosa JA, Barata JMS, Barelli N, Santos JLF, Belda Neto FM. Sexual distinction between 5th instar nymphs of six species (Hemiptera: Reduviidae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1992; 87: 257-264.

24. Martínez-Ibarra JA, Grant-Guillén Y, Delgadillo-Aceves IN, Zumaya-Estrada FA, Rocha-Chávez G, Salazar-Schettino PM, et al. Biological and genetic aspects of crosses between

phylogenetically close species of Mexican Triatomines (Hemiptera: Reduviidae). J Med Entomol. 2011; 48: 705-707.

25. Alevi KCC, Mendonça PP, Pereira NP, Rosa JA, Azeredo-Oliveira MTV, 2012. Karyotype of *Triatoma melanocephala* Neiva & Pinto (1923). Does this species fit in the Brasiliensis subcomplex? Infect. Genet. Evol.; 12: 1652-1653.

26. De Vaio ES, Grucci B, Castagnino AM, Franca ME, Martinez ME, 1985. Meiotic differences between three triatomine species (Hemiptera:Reduviidae). Genetica; 67: 185-191.

27. Almeida LM, Carareto CMA, 2002. Gonadal hybrid dysgenesis in *Drosophila sturtevantii* (Diptera, Drosophilidae). Ilheringia; 92: 71-79.

28. Bargues MD, Marcilla A, Ramsey J, Dujardin JP, Schofield CJ, Mas-Coma S. Nuclear rDNA-based molecular clock of the evolution of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vectors of Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000; 95: 567-573.

29. Schofield CJ, Dujardin JP. Theories on the evolution of *Rhodnius*. Actual Biol. 1999; 21: 183-197.

30. Abad-Franch F, Monteiro FA, Jaramillo NO, Gurgel-Gonçalves R, Dias FBS, Diotaiuti L. Ecology, evolution, and the long-term surveillance of vector-borne Chagas disease: A multi-scale appraisal of the tribe Rhodniini (Triatominae). Acta Trop 2009; 112: 159-177.

31. Galíndez GI, Barazarte R, Márquez J, Oviedo M, Márquez Y, Morón L, Carcavallo RU, 1994. Relaciones reproductivas entre *Rhodnius prolixus* Stal y *Rhodnius robustus* Larrousse (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) bajo condiciones de laboratorio. Entom. Vect.; 1: 3-13.

32. Díaz S, Panzera F, Jaramillo-O N, Pérez R, Fernández R, Vallejo G, Saldaña A, Calzada JE, Triana O, Gómez-Palácio A, 2014. Genetic, Cytogenetic and Morphological Trends in the

Evolution of the *Rhodnius* (Triatominae: Rhodniini) Trans-Andean Group. PLoS ONE; 9: e87493.

33. Mayr E. Populações, Espécies e Evolução, São Paulo: Editora Nacional, 1963.

34. Abalos JW, Wygodzinsky P 1951. Las Triatominae argentinas. Monographia Inst. Med. Reg. Tucuman; 1: 1-178.

35. Usinger RL, Wygodzinsky Ryckman ER, 1966. The Biosystematics of Triatominae. Ann. Rev. Entomol. 11: 309-329.

36. Mendonça VJ, Alevi KCC, Pinotti H, Gurgel-Gonçalves R, Pita S, Guerra AL, Panzera F, Araújo RF, Azeredo-Oliveira MTC, Rosa JA, 2016. Revalidation of *Triatoma bahiensis* Sherlock & Serafim, 1967 (Hemiptera: Reduviidae) and phylogeny of the *T. brasiliensis* species complex. Zootaxa;4107: 239-254.

37. Martínez-Ibarra JA, Y Grant-Guillén, IN Delgadillo-Aceves, FA Zumaya-Estrada, G Rocha-Chávez, PM Salazar-Schettino, R Alexandre-Aguilar, G Villalobos, B Noguera-Torres, 2011. Biological and genetic aspects of crosses between phylogenetically close species of Mexican Triatomines (Hemiptera: Reduviidae). J. Med. Entomol.; 48: 705-707.

38. Dewey DR, 1982 Genomic and phylogenetic relationships among North American perennial Triticeae. In: Estes JR, Tyrl RJ, Brunken JN (eds) Grasses and Grasslands: Systematics and Ecology. University of Oklahoma Press, Norman, pp 51-88.

39. Riley R, 1966. The secondary pairing of bivalents with genetically similar chromosomes. Nature; 185: 751-752.

4.3 Resultados em forma de apresentação

4.3.1 Cruzamentos experimentais no gênero *Rhodnius*

4.3.1.1 *R. nasutus* x *R. prolixus*

R. nasutus e *R. prolixus* são espécies filogeneticamente relacionadas pertencentes ao grupo monofilético denominado *prolixus* (JUSTI e GALVÃO, 2017). Embora evolutivamente relacionadas, essas espécies apresentam características cromossômicas distintas, a saber, enquanto *R. nasutus* contém blocos de heterocromatina constitutiva distribuídos nos autossomos, *R. prolixus* apresenta heterocromatina restrita ao cromossomo sexual Y (RAVAZI et al., 2017). A presença de heterocromatina nos autossomos é pouco comum no gênero *Rhodnius*, pois das 20 espécies conhecidas, apenas *R. nasutus*, *R. pallescens*, *R. ecuadoriensis*, *R. taquarussuensis* e *R. domesticus* apresentam esse padrão cromossômico (ROSA et al., 2017). Levando em consideração que Schreiber e Pellegrino (1950) sugerem que diferenças no padrão heterocromático podem ser consideradas como possíveis mecanismos de especiação e que os estudos dos cruzamentos experimentais e a análise dos híbridos resultantes podem ajudar a compreender a sistemática deste grupo de vetores, podem ser usados para analisar os mecanismos de isolamento que limitam o fluxo gênico entre as diferentes espécies, assim como podem ser empregados para o estabelecimento do papel da hibridação natural na geração de novas variantes (que podem levar à evolução adaptativa e/ou na fundação de novas linhagens evolutivas), realizamos cruzamentos experimentais entre *R. nasutus* x *R. prolixus* (em ambas as direções) (Figura 2) (Tabela 1), com foco taxonômico e evolutivo.

Nossos resultados demonstram que a heterocromatina constitutiva não é uma barreira de isolamento reprodutivo pré-zigótica para o gênero *Rhodnius*, pois híbridos foram obtidos em ambas as direções dos cruzamentos experimentais entre *R. nasutus* x *R. prolixus* (Figura 3) (Tabela 1). Perez et al. (2005) também observaram que a heterocromatina não atua como barreira de fertilidade entre espécies próximas do gênero *Triatoma* e ressaltam que esse fator não influencia nas sinapses meióticas e, conseqüentemente, no processo de recombinação gênica.

Tabela 3. Cruzamentos experimentais realizados entre *R. nasutus* e *R. prolixus*.

Cruzamentos Experimentais	Número de Ovos				Fertilidade dos Ovos	Mortalidade F1	Mortalidade F2
	C1	C2	C3	Total			
<i>R. nasutus</i> ♀ x <i>R. prolixus</i> ♂	232	11	73	314	04%	28,6%	-
<i>R. prolixus</i> ♀ x <i>R. nasutus</i> ♂	106	90	122	318	22%	66,2%	-
Híbrido F1 ♀ x Híbrido F1 ♂ ¹	82	146	161	389	00%	-	-
Híbrido F1 ♀ x Híbrido F1 ♂ ²	175	134	172	481	00%	-	-
Cruzamentos Controles							
	C1	C2	C3	Total			
<i>R. nasutus</i> ♀ x <i>R. nasutus</i> ♂	316	374	177	867	48%	-	-
<i>R. prolixus</i> ♀ x <i>R. prolixus</i> ♂	275	290	248	813	87%	-	-

¹ Híbridos do cruzamento entre *R. nasutus* ♀ x *R. prolixus* ♂; ² Híbridos do cruzamento entre *R. prolixus* ♀ x *R. nasutus* ♂. C1, C2 e C3 = réplicas dos cruzamentos experimentais. (Fonte: Elaborado pelo autor).

Figura 3. Cruzamentos experimentais interespecíficos entre *R. nasutus* ♀ e *R. prolixus* ♂ (A), demonstrando a ocorrência de cópulas entre as espécies. Embora não fotodocumentada, a cópula entre *R. prolixus* ♀ e *R. nasutus* ♂ foi observada. (Fonte: Elaborado pelo autor).



Embora tenham nascido híbridos em ambas as direções (Figura 3), a taxa de fertilidade dos ovos foi extremamente baixa quando comparada aos parentais (Tabela 1), sinalizando o fenômeno de inviabilidade do híbrido. No entanto, ao realizar cruzamento entre híbridos F1, a taxa de eclosão dos ovos de 0% demonstra que os híbridos resultantes do cruzamento entre *R. nasutus* x *R. prolixus* eram inférteis (Tabela 1), ressaltando o fenômeno de esterilidade do híbrido. A análise das gônadas sugere disgenesia gonadal para os machos proveniente do cruzamento entre *R. nasutus* x *R. prolixus* (Figura 4B) e para as fêmeas proveniente do cruzamento entre *R. prolixus* x *R. nasutus* (Figura 4C). As análises citogenéticas dos testículos resultaram na observação de metáfases com erros de pareamento entre os cromossomos homeólogos de híbridos em F1 (Figura 5), o que confirma as barreiras pós-zigóticas descritas acima. Esses eventos evolutivos que inviabilizam os híbridos na natureza corroboram o *status* específico de *R. nasutus* e *R. prolixus*, pois limita o fluxo gênico entre as espécies.

Figura 4. Híbridos adultos provenientes do cruzamento experimental entre *R. nasutus* ♀ e *R. prolixus* ♂ (A) e *R. prolixus* ♀ e *R. nasutus* ♂ (B). (Fonte: Elaborado pelo autor).

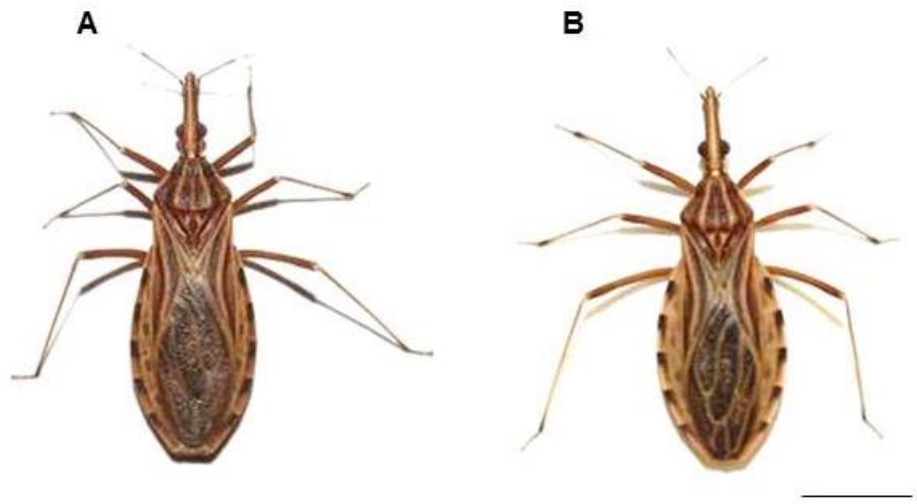


Figura 5. Gônadas de híbridos fêmeas e machos provenientes do cruzamento experimental entre *R. nasutus* e *R. prolixus*. A = Ovário de *R. nasutus* ♀ e *R. prolixus* ♂ sem disgenesia gonadal. B= Testículo atrofiado de *R. nasutus* ♀ e *R. prolixus* ♂. C= Ovário atrofiado de *R. prolixus* ♀ e *R. nasutus* ♂. D = Testículo sem disgenesia gonadal de *R. prolixus* ♀ e *R. nasutus* ♂. (Fonte: Elaborado pelo autor).

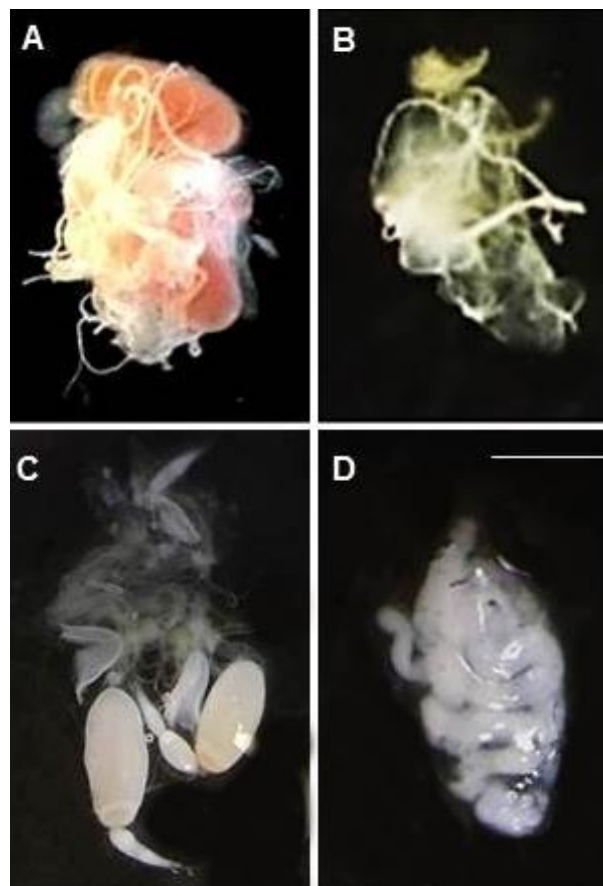
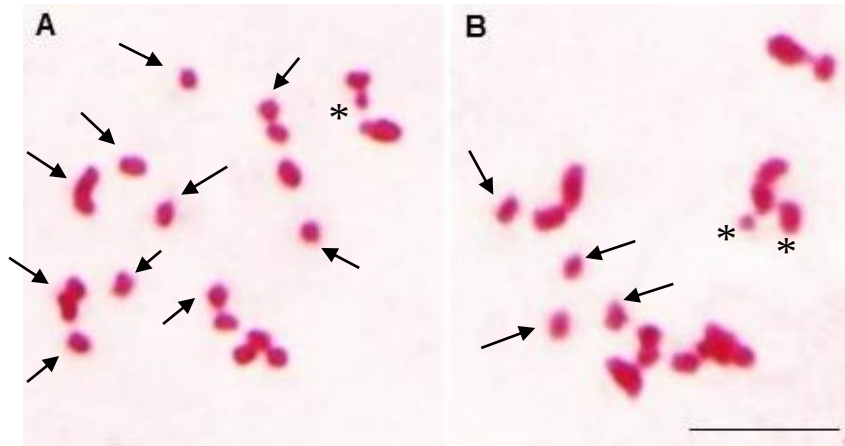


Figura 6. Metáfases meióticas do cruzamento experimental entre *R. prolixus* ♀ e *R. nasutus* ♂ (A) e *R. nasutus* ♀ e *R. prolixus* ♂ (B) com erros no pareamento dos cromossomos homeólogos, como indicado pelas setas (* = cromossomos sexuais X e Y).



A análise da segregação das características fenotípicas de *R. nasutus* e *R. prolixus* em híbrido F1 mostrou predominância de caracteres de uma ou outra espécie, dependendo da estrutura analisada. Na morfometria geométrica da asa, os resultados das análises dos componentes principais (PCA), para comparar as espécies machos de *R. prolixus*, *R. nasutus* e os Híbridos de (*R. prolixus* ♀ e *R. nasutus* ♂) e (*R. nasutus* ♀ e *R. prolixus* ♂), nos mostrou que o Componente Principal 1 (formato da asa, eixo X) representou 50,9 % e o Componente Principal 2 (tamanho da asa, eixo Y) representou 34,9 %, juntos corresponderam a 85,8 % da variabilidade total da forma e tamanho (Figura 6). O mapa fatorial foi gerado a partir de componente principal 1 (CP1) e componente principal 2 (CP2) ambos influenciam nas duas variáveis (tamanho e forma) e nos servem de ferramenta para mostrar a distribuição de cada espécie dentro do mapa e suas similaridades, representadas pelos polígonos. Como o CP1 recebe maior influência da forma do que do tamanho, os resultados de asas de machos indicam que as asas dos híbridos analisados receberam maior influência da forma. Além disso, a morfometria da asa de ambas as direções indica maior predominância do fenótipo para *R. nasutus*.

A análise do pronoto revelou que os híbridos F1 em ambas as direções apresentam características de *R. prolixus* (Figura 7): ângulos ântero-laterais do pronoto arredondado e faixas escuras do lobo posterior do pronoto distintamente separadas [de acordo com a chave taxonômica de Lent & Wygodzinsky (1979)].

Figura 7. Mapa fatorial gerado a partir da morfometria da asa de *R. nasutus*, *R. prolixus*, híbridos de *R. prolixus* ♀ e *R. nasutus* ♂ e híbridos de *R. nasutus* ♀ e *R. prolixus* ♂, indicando predominância de fenótipo para *R. nasutus*. (Fonte: Elaborado pelo autor).

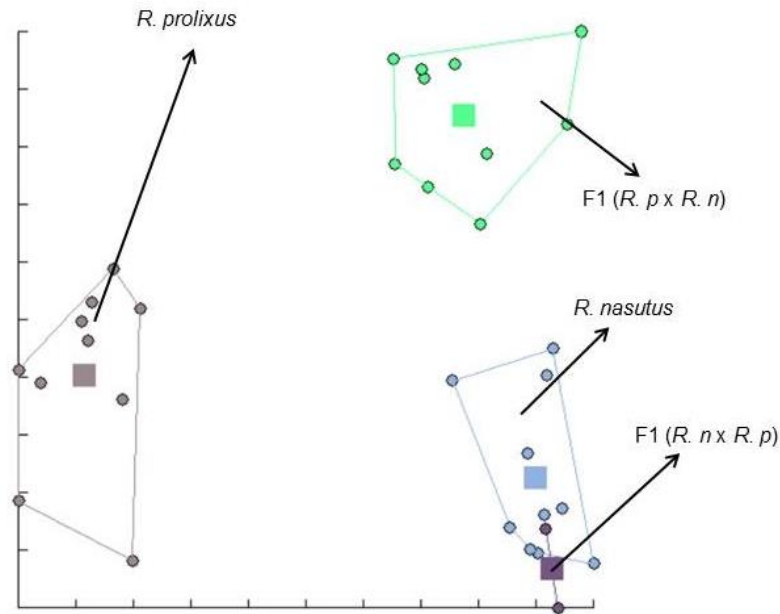
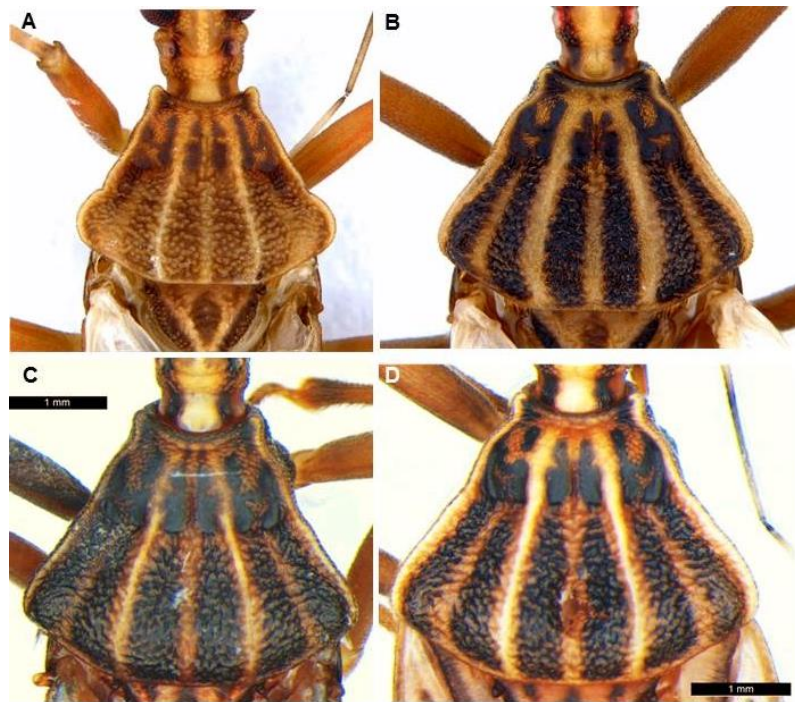


Figura 8. Adultos de *R. nasutus* e *R. prolixus* e híbridos adultos do cruzamento entre *R. nasutus* e *R. prolixus* submetidos à análises de padrão de segregação fenotípica do pronoto. A= *R. nasutus*. B= Híbrido de *R. prolixus* ♀ e *R. nasutus* ♂. C= *R. prolixus*. D= Híbrido de *R. nasutus* ♀ e *R. prolixus* ♂. (Fonte: Elaborado pelo autor).



4.3.1.2 *R. montenegrensis* x *R. robustus*

O grupo *prolixus* é um complexo monofilético de espécies composto por *R. barretti*, *R. dalessandroi*, *R. domesticus*, *R. milesi*, *R. marabaensis*, *R. montenegrensis*, *R. nasutus*, *R. neglectus*, *R. neivai*, *R. prolixus*, *R. robustus* e *R. taquarussuensis* (JUSTI e GALVÃO, 2017; ROSA et al., 2017). Monteiro et al. (2003), por meio de análises moleculares com Cyt b, observaram que *R. robustus* é um grupo parafilético formado por quatro diferentes linhagens que ocorrem no norte da América do Sul. A linhagem de *R. robustus* I ocorre na região de Orinoco (Venezuela) e as linhagens II, III, IV ocorrem na região da Amazônica, sendo que a linhagem II ocorre no Equador e no Brasil, a III apenas no Brasil e a IV na Guiana francesa e no Brasil (MONTEIRO et al., 2003). Uma das populações de *R. robustus* (linhagem II) foi coletada em Monte Negro, Rondônia, a mesma localidade de coleta de *R. montenegrensis*. Baseados nisso, Abad-Franch et al. (2013) sugerem que *R. montenegrensis*, provavelmente, não seja uma espécie nova e apenas represente uma das linhagens de *R. robustus* já descrita por Monteiro et al. (2003).

Levando em consideração que os estudos dos cruzamentos experimentais e a análise dos híbridos resultantes podem ajudar a compreender a sistemática deste grupo de vetores, podem ser usados para analisar os mecanismos de isolamento que limitam o fluxo gênico entre as diferentes espécies, assim como podem ser empregados para o estabelecimento do papel da hibridação natural na geração de novas variantes (que podem levar à evolução adaptativa e/ou na fundação de novas linhagens evolutivas), realizamos cruzamentos experimentais entre *R. montenegrensis* e *R. robustus* (linhagem II) (em ambas as direções) (Figura 8) (Tabela 2), com foco taxonômico e evolutivo.

Barreiras pré-zigóticas não foram observadas em nenhuma das direções dos cruzamentos (Tabela 2). Apesar da taxa de eclosão dos híbridos F1 (Figura 9A, B) ter sido alta quando comparada com os parentais (Tabela 2), a taxa de mortalidade desses insetos também foi alta (Tabela 2). Em F2 (Figura 9C, D), foi observada baixa taxa de fertilidade para uma das direções (*R. montenegrensis* ♀ x *R. robustus* ♂) (Tabela 1) e alta taxa de fertilidade na direção oposta (Tabela 2). No entanto, ambas as direções apresentaram alta taxa de mortalidade dos híbridos F2 (Tabela 2). Embora o cruzamento para obtenção de F3 esteja em andamento, até o momento, a taxa de eclosão foi relativamente baixa (Tabela 2).

Figura 9. Cruzamentos experimentais interespecíficos entre *R. montenegrensis* ♀ e *R. robustus* ♂ (A) e *R. robustus* ♀ e *R. montenegrensis* ♂, demonstrando a ocorrência de cópulas entre as espécies. (Fonte: Elaborado pelo autor).

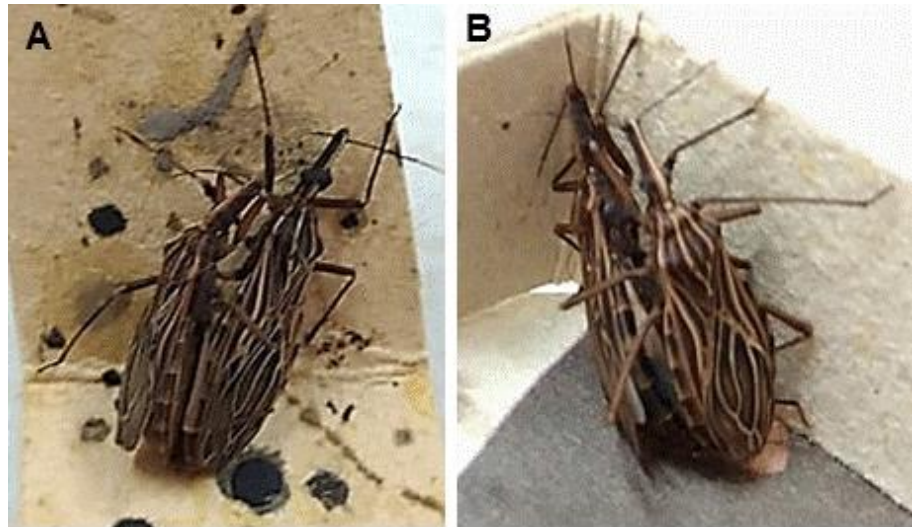


Figura 10. Híbridos adultos provenientes do cruzamento experimental entre *R. montenegrensis* e *R. robustus*. A= Híbridos F1 de *R. montenegrensis* ♀ x *R. robustus* ♂. B = Híbridos F1 de *R. robustus* ♀ e *R. montenegrensis* ♂. C= Híbridos F2 de *R. montenegrensis* ♀ x *R. robustus* ♂. D= Híbridos F2 de *R. robustus* ♀ e *R. montenegrensis* ♂. (Fonte: Elaborado pelo autor).

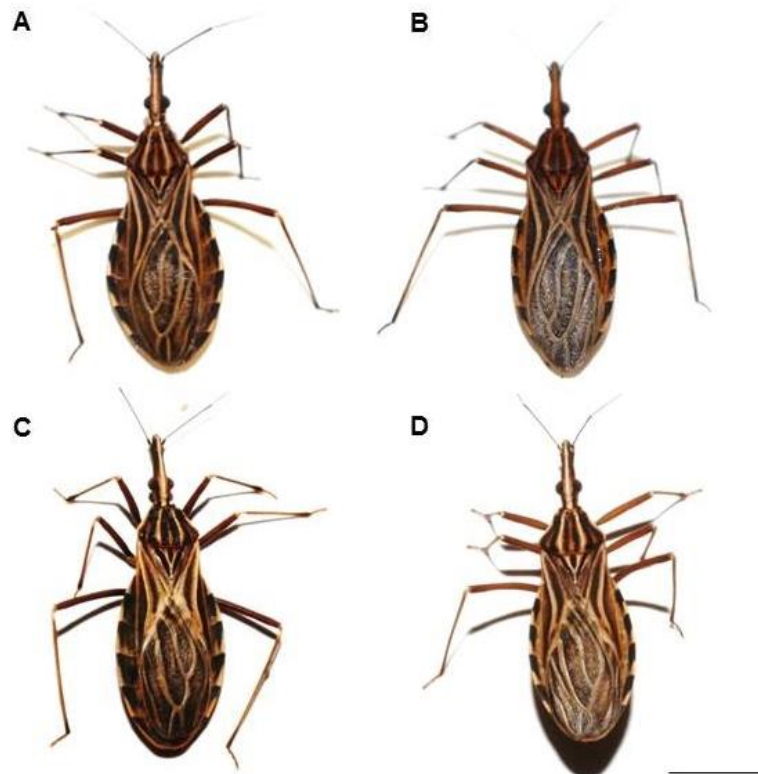


Tabela 4. Cruzamentos experimentais realizados entre *R. montenegrensis* e *R. robustus*.

Cruzamentos Experimentais	Número de Ovos				Fertilidade dos Ovos	Mortalidade F1	Mortalidade F2
	C1	C2	C3	Total			
<i>R. montenegrensis</i> ♀ x <i>R. robustus</i> ♂	147	208	210	565	59%	84%	-
<i>R. robustus</i> ♀ x <i>R. montenegrensis</i> ♂	241	309	302	852	57%	86%	-
Híbrido F1 ♀ x Híbrido F1 ♂ ¹	136	279	112	527	13%	-	68,1%
Híbrido F1 ♀ x Híbrido F1 ♂ ²	295	356	263	914	75%	-	90,9%
Híbrido F2 ♀ x Híbrido F2 ♂ ³	0	97	22	119	18%	-	
Híbrido F2 ♀ x Híbrido F2 ♂ ⁴	0	27	65	92	29%	-	
Cruzamentos Controle	C1	C2	C3	Total			
<i>R. montenegrensis</i> ♀ x <i>R. montenegrensis</i> ♂	231	131	249	611	44%	-	-
<i>R. robustus</i> ♀ x <i>R. robustus</i> ♂	173	87	194	454	48%	-	-

¹ Híbridos do cruzamento entre *R. montenegrensis* ♀ x *R. robustus* ♂; ² Híbridos do cruzamento entre *R. robustus* ♀ x *R. montenegrensis* ♂; ³ Híbridos F2 do cruzamento entre *R. montenegrensis* ♀ x *R. robustus* ♂; ⁴ Híbridos F2 do cruzamento entre *R. robustus* ♀ x *R. montenegrensis* ♂. (Fonte: Elaborada pelo autor).

As análises morfológicas das gônadas dos híbridos em F1 e F2 não demonstraram disgenesia gonadal (Figura 10). Da mesma forma, as análises citogenéticas dos híbridos não demonstraram erros de pareamento entre os cromossomos homeólogos (Figura 11). No entanto, a baixa taxa de eclosão conciliada com a alta taxa de mortalidade observada nos cruzamentos (Tabela 2) sinalizaram para eventos de inviabilidade do híbrido em F1, esterilidade do híbrido para F2 proveniente do cruzamento inicial entre *R. montenegrensis* ♀ x *R. robustus* ♂ e desmoronamento do híbrido atuando em F2 e F3 (Tabela 2), ressaltando o status específico de *R. montenegrensis*.

Figura 11. Gônadas não atrofiadas de híbridos fêmeas e machos provenientes do cruzamento experimental entre *R. montenegrensis* e *R. robustus*. A= Ovário de híbrido F1 adulto de *R. montenegrensis* ♀ x *R. robustus* ♂. B= Testículo de híbrido F1 adulto de *R. montenegrensis* ♀ x *R. robustus* ♂. C= Ovário de híbrido F1 adulto de *R. robustus* ♀ e *R. montenegrensis* ♂. D= Testículo de híbrido F1 adulto de *R. robustus* ♀ e *R. montenegrensis* ♂. E= Ovário de híbrido F2 adulto de *R. montenegrensis* ♀ x *R. robustus* ♂. F= Testículo de híbrido F2 adulto de *R. montenegrensis* ♀ x *R. robustus* ♂. G= Ovário de híbrido F2 adulto de *R. robustus* ♀ e *R. montenegrensis* ♂. H= Testículo de híbrido F2 adulto de *R. robustus* ♀ e *R. montenegrensis* ♂. (Fonte: Elaborada pelo autor).

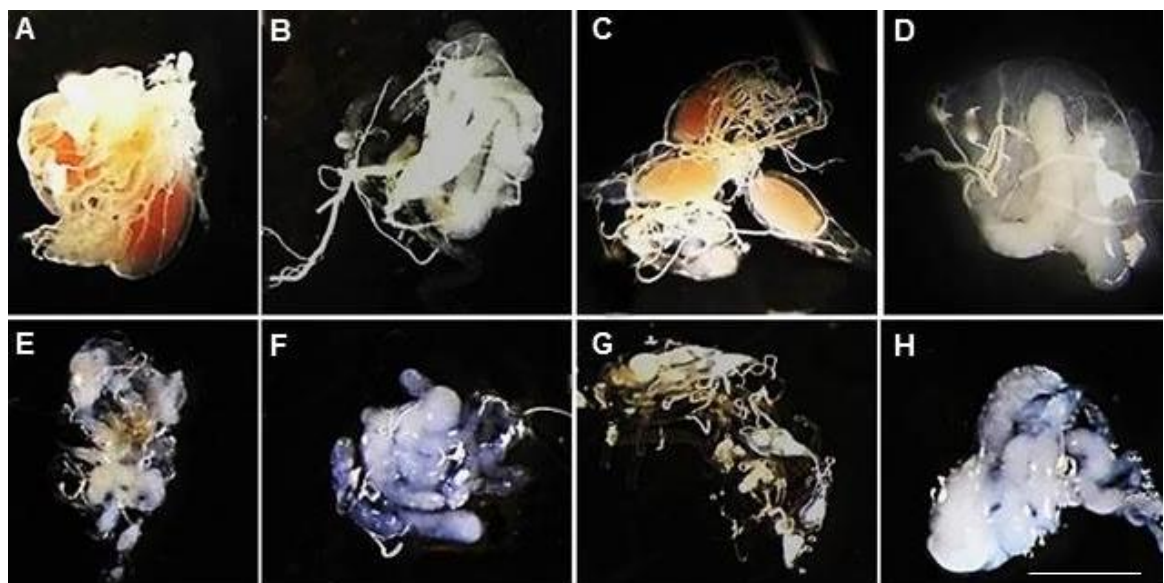
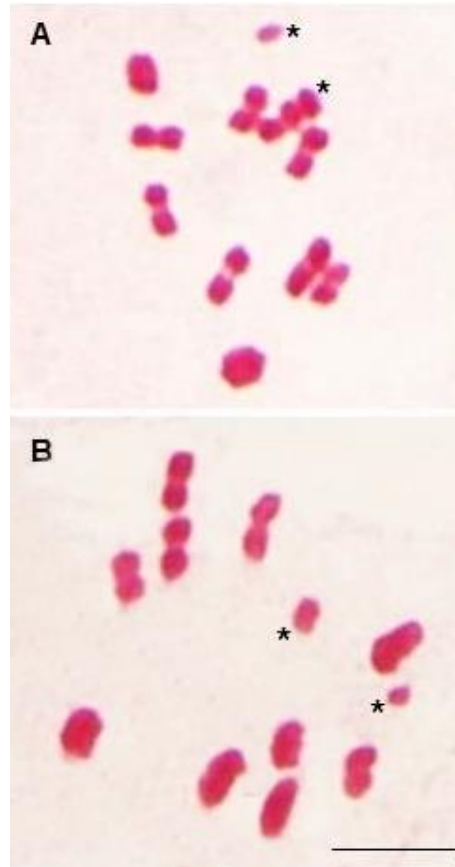
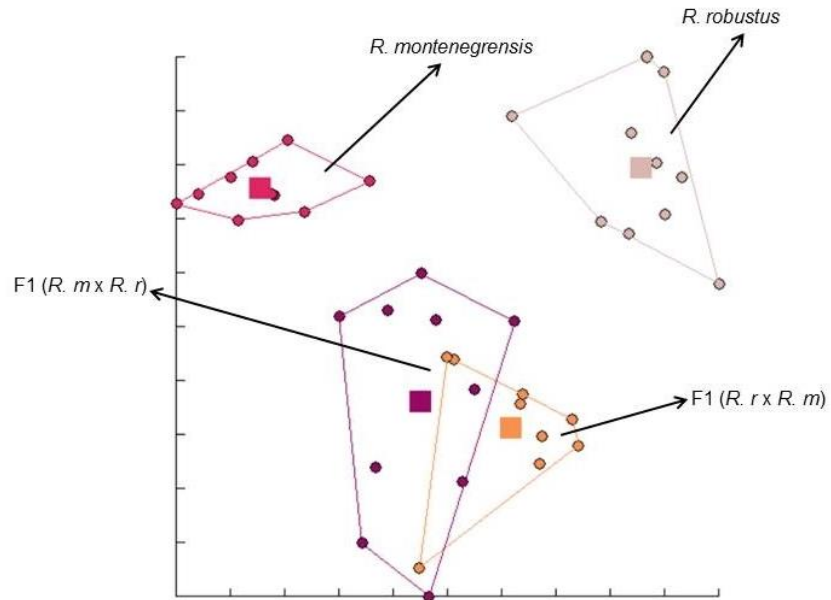


Figura 12. Metáfases meióticas do cruzamento experimental entre *R. montenegrensis* ♀ x *R. robustus* ♂ (A) e *R. robustus* ♀ e *R. montenegrensis* ♂ (B) sem erros no pareamento dos cromossomos homeólogos (* = cromossomos sexuais X e Y). (Fonte: Elaborada pelo autor).



A morfometria geométrica da asa, os resultados das análises dos componentes principais (PCA), para comparar as espécies machos de *R. robustus*, *R. montenegrensis* e os Híbridos de (*R. montenegrensis* ♀ x *R. robustus* ♂) e (*R. montenegrensis* ♀ x *R. robustus* ♂), nos mostrou que o Componente Principal 1 (formato da asa, eixo X) representou 66,5% e o Componente Principal 2 (tamanho da asa, eixo Y) representou 26,7 %, juntos corresponderam a 93,2 % da variabilidade total da forma e tamanho (Figura 12). O mapa fatorial foi gerado a partir de componente principal 1 (CP1) e componente principal 2 (CP2) ambos influenciam nas duas variáveis (tamanho e forma) e nos servem de ferramenta para mostrar a distribuição de cada espécie dentro do mapa e suas similaridades, representadas pelos polígonos. Como o CP1 recebe maior influência da forma do que do tamanho, os resultados de asas de machos indicam que as asas dos híbridos analisados receberam maior influência da forma. Além disso, a morfometria da asa de ambas as direções indica fenótipo intermediário de *R. robustus* e *R. montenegrensis*.

Figura 13. Mapa fatorial gerado a partir da morfometria da asa de *R. montenegrensis* ♀ x *R. robustus* ♂ e *R. robustus* ♀ e *R. montenegrensis* ♂, indicando o fenótipo intermediário entre *R. robustus* e *R. montenegrensis*. (Fonte: Elaborada pelo autor).



5 CONCLUSÃO

Os cruzamentos híbridos se mostraram como importantes ferramentas taxonômicas e também auxiliaram no entendimento das questões evolutivas. Foi possível observar que possivelmente os gêneros *Rhodnius* e *Psammolestes* estão isolados reprodutivamente por barreiras pré-zigóticas, corroborando o *status* genérico de *Psammolestes*. Além disso, nossos resultados permitiram ressaltar o *status* específico de *P. tertius* e *P. coreodes*, pois embora híbridos em primeira geração (F1) eclodiram, barreiras pós-zigóticas de inviabilidade do híbrido e quebra do híbrido foram relatadas. Por sua vez, o *status* específico de *R. nasutus* e *R. prolixus* foi confirmado pelos fenômenos de inviabilidade e esterilidade dos híbridos e o *status* de *R. montenegrensis* por eventos de inviabilidade do híbrido em F1, esterilidade do híbrido para F2 proveniente do cruzamento inicial entre *R. montenegrensis* ♀ x *R. robustus* ♂ e indicação de possível desmoronamento do híbrido atuando em F2 e F3.

REFERÊNCIAS

ABAD-FRANCH, F.; PAVAN, M.G.; JARAMILLO, N.; PALOMEQUE, F.S.; DALE, C.; CHAVERRA, D.; MONTEIRO, F.A. *Rhodnius barretti*, a new species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) from western Amazonia. **Memorias Instituto Oswaldo Cruz**, v.108, p. 92-99, 2013.

ABALOS, J.W. Sobre híbridos naturales y experimentales de *Triatoma*. **Anais do Instituto Regional**, v.2, p. 209-223, 1948.

ABALOS, J.W.; WYGODZINSKY, P. Las Triatominae argentinas. **Monographia Anais do Instituto Regional**, v. 1, p. 1-178, 1951.

ALEVI, K.C.C.; MENDONÇA, P.P.; SUCI, M.; PEREIRA, N.P.; ROSA, J.A.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Karyotype and spermatogenesis in *Triatoma melanocephala* Neiva and Pinto (1923). Does this species fit in the Brasiliensis subcomplex? **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, p. 1652-1653, 2012.

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

BARRETTO, M.P. Ecologia de triatomíneos e transmissão do *Trypanosoma cruzi*, com especial referência ao Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 6, p. 339-353, 1976.

BELISÁRIO, C.J.; D'ÁVILA-PESSOA, G.C.; DIOTAIUTI, L. Biological aspects of crosses between *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) and *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964 (Hemiptera: Reduviidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 517-521, 2007.

CAMPOS-SOTO, R.; PANZERA, F.; PITA, S.; LAGES, C.; SOLARI, A.; BOTTO-MAHAN, C. Experimental crosses between *Mepraia gajardoi* and *M. spinolai* and hybrid chromosome analyses reveal the occurrence of several isolation mechanisms. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 45, p. 205-212, 2016.

CARVALHEIRO, J.R.; BARRETTO, M.P. Estudos sobre reservatórios e vectores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. LX – tentativas de cruzamento de *Rhodnius prolixus* Stal, 1859 com *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 (Hemiptera, Reduviidae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** v. 18, p. 17-23, 1976.

CARVALHO, H.F.; RECCO-PIMENTEL, S.M. **A Célula**. São Paulo: Manole, 2013.

CERQUEIRA, R.L. **Estudos sobre populações de triatomíneos silvestres encontrado em Santo Inácio – Bahia**. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 68p, 1982.

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

CORRÊA, R.R.; ESPÍNOLA, H. Descrição de *Triatoma maculata*, nova espécie de triatomíneo de Sobral, Ceará (Hemiptera, Reduviidae). **Arquivos de Higiene e Saúde Pública**, v. 29, p. 115-127, 1964.

CORREIA, N.; ALMEIDA, C.E.; LIMA-NEIVA, V.; GUMIEL, M.; LIMA, M.M.; MEDEIROS, L.M.O.; MENDONÇA, V.J.; ROSA, J.A.; COSTA, J. Crossing experiments confirm *T. sherlocki* as a member of the *Triatoma brasiliensis* species complex. **Acta Tropica**, v. 128, p.162-167, 2013.

COSTA, J.; ALMEIDA, C.E.; DUJARDIN, J.P.; BEARD, C.B. Crossing Experiments Detect Genetic Incompatibility among Populations of *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Heteroptera, Reduviidae, Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 637-639, 2003.

COSTA, J.; PETERSON, A.T.; DUJARDIN, J.P. Morphological evidence suggests homoploid hybridization as a possible mode of speciation in the Triatominae (Hemiptera, Heteroptera, Reduviidae). **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, p. 263-270, 2009.

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

DIAS, J.C.P.; SCHOFIELD, C.J. 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.

DIAS, F.B.S.; JARAMILLO, N.; DIOTAJUTI L. Description and characterization of the melanic morphotype of *Rhodnius nasutus* Stål, 1859 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, p. 637–41, 2014.

DÍAZ, S.; PANZERA, F.; JARAMILLO, O. N.; PÉREZ, R.; FERNÁNDEZ, R.; VALLEJO, G.; SALDAÑA, A.; CALZADA, J.E.; TRIANA, O.; GÓMEZ-PALÁCIO, A. Genetic, Cytogenetic and Morphological Trends in the Evolution of the *Rhodnius* (Triatominae: Rhodniini) Trans-Andean Group. **PLoS ONE**, v. 9, p. e87493, 2014.

DOBZHANSKY, T. A critique of the species concept in biology. **Philosophy of Science**, v. 2, p. 344-355, 1935.

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

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

GALÍNDEZ, G.I.; BARAZARTE, R.; MÁRQUEZ, J.; OVIEDO, M.; MÁRQUEZ, Y.; MORÓN, L.; CARCAVALLO, R.U. Relaciones reproductivas entre *Rhodnius prolixus* Stal y *Rhodnius robustus* Larrousse (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) bajo condiciones de laboratorio. **Entomología y Vectores**, v. 1, p. 3-13, 1994.

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

GARCÍA, M.; MENES, M.; DORN, P.L.; MONROY, C.; RICHARDS, B.; PANZERA, F.; BUSTAMANTE, D.M. Reproductive isolation revealed in preliminary crossbreeding experiments using field collected *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) from three ITS-2 defined groups. **Acta Tropica**, v. 128, p. 714–718, 2013.

GAUNT, E.; MILES, M.A. An insect molecular clock dates the origin of the insects and accords with palaeontological and biogeographic landmarks. **Molecular Biology Evolution**, v. 19, p. 748-61, 2002.

HEITZMANN-FONTENELLE, T. Bionomia comparativa de triatomíneos. VI - Híbridos de *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 x *Triatoma lenti*, Sherlocki & Serafim, 1967 (Hemiptera, Reduviidae). **Memórias do Instituto Butantan**, v. 47, p. 175-181, 1984.

HYPSE, V.; TIETZ, D.; ZRZAVY, J.; REGO, R.O.; GALVÃO, C.; JURBERG, J. Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the asiatic clade. **Molecular Phylogenetic Evolution**, v. 23, p. 447-457, 2002.

JUSTI, S.A.; RUSSO, C.A.M.; DOS SANTOS-MALLET, J.R.; OBARA, M.T; GALVÃO, C. Molecular phylogeny of Triatomini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Parasites & Vectors**, v. 7, p.149, 2014.

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

LENT, H.; WIGODZINSKY, 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. 520, 1979.

LUCENA, D.T. 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., VENTURA-RODRÍGUEZ, L.V.; MEILLON-ISAIS, K.; BARAJAS-MARTÍNEZ, H.; ALEJANDRE-AGUILAR, R.; LUPERCIOCORONEL, P.; ROCHA-CHÁVEZ, G.; NOGUEDA-TORRES, B. Biological and genetic aspects of experimental hybrids from species of the *Phyllosoma* complex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 236-243, 2008.

MARTÍNEZ-IBARRA, J.A.; GRANT-GUILLÉN, Y.; DELGADILLO-ACEVES, I.N.; ZUMAYA-ESTRADA, F.A.; ROCHA-CHÁVEZ, G.; SALAZARSCETTINO, P.M.; ALEJANDRE-AGUILAR, R.; VILLALOBOS, G.; NOGUEDA-TORRES, B. Biological and

genetic aspects of crosses between phylogenetically close species of Mexican Triatomines (Hemiptera: Reduviidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 48, p. 705-707, 2011.

MARTÍNEZ-IBARRA, J.A.; NOGUEDA-TORRES, B.; GARCÍA-LIN, J.C.; ARROYO-REYS, D.; SALAZAR-MONTAÑO, L.F.; HERNÁNDEZ-NAVARRO, J.A.; DÍAZ-SNCHES, C.G.; TORO-ARREOLA, E.S.; ROCHA-CHÁVEZ, G. Importance of Hybrids of *Meccus phyllosomus mazzottii*, and *M. p. pallidipennis*, and *M. p. phyllosomus* to the Transmission of *Trypanosoma cruzi* in Mexico. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 69, p. 202-6, 2016b.

MARTÍNEZ-IBARRA, J.A.; NOGUEDA-TORRES, B.; SALAZAR-SCHETTINO, P.M.; CABRERA-BRAVO, M.; VENCES-BLANCO, M.O.; ROCHA-CHAVEZ, G. Transmission Capacity of *Trypanosoma cruzi* (Trypanosomatida: Trypanosomatidae) by Three Subspecies of *Meccus phyllosomus* (Heteroptera: Reduviidae) and Their Hybrids. **Medical and Veterinary Entomological**, v. 53, p. 928-934, 2016a.

MAZZOTTI, L.; OSORIO, M.T. Resultados obtenidos en cruzamientos con especies diferentes de *Triatoma*. **Revista da Faculdade de Bogotá**, v. 10, p. 159-160, 1941.

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

MAYR, E. Animal Species and Evolution. **Harvard University Press**, Cambridge, 1963.

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

MENDONÇA, V.J.; ALEVI, K.C.C.; PINOTTI, H.; GURGEL-GONGALVES, R.; PITA, S.; GUERRA, A.L.; PANZERA, F.; ARAÚJO, R.F.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V.; ROSA, J.A. Revalidation of *Triatoma bahiensis* Sherlock & Serafim, 1967 (Hemiptera: Reduviidae) and phylogeny of the *T. brasiliensis* species complex. **Zootaxa**, v. 4107, p. 239-254, 2016.

MONTEIRO, F.A.; WESSON, D.M.; DOTSON, E.M.; SCHOFIELD, C.J.; BEARD, C.B. Phylogeny and molecular taxonomy of the Rhodniini derived from mitochondrial and nuclear DNA sequences. **The American Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, v. 62, p. 460-465, 2000.

NASCIMENTO, J.D.; ROSA, J.A.; SALGADO-ROSA, F.C.; HERNÁNDEZ, C.; PARDO-DIAZ, C.; ALVEI, K.C.C.; RAVAZI, A.; OLIVEIRA, J.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V.; SALAZAR, C.; RAMIRES, J.D. Taxonomical over splitting in the *Rhodnius prolixus* (Insecta: Hemiptera: Reduviidae) clade: Are *R. taquarussuensis* (da Rosa et al., 2017) and *R. neglectus* (Lent, 1954) the same species? **Plos One**, v. 14, p.2, 2019.

OLIVEIRA, J. **Estudo morfológico, morfométrico e molecular de espécies do complexo *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae)**. Dissertação de mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCFAR/UNESP), 80p, 2015.

PÉREZ, R.; HERNÁNDEZ, M.; QUINTERO, O.; SCVORTZOFF, E.; CANALE, D.; MÉNDEZ, L.; COHANOFF, C.; MARTINO, M.; PANZERA, F. Cytogenetic analysis of experimental hybrids in species of Triatominae (Hemiptera-Reduviidae). **Genetica**, v. 125, p. 261-270, 2005.

PINTO, C. Classification de genres d'hémiptères de la famille Triatomidae (Reduviidae). **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.

RAVAZI, A.; ALEVI, K. C.C.; OLIVEIRA, J.; ROSA, J.A.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Cytogenetic analysis in different populations of *Rhodnius prolixus* and *R. nasutus* from different countries of South America. **Brazilian Journal of Biology**, v. 1, p.1, 2017.

ROHLF, F.J. tpsDig, Version 1.27. **Ecology and Evolution**, State University of New York, New York, 2011.

ROSA, J.A.; BARATA, J.M.S.; BARELLI, N.; SANTOS, J.L.F.; BELDA-NETO, F.M. Sexual distinction between 5th instar nymphs of six species (Hemiptera: Reduviidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, p. 257-264, 1922.

ROSA, J.A.; ROCHA, C.S.; GARDIM, S.; PINTO, M.C.; MENDONÇA, V.J.; FERREIRA-FILHO, J.C.R.; CARVALHO, E.O.C.; CAMARGO, L.M.A.; OLIVEIRA, J.; NASCIMENTO, J.D.; CILENSE, M.; ALMEIDA, C.E. Description of *Rhodnius montenegrensis* n. sp. (Hemiptera, Reduviidae: Triatominae) from the state of Rondônia, Brazil. **Zootaxa**, v. 3478, p. 62-76, 2012.

ROSA, J.A.; JUSTINO, H.H.G.; NASCIMENTO, J.D.; MENDONÇA, V.J.; ROCHA, C.S.; CARVALHO, D.B.; FALCONE, R.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V.; ALEVI, K.C.C.; OLIVEIRA, J. A new species of *Rhodnius* from Brazil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **ZooKeys**, v. 625, p. 1-25, 2017.

RYCKMAN, R.E. Biosystematics and hosts of the *Triatoma protracta* complex in North América (Hemiptera: Reduviidae) (Rodentia: Cricetidae). *Univ Calif Publ Entomol*, v. 27, p. 93-240, 1962.

SCHREIBER, G.; PELLEGRINO, J. Eteropicnosi di autosomi come possibile meccanismo di speciazione (Ricerche citologiche su alcuni Emitteri neotropici). **Scienza Genetica**, vol. 3, p. 215-226, 1950.

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

SOUZA, E.S.; ATZINGER, N.C.B.V.; FURTADO, M.B.; OLIVEIRA, J.; DAMIELI, J.N.; VENDRAMINI, D.P.; GARDIM, S.; ROSA, J.A. Description of *Rhodnius marabaensis* sp. N. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from Pará State, Brazil. *Zookeys*, 621: 45-62, 2016a.

SOUZA, R.C.M.; CAMPOLINA-SILVA, G.H.; BEZERRA, C.M.; DIOTAIUTI, L.; GORLA, D.E. Does *Triatoma brasiliensis* occupy the same environmental niche space as *Triatoma melanica*? **Parasites & Vectors**, v. 8, p. 3-61, 2016b.

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

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

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

WHO - World Health Organization. **Chagas Disease American Trypanosomiasis**. Disponível em: < <http://www.who.int/chagas/en/>>. Acesso em: 30/11/2018, 2018.

WIGGLESWORTH, V.B. The physiology of excretion in a blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae). I Composition of the urine. **Journal of Experimental Biology**, v. 8, p. 411-451, 1931.