



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

Yago Visinho dos Reis

**Estudo das barreiras reprodutivas no gênero *Panstrongylus*
(Hemiptera, Triatominae)**

São José do Rio Preto
2019

Yago Visinho dos Reis

**Estudo das barreiras reprodutivas no gênero *Panstrongylus*
(Hemiptera, Triatominae)**

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

Financiadora: CAPES

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

Coorientador: Prof. Dr. Kaio Cesar Chaboli Alevi

São José do Rio Preto
2019

R375e

Reis, Yago Visinho dos

Estudo das barreiras reprodutivas no gênero *Panstrongylus* (Hemiptera, Triatominae) / Yago Visinho dos Reis. -- São José do Rio Preto, 2019
35 f. : il., tabs.

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. Evolução (Biologia). 2. Hibridação. 3. Reduviidae. 4. Vetores artrópodes.
5. Chagas, Doença de. I. Título.

Yago Visinho dos Reis

**Estudo das barreiras reprodutivas no gênero *Panstrongylus*
(Hemiptera, Triatominae)**

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

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

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

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

Prof. Dr. João Aristeu da Rosa
UNESP – Câmpus Araraquara

São José do Rio Preto
22 de Fevereiro de 2019

Dedico esse trabalho à vida, em todas as suas formas e à beleza que existe em cada pedacinho desse grande planeta. Dedico, também, ao respeito e ao amor com a natureza e com o próximo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente aos meus pais, Gerson e Andréa, grandes guerreiros, que sempre batalharam para nos dar o melhor que podiam, sempre insistindo para que estudássemos ao máximo. Por todo amor, carinho e dedicação durante toda a minha vida, sempre me incentivando em busca dos meus sonhos. Muito obrigado!

Aos meus irmãos, Yasmin, Ysabella e Ygor, pelo carinho e companheirismo, que mesmo distantes, não diminui. Por cada lagrima que escorre sempre que faço uma visita e preciso ir embora, e que sempre aumenta o amor que sinto por vocês. Vocês são incríveis!

Agradeço, especialmente, à minha noiva Leticia, por transformar completamente o mundo que eu conhecia. Por me mostrar uma vida maravilhosa ao seu lado, estando sempre presente, por aceitar e incentivar todas as minhas escolhas. Por todas as nossas discussões que nos levam sempre a melhorar e que só aumenta a certeza de querer estar ao seu lado pelo resto da vida. Agradeço pelo companheirismo, pela paciência, pela força e por todo amor e carinho que nunca nos faltou. Obrigado, meu amor.

Aos meus sogros, Marcos e Andrea, e às minhas cunhadas, Paloma, Natália e Maria Eduarda, por todo o carinho desde que os conheci. Por sempre fazerem eu me sentir em casa, em família. Por serem um exemplo de família e cumplicidade.

Aos meus amigos de longe, Roger, Katia e Bárbara, pela força nos momentos difíceis, e por sempre estarem presentes, mesmo distantes.

Aos meus amigos de perto, Gabriel, Corvinho, Isadora, Pizza e Guilherme, amizades incríveis, pessoas que tive um grande prazer de conhecer e que levarei comigo para a vida toda.

Aos meus amigos do Laboratório de Biologia Celular, Amanda, Ana Beatriz, Fernanda e Ana Letícia, pelas idas semanais para Araraquara e pelas viagens de guincho, que não foram poucas, rss.

Agradeço à professora Maria Tercília, um exemplo de pessoa e profissionalismo, por toda dedicação e ensinamentos durante todos esses anos de orientação no laboratório. Obrigado pela oportunidade de ter sido seu aluno.

Ao meu coorientador, Kaio, por todo o conhecimento transmitido, por todo tempo e disponibilidade na minha orientação, tanto acadêmica quanto pessoal, e que se tornou um grande amigo. Obrigado!

Ao professor João Aristeu, por ter aberto as portas do Insetário de Triatominae para a execução desse trabalho e por toda dedicação na manutenção desse importante centro de pesquisa para a doença de Chagas!

E finalmente, ao IBILCE, por ser uma segunda casa, onde pude realizar o sonho de me graduar e me tornar Mestre. Uma casa onde vivi grande parte das minhas alegrias, frustrações... Uma casa que estará para sempre na minha memória, por todas as experiências incríveis que eu vivenciei por aqui. Uma casa de onde talvez eu parta, mas que sempre retornarei.

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

“Nada em biologia faz sentido exceto à luz da evolução”

(DOBZHANSKY, 1973, p125-129)

RESUMO

Os triatomíneos são insetos hematófagos suscetíveis à infecção pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas. Todas as espécies são potenciais vetoras do parasito, embora algumas sejam consideradas de importância primária, que são associadas ao domicílio humano, e outras de menor importância, devido à associação apenas com habitats silvestres. Considerando que as alterações climáticas e ações antrópicas no meio ambiente podem influenciar na distribuição de espécies que antes estavam isoladas, conhecer o potencial de hibridização entre elas é extremamente importante, pois a produção de híbridos pode levar a eventos de introgressão e especiação. Levando em consideração que para o clado *geniculatus* (agrupamento das espécies de *Panstrongylus* spp. + *Nesotriatoma* spp. + *Triatoma tibiamaculata*) não existem estudos que avaliem a hibridização entre essas espécies, o objetivo deste trabalho foi avaliar a presença de barreiras reprodutivas por meio de cruzamentos interespecíficos experimentais entre quatro espécies do clado *geniculatus*. Para cada par de espécies foram montados três cruzamentos em cada direção. Os experimentos foram mantidos durante quatro meses e os casais foram alimentados semanalmente, assim como a contagem de ovos. Em todos os cruzamentos não houve eclosão de ovos, demonstrando a presença de barreiras pré-zigóticas entre todas as espécies analisadas. Esses resultados não eram esperados, uma vez que, mesmo entre espécies filogeneticamente distantes, de outros grupos da tribo Triatomini, existe a possibilidade de hibridação, ressaltando a importância desse grupo para estudos evolutivos. Além disso, consideramos também, que mesmo que essas espécies se encontrem no futuro, devido às mudanças ambientais, as fortes barreiras reprodutivas impedirão a produção de híbridos entre elas.

Palavras-chave: Barreira pré-zigótica. Cruzamento interespecífico. Reduviidae. Doença de Chagas. Insetos vetores.

ABSTRACT

Triatomines are hematophagous insects susceptible to infection by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, an etiologic agent of Chagas' disease. All species are potential vectors of the parasite, although some are considered of primary importance, which are associated to human domicile, and others of minor importance, due to the association with wild habitats only. Considering that climate change and anthropogenic actions in the environment may influence the distribution of species that was previously isolated, knowing the hybridization potential between them is extremely important, since the production of hybrids can lead to introgression and speciation events. Considering that for clado *geniculatus* (grouping of the species of *Panstrongylus* spp. + *Nesotriatoma* spp. + *Triatoma tibiamaculata*) there are no studies that evaluate the hybridization between these species, the objective of this work was to evaluate the presence of reproductive barriers by means of Interspecific crosses between four species of *geniculatus* clade. For each pair of species, three crosses were assembled in each direction. The experiments were maintained for four months and the couples were fed weekly, as well as the egg count. In all the crosses there was no hatching of eggs, demonstrating the presence of pre-zygotic barriers among all species analyzed. These results were not expected, since even among phylogenetically distant species, from other groups of the Triatomini tribe, there is the possibility of hybridization, emphasizing the importance of this group for evolutionary studies. In addition, we also believe that even if these species meet in the future due to environmental changes, strong reproductive barriers will prevent the production of hybrids between them.

Keywords: Pré zygotic barriers. Interspecific crossing. Reduviidae. Chagas disease. Insects vectors.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVO	13
3	MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1	Obtenção do material biológico	14
3.2	Cruzamentos interespecíficos	14
3.2	Manutenção das colônias	15
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
4.1	Capítulo 1 – Trends in Evolution of the Triatomini tribe (Hemiptera, Triatominae): genetic incompatibility in the <i>geniculatus</i> clade – [artigo a ser submetido para a revista <i>Scientific Reports</i> (FI: 4,25)]	16
	Introduction.....	16
	Materials and Methods	19
	Results and Discussion	19
	References	22
5	CONCLUSÕES	30
	REFERÊNCIAS.....	31

1 INTRODUÇÃO

Os triatomíneos são insetos hematófagos pertencentes à subfamília Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) (LENT; WYGODZINSKY, 1979) que podem, durante o repasto sanguíneo, se contaminar com o protozoário *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), agente causador da doença de Chagas (NOIREAU; DIOSQUE; JANSEN, 2009). Todas as espécies dessa subfamília, uma vez infectadas, são potenciais vetoras do parasito, e poderão contaminar, por meio das fezes, outros mamíferos, inclusive o homem, uma vez que esses insetos tem o hábito de defecar durante ou logo após a hematofagia (NOIREAU; DIOSQUE; JANSEN, 2009).

Já foram descritas 154 espécies de triatomíneos, das quais três fosseis, que estão distribuídas em 19 gêneros e cinco tribos (GALVÃO, 2014; JUSTI; GALVÃO, 2017; ROSA *et al.*, 2017; DORN *et al.*, 2018; POINAR, 2019). Dois dos gêneros mais numerosos, *Triatoma* Laporte, 1832 e *Panstrongylus* Berg, 1879, estão agrupados na tribo Triatomini que, recentemente, foi dividida em clados, grupos, complexos e subcomplexos, devido a alguns gêneros agrupados nessa tribo serem parafiléticos (como, por exemplo, *Triatoma* e *Panstrongylus*), e apesar desses agrupamentos não possuírem validade taxonômica, eles representam grupos naturais (monofiléticos) (JUSTI *et al.*, 2014, JUSTI; GALVÃO; SCHRAGO, 2016)

O gênero *Panstrongylus* é facilmente diferenciado de *Triatoma* por meio da localização dos tubérculos anteníferos próxima à borda anterior dos olhos (LENT; WYGODZINSKY, 1979). Contudo, diversas análises moleculares têm mostrado relações filogenéticas entre as espécies de *Nesotriatoma* Usinger, 1944 e *T. tibiamaculata* (Pinto, 1926) com o gênero *Panstrongylus*, as quais formam o clado *geniculatus* (HYPSE, 2002; JUSTI *et al.*, 2014, JUSTI; GALVÃO; SCHRAGO, 2016).

As espécies de *Nesotriatoma* são endêmicas das Antilhas e acredita-se que o ancestral tenha dispersado em associação com um roedor da família Capromyidae (JUSTI; GALVÃO; SCHRAGO, 2016), uma vez que a divergência entre as populações continentais e insulares das espécies dessa família é estimada para o mesmo período da separação entre os ancestrais de *Nesotriatoma* (FABRE *et al.*,

2014; JUSTI; GALVÃO; SCHRAGO, 2016). Devido à relação entre esse gênero e *Panstrongylus* ser recente, muitos autores que não consideravam *Nesotriatoma* como um gênero válido incluíam as espécies em *Triatoma* (LENT; WYGODZINSKY, 1979; GALVÃO, 2009; PANZERA *et al.*, 2012; JUSTI; GALVÃO; SCHRAGO, 2016; JUSTI; GALVÃO, 2017), mostrando que as características morfológicas podem levar ao agrupamento errôneo das espécies de Triatominae. Isso também pode ser evidenciado em *T. tibiamaculata*, que apesar de ser morfológicamente caracterizada como *Triatoma*, apresenta diversas características em comum com o gênero *Panstrongylus*, como semelhanças no formato de sensilas dos segmentos abdominais ventrais de ninfas de quinto estágio (ROSA; BARATA; BARELLI, 1995), no formato da espermateca (NASCIMENTO *et al.*, 2017) e no padrão morfométrico das asas (OLIVEIRA *et al.*, 2017), ressaltando a importância de novas abordagens para o esclarecimento dessas relações evolutivas. Além disso, tanto as espécies do gênero *Nesotriatoma* quanto *T. tibiamaculata* possuem 23 cromossomos ($20A + X_1X_2Y$) (PANZERA *et al.*, 1996; DUJARDIN; SCHOFIELD; PANZERA, 2002; SEVERI-AGUIAR; AZEREDO-OLIVEIRA, 2004; REIS *et al.*, 2016; ALEVI *et al.*, 2016; BORSATTO *et al.*, 2018), o mesmo cariótipo das espécies de *Panstrongylus* spp., exceto *P. lutzii* (Neiva & Pinto, 1923), que apresenta $2n = 24$ cromossomos [$20A + X_1X_2X_3Y$ (SANTOS *et al.*, 2016; ALEVI *et al.*, 2018)] e *P. megistus* (Burmeister, 1835), que apresenta $2n = 21$ cromossomos [$18A + X_1X_2Y$ (CROSSA *et al.*, 2002; ALEVI *et al.*, 2015)].

Os estudos de hibridização na subfamília Triatominae são muito importantes e interessantes, uma vez que mesmo entre espécies filogeneticamente mais distantes, existe a produção de híbridos, como é o caso de *T. infestans* (Klug, 1834) x *T. rubrovaria* (Blanchard, 1843), *T. maculata* (Erichson, 1848) x *T. sordida* (Stål, 1859), *T. maculata* x *T. infestans*, *T. maculata* x *T. brasiliensis* Neiva, 1911 e *T. pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964 x *T. infestans* (CARCAVALLO *et al.*, 2000). Uma vez que se trata de vetores, é possível que os descendentes de cruzamentos interespecíficos tenham potencial de transmissão, do *T. cruzi*, diferente dos indivíduos parentais, como foi recentemente observado para híbridos de *Meccus* (MARTÍNEZ-IBARRA *et al.*, 2016). Além disso, os cruzamentos experimentais também podem contribuir para corroborar o status específico de espécies, caso existam barreiras reprodutivas entre elas. Por exemplo, *Triatoma petrochiae* Pinto &

Barreto, 1925 é uma espécie que já foi considerada sinônima de *T. brasiliensis* Neiva, 1911 (LUCENA, 1970). Entretanto, enquanto a primeira é, até o momento, estritamente silvestre, apresentando baixa importância na transmissão da doença de Chagas, *T. brasiliensis* é uma das principais espécies vetoras na região Nordeste do Brasil (GALVÃO, 2014), e o *status* específico de *T. petrochiae* só foi validado por meio de cruzamentos experimentais interespecíficos (ESPÍNOLA, 1971). Outras espécies também tiveram seus *status* específicos corroborados por meio de cruzamentos experimentais, como, algumas espécies do complexo *T. brasiliensis* (COSTA *et al.*, 2003; COSTA; PETERSON; DUJARDIN, 2009; CORREIA *et al.*, 2013; MENDONÇA *et al.*, 2014, 2016), do complexo *Meccus phyllosoma* (MARTÍNEZ-IBARRA *et al.*, 2008, 2011) e do complexo *T. dimidiata* (GARCÍA *et al.*, 2013), ressaltando a importância dos estudos de hibridização para a taxonomia dos triatomíneos.

A possibilidade de hibridização pode resultar, ainda, na formação de novos táxons, que poderão conter uma mistura de genes de cada espécie parental, ou mesmo a introgressão de algum gene vantajoso de uma espécie para outra caso haja retrocruzamento dos híbridos com, uma ou ambas, espécies que os originaram (RHYMER; SIMBERLOFF, 1996). Para os triatomíneos esses eventos podem representar um grande problema, pois se sabe, por exemplo, que a resistência a pesticidas, apesar de multifatorial, pode estar relacionada com herança autossômica (PESSOA *et al.*, 2015). Uma vez que as mudanças ambientais, de origem antrópica ou naturais, podem aproximar espécies que antes estavam isoladas, e favorecer a hibridização entre elas (RHYMER; SIMBERLOFF, 1996), como já foi relatado para duas espécies de anuros (LAMB; AVISE, 1986), conhecer o potencial de hibridização dos triatomíneos, mesmo entre espécies alopátricas, é importante do ponto de vista evolutivo e, sobretudo, epidemiológico.

Uma vez que não existem dados sobre hibridização entre espécies de *Panstrongylus* e, considerando o parafiletismo do gênero, ressaltamos a importância de cruzamentos experimentais envolvendo espécies do clado *geniculatus* (composto de 15 espécies de *Panstrongylus* (OLIVEIRA; ALEVI, 2017), três de *Nesotriatoma* (OLIVEIRA *et al.*, 2018) e *T. tibiamaculata*) (JUSTI; GALVÃO; SCHRAGO, 2016) para auxiliar no esclarecimento das relações evolutivas entre essas espécies.

2 OBJETIVO

Avaliar as barreiras de isolamento reprodutivo entre quatro espécies do clado *geniculatus* (*Panstrongylus megistus*, *Panstrongylus lignarius*, *Triatoma tibiamaculata* e *Nesotriatoma confusa*) e avaliar o *status* específico desses táxons.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção do material biológico

Os insetos utilizados nos experimentos foram cedidos pelo Insetário de Triatominae localizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP/FCFAR), local onde também foram conduzidos todos os cruzamentos por apresentar toda a infraestrutura e biossegurança necessária.

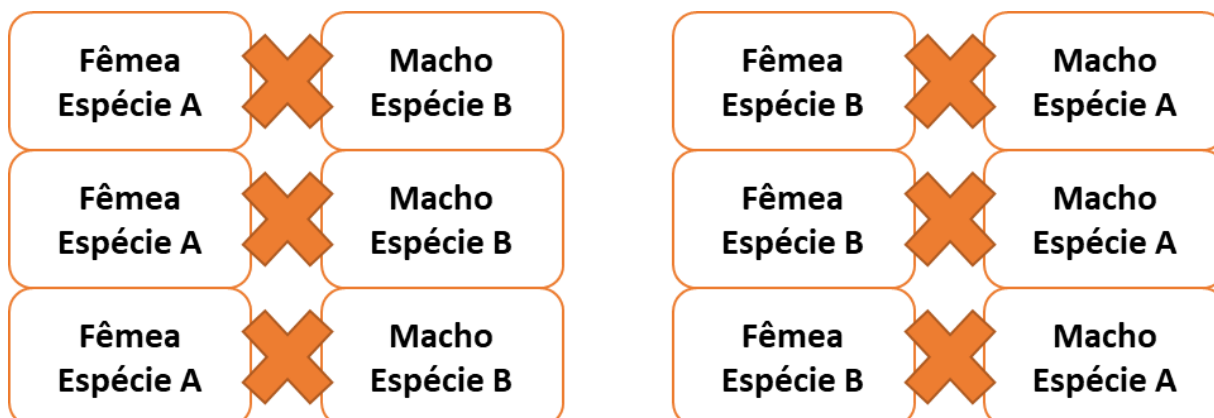
3.2 Cruzamentos interespecíficos

Foram montados os seguintes cruzamentos experimentais para avaliação das barreiras reprodutivas:

- *P. megistus* x *T. tibiamaculata*
- *P. lignarius* x *T. tibiamaculata*
- *P. lignarius* x *P. megistus*
- *N. confusa* x *T. tibimaculata*
- *N. confusa* x *P. lignarius*

Para cada par de espécies foram montados seis casais, sendo três de cada cruzamento recíproco [(macho spA x fêmea spB) e (macho spB x fêmea spA)] (Figura 1), totalizando 30 cruzamentos interespecíficos. As fêmeas foram separadas ainda em estágio de ninfas de quinto instar para garantir a virgindade, pois os triatomíneos só atingem a maturidade sexual após a muda imaginal.

Figura 1 – Esquema da montagem dos casais utilizados em cada cruzamento interespecífico.



Fonte: Elaborado pelo autor

Cada casal foi mantido em um recipiente separado (Figura 2), de acordo com Belisário e colaboradores (2007), com fundo de papel jornal para absorção das fezes dos insetos.

Figura 2 - Fotografia do recipiente onde cada casal foi mantido durante o experimento.



Fonte: Foto registrada pelo autor

3.2 Manutenção das colônias

Semanalmente, cada casal foi alimentado por 30 minutos e os ovos foram contabilizados e separados. O fundo de jornal era trocado a cada quinze dias para evitar acúmulo de fezes dos insetos. Cada cruzamento foi mantido por quatro meses e ao final do experimento avaliou-se a taxa de eclosão de ovos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados serão apresentados a seguir na forma de manuscrito.

4.1 Capítulo 1 – Trends in Evolution of the Triatomini tribe (Hemiptera, Triatominae): genetic incompatibility in the *geniculatus* clade – [artigo a ser submetido para a revista *Scientific Reports* (FI: 4,25)]

Introduction

The triatomines (Hemiptera Triatominae) are insects of great importance to public health, because all 151-living species of the subfamily Triatominae [1-3] are considered as potential vectors of the protozoan *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) etiologic agent of Chagas disease [4]. This disease is neglected, has no cure (being the effective treatment only in the early stages of infection) and reaches about eight million people in the world [5], with 120 million individuals living in areas that are endemic, which increases the risk of infection [6].

Currently, the subfamily Triatominae is divided into 18 genera and five tribes (Alberproseniini, Bolboderini, Cavernicolini, Rhodniini and Triatomini) [7]. The Triatomini tribe is the most numerical (composed of 113 species grouped in ten genera [1-3]) and one of the most important from an epidemiological point of view [8]. Because the two most diverse genera in Triatomini are paraphyletic (*Triatoma* Laporte, 1832 and *Panstrongylus* Berg, 1879) [9], Justi *et al.* [8] divided the tribe into clades, groups, complexes, subcomplexes. Although these species groupings are not formally recognized as taxonomic ranks and, thus, do not necessarily represent natural groups, Justi *et al.* [9] propose that they should be monophyletic.

The clade *geniculatus* (composed of groups *geniculatus* and *megistus* [8]) relates evolutionarily the species of the genus *Panstrongylus* and *Nesotriatoma* Usinger, 1944 with *Triatoma tibiamaculata* (Pinto, 1926) [8, 9]. By means of morphological analyzes, the genus *Panstrongylus* was considered as monophyletic, being initially characterized mainly by the antenniferous tubercles inserted extremely close to anterior border of eyes [10]. However, phylogenetic analyzes have pointed to polyphyly [11] and, more recently, to paraphily of this genus [9, 12, 13]. Besides the phylogenetic relationship, chromosomal data also relate *Panstrongylus* spp., *Nesotriatoma* spp. and *T. tibiamaculata* [14-16].

Morphological data have always been used to easily differentiate *Panstrongylus* and *Triatoma* [10]. However, Justi and Galvão [17] consider that the ease of separating *Panstrongylus* from other Triatomini members using only morphology is a rather intriguing question for the Triatominae systematics, because some *Panstrongylus* populations show variation in eye size according to their habitat, and this variation influences the distances between the antennae and the eyes [18]. Furthermore, *Panstrongylus* species tend to present *Triatoma*-like head shapes during development (when the nymphs exhibit smaller eyes) [18] and North American *Triatoma* may display smaller heads and antennae that are closer to the eyes than their South American counterparts [19].

The taxonomy of *Nesotriatoma* spp. is quite discussed, because some authors consider *Nesotriatoma* as a valid genus [1, 2, 7, 9, 12] and others classify the species of this genus in *Triatoma* [8, 14, 17, 19]. Besides that, a new species [*N. confusa* Oliveira et al. (2018)] has recently been described from specimens that were incorrectly classified as *N. bruneri* Usinger, 1944 [2]. Phylogenetic studies indicate the validity of the genus *Nesotriatoma* and demonstrate that this genus is closer to

Panstrongylus spp. than that of *Triatoma* spp. (with the exception of *T. tibiamaculata*) [9]. Molecular data associated with geological events suggest that possibly the ancestor of *Nesotriatoma* spp. reached the Antilles associated with rodent subfamily Capromyinae (about approximately 14.8-18.8 Ma) [8].

Justi *et al.* [8] reported that the ancestral population of *geniculatus* clade was initially distributed along the old connection between the Amazonian Forest and the Atlantic Forest and with the climatic changes caused by the Andean uplift, this connection disappeared, leaving the dry corridor and acting as a vicariant event that originated the species we now know as *T. tibiamaculata* and *P. megistus* (Burmeister, 1835). Even if both species present morphological characters that confirm the grouping in their specific genus [10], all molecular analyzes performed confirm that these species are sister taxa [8, 9, 12, 13], which led some authors to suggest the need to change the genus of *T. tibiamaculata* to *Panstrongylus* (*P. tibiamaculata*) [13].

Based on the complex evolutionary history of the *geniculatus* clade and taking into account that studies of hybridization can help to understand the 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 [20, 21], we consider that performing experimental crosses can help elucidate the taxonomic and evolutionary issues of this grouping of vectors.

Materials and Methods

In order to evaluate the genetic and reproductive compatibility [22] between the species of the *geniculatus* clade, reciprocal crossing experiments were conducted among species of the genus *Panstrongylus*, *Nesotriatoma* and *T. tibiamaculata* (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.* [23] and Mendonça *et al.* [24]: the insects were sexed as 5th instar nymphs [25], and males and females were kept separately until they reached the adult stage in order to cross adult virgins [26]. 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, intraspecific crosses were also performed for control. The eggs were collected weekly throughout the females' oviposition periods and the egg fertility rate was calculated.

To ensure that interspecific copulations occurred, after the end of the experimental crosses the spermathecae were dissected and slides were prepared by cell crushing, staining with Lacto-acetic orcein (De Vaio *et al.* [27] with modifications according to Alevi *et al.* [28]) and analyzed using a Jenaval light microscope (Zeiss) to verify the presence of spermatozoa.

Results and Discussion

Although natural hybrids have been reported for the Triatominae subfamily [29, 30], these organisms have never been observed among members of the *geniculatus* clade. Our results demonstrate that all the experimental crosses presented a pre-zygote isolation barrier regardless of the combination (intrageneric

or intergeneric crossing) (Table 1), justifying, in this way, the absence of possible reports of natural hybrids for the *geniculatus* clade.

Absence of hybrids between *P. megistus* and other species of *geniculatus* clade is acceptable, mainly because this species presents a karyotype ($2n = 21$) [31] different from the other species of *Panstrongylus* ($2n = 23$) [31] of *Nesotriatoma* spp. ($2n = 23$) [31] and *T. tibiamaculata* ($2n = 23$) [31] and the number of chromosomes is one of the main barriers of reproductive isolation for Triatomini tribe (personal communication). However, the absence of hybrids among the other crosses (Table 1) is an interesting and intriguing result for Triatomini tribe evolutionary studies, since experimental hybrids have already been observed for species that did not derive from an ancestor (for example, *T. infestans* (Klug, 1834) x *T. rubrovaria* (Blanchard, 1843), *T. maculata* (Erichson, 1848) x *T. sordida* (Stål, 1859), *T. maculata* x *T. infestans* and *T. maculata* x *T. brasiliensis* Neiva, 1911 and *T. pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964 x *T. infestans* [32]).

Justi *et al.* [8] suggest that events of vicariancy were the main evolutionary mechanisms that acted in the diversification of the *geniculatus* clade species. The main mechanisms of reproductive isolation reported for the Triatominae subfamily were ecological isolation and mechanical isolation [33]. The presence of interspecific mating (Figure 1), as well as of the spermatozoa observed in the spermathecae of all females confirms the interspecific mating and discards the presence of mechanical barrier. Based on this, we believe that during the divergence of species of the *geniculatus* clade from the common ancestor, the different selective pressures and the absence of gene flow (by geographical barriers [8]) led to events of genomic reorganization that did not numerically alter the chromosomes (with the exception of

P. megistus), resulting in genomic incompatibility and total reproductive isolation among the taxa of this clade.

T. tibiamaculata, *T. vitticeps* (Stål, 1859) and *T. melanocephala* Neiva & Pinto, 1923 are the only species of South America *Triatoma* that present a different karyotype of $2n = 22$ [34]. Recently Alevi *et al.* [35] grouped *T. vitticeps* and *T. melanocephala* into a new monophyly subcomplex (*vitticeps* subcomplex) and demonstrated that this subcomplex can be differentiated from all the others present in South America by the number of chromosomes ($2n = 24$). As already mentioned, *T. tibiamaculata* is more evolutionarily close to *Panstrongylus* spp. and *Nesotriatoma* spp. than with *Triatoma* spp., positioning itself as a sister taxon of *P. megistus* [8, 9, 13]. Although pre-zygotic barriers have been observed between *T. tibiamaculata* and *Panstrongylus* spp. (Table 1), the different evidences [8, 9, 13, 14, 16, 36] strongly suggest that *T. tibiamaculata* is classified in the wrong genus and is a *Panstrongylus* which has undergone evolutionary convergence of morphological characteristics [9] and is reproductively isolated from other species of the genus [as also observed for *P. megistus* and *P. lignarius* (Walker, 1873)].

The position of *Nesotriatoma* spp. in the clade *geniculatus* is also a quite an intriguing question from an evolutionary point of view and leads us to question whether *Nesotriatoma* also would not be *Panstrongylus* with homoplasy from evolutionary convergence (as suggested for *T. tibiamaculata* [9]), because there are cytogenetic evidences that confirm this relationship [14,15]. Experimental crosses also demonstrated reproductive isolation between *Nesotriatoma* and *geniculatus* clade species (Table 1), which may be due to the observed geographic isolation between these species [37], highlighting the need to combine different approaches (such as molecular clocks, phylogeography and genomic studies) to understand the

evolutionary processes of this important group of vectors. If it is confirmed that all *geniculatus* clade species are really of a single genus (probably *Panstrongylus*) with convergence in morphological characteristics, once again this will show how the taxonomy based only on morphological data can lead to the mistaken grouping of Triatominae species (as recently suggested by Monteiro *et al.* [38]).

Thus, our results demonstrate that different from the other groups of the tribe Triatomini [32] as well as the Rhodniini tribe (personal communication), there are barriers of pre-zygotic reproductive isolation that prevent the formation of hybrids in all directions of the crosses (intrageneric and intergeneric) for the *geniculatus* clade, confirming thus the specific status of all species. Based on these results, we suggest that the *geniculatus* clade may represent an important evolutionary model for Triatominae, highlighting the need for new taxonomic and evolutionary studies with greater sample effort of the *geniculatus* clade (grouping the 15 species of *Panstrongylus* [1], the three of *Nesotriatoma* [1, 2] and *T. tibiamaculata*).

References

1. 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.
2. 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.

3. 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, in press.
4. Chagas C. Nova tripanossomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruz* n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1909; 1: 159-218.
5. 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)).
6. Rassi A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. Lancet. 2010; 375: 1388–1402.
7. Galvão C. Vetores da doença de Chagas no Brasil. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, Brasil; 2014.
8. 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.
9. Justi SA, Russo CAM, dos Santos-Mallet JR, Obara MT, Galvão C. Molecular phylogeny of Triatomini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Parasit Vectors. 2014; 7: 149.
10. 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.

11. Marcilla A, Bargues MD, Abad-Franch F, Panzera F, Carcavallo RU, Noireau F, Galvão C, Jurberg J, Miles MA, Dujardin JP, Mas-Coma S. Nuclear rDNA ITS-2 sequences reveal polyphyly of *Panstrongylus* species (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), vectors of *Trypanosoma cruzi*. *Inf Gen Evol.* 2002; 1: 225–235
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. Gardim S, Almeida CE, Takiya DM, Oliveira J, Araújo RF, Cicarelli RMB, Rosa JA. Multiple mitochondrial genes of some sylvatic Brazilian *Triatoma*: Non-monophyly of the *T. brasiliensis* subcomplex and the need for a generic revision in the Triatomini. *Inf Gen Evol.* 2014; 23: 74–79.
14. Panzera Y, Pita S, Ferreiro MJ, Ferrandis I, Lages C, Perez R, Silva AE, Guerra M, Panzera F. High dynamics of rDNA cluster location in kissing bug holocentric chromosomes (Triatominae, Heteroptera). *Cytogenet Genome Res.* 2012; 138: 56-67.
15. Borsatto KC, Reis YV, Moreira FFF, Azeredo-Oliveira MTV, Alevi KCC. New evidence of the evolutionary relationship of the *flavida* complex with the genus *Panstrongylus* (Hemiptera, Triatominae) by karyosystematic. *Braz J Biol.* 2018, DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.176421>.
16. Alevi KCC, Oliveira J, Rosa JA, Azeredo-Oliveira MTV. Karyotype Evolution of Chagas Disease Vectors (Hemiptera, Triatominae). *Am J Trop Med Hyg.* 2018; 99: 87-89.

17. Justi S, Galvão C. The evolutionary origin of diversity in Chagas disease vectors. *Trends Parasitol.* 2017; 33: 42-52.
18. Patterson JS, Barbosa SE, Feliciangeli MD. On the genus *Panstrongylus* Berg 1879: evolution, ecology and epidemiological significance. *Acta Trop.* 2009; 110: 187-199.
19. Schofield CJ, Galvão C: Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Trop.* 2009; 110: 88-100.
20. Arnold ML. Natural Hybridization and Evolution. Oxford: University Press; 1997.
21. 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.
22. Mayr E. Populações, Espécies e Evolução, São Paulo: Editora Nacional, 1963.
23. Costa J, Almeida CE, Dujardin JP, Beard CB. Crossing experiments detect genetic incompatibility among populations of *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Heteroptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003; 98: 637-639.
24. 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.
25. 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.

26. 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.
27. De Vaio ES, Grucci B, Castagnino AM, Franca ME, Martinez ME. Meiotic differences between three triatomine species (Hemiptera: Reduviidae). *Genetica.* 1985; 67: 185-191.
28. Alevi KCC, Mendonça PP, Pereira NP, Rosa JA, Azeredo-Oliveira MTV. Karyotype of *Triatoma melanocephala* Neiva and Pinto (1923). Does this species fit in the Brasiliensis subcomplex? *Inf Gen Evol* 2012; 12: 1652-1653.
29. Abalos JW. Sobre híbridos naturales y experimentales de *Triatoma*. *An Inst Reg.* 1948; 2: 209-223.
30. Martínez-Ibarra JA, Morales-Corona ZY, Moreno-Ruiz MG, Del Riego-Ruiz R, Mundo-Barajas MA. Híbridos naturales y fértiles entre especies del complejo *Meccus phyllosomus* (Hemiptera: Reduviidae) en Jalisco, México. *Entomol Soc Mex.* 2005; 4: 734-738.
31. Alevi KCC, Moreira FFF, Jurberg J, Azeredo-Oliveira MTV. Description of the diploid chromosome set of *Triatoma pintodiasi* (Hemiptera, Triatominae). *Genet Mol Res.* 2015; 15: gmr.15026343.
32. Carcavallo RU, Girón IG, Jurberg J, Galvao C, Noireau F, Canale D: Mutations, Hybrids and Teratologies. *Atlas of Chagas Disease Vectors in the Americas.* Edited by: Editora FIOCRUZ. Carcavallo, Girón, Jurberg, Lent, Rio de Janeiro. 1998; 515-536.

33. Usinger RL, Wygodzinsky P, Ryckman RE. The biosystematics of Triatominae. *Annu Rev Entomol.* 1966; 11; 309-330.
34. Alevi KCC, Oliveira J, Rosa JA, Azeredo-Oliveira MTV. Karyotype Evolution of Chagas Disease Vectors (Hemiptera, Triatominae). *Am J Trop Med Hyg.* 2018; doi: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0166>.
35. Alevi KCC, Oliveira J, Azeredo-Oliveira MTV, Rosa JA. *Triatoma vitticeps* subcomplex (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae): a new grouping of Chagas disease vectors from South America. *Parasit Vectors.* 2017; 10: 180.
36. Nascimento JD, Ribeiro AR, Almeida LA, Oliveira J, Mendonça VJ, Cilense M, Rosa JA. Morphology of the spermathecae of twelve species of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) vectors of Chagas disease. *Acta Trop.* 2017; 176: 440-445.
37. Galvão C, Carvalho RU, Rocha DS, Juberg J. A check-list of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa.* 2003; 2002: 1-36.
38. Monteiro FA, Weirauch C, Felix M, Lazoski C, Abad-Franch F. Evolution, Systematics, and Biogeography of the Triatominae, Vectors of Chagas Disease. *Adv Parasitol.* 2018; 2018; 99:265-344.

Table 1. Experimental crosses performed between *geniculatus* clade species. C1, C2 and C3, represents the replicates of each crossing.

Crossing experiments	Number of eggs				Egg Fertility
	C1	C2	C3	Total	
<i>P. megistus</i> ♀ x <i>P. lignarius</i> ♂	62	74	21	157	0%
<i>P. lignarius</i> ♀ x <i>P. megistus</i> ♂	125	345	53	523	0%
<i>P. megistus</i> ♀ x <i>T. tibiamaculata</i> ♂	35	40	32	107	0%
<i>T. tibiamaculata</i> ♀ x <i>P. megistus</i> ♂	88	87	90	265	0%
<i>T. tibiamaculata</i> ♀ x <i>P. lignarius</i> ♂	14	31	23	68	0%
<i>P. lignarius</i> ♀ x <i>T. tibiamaculata</i> ♂	206	299	41	546	0%
<i>T. tibiamaculata</i> ♀ x <i>N. confusa</i> ♂	65	47	52	164	0%
<i>N. confusa</i> ♀ x <i>T. tibiamaculata</i> ♂	32	43	36	111	0%
<i>P. lignarius</i> ♀ x <i>N. confusa</i> ♂	44	37	41	122	0%
<i>N. confusa</i> ♀ x <i>P. lignarius</i> ♂	51	42	37	130	0%

Figure 1. Example of interspecific crosses in *geniculatus* clade: *T. tibiamaculata* ♀ x *P. lignarius* ♂ (A).



5 CONCLUSÕES

Esses resultados nos mostram que, diferente do relatado para outros grupos da tribo Triatomini (CARCAVALLO *et al.*, 1998), existem barreiras reprodutivas pré-zigóticas entre as espécies avaliadas do clado *geniculatus* que impedem a formação de híbridos em todos os cruzamentos, independente da direção, confirmando também o *status* específico desses táxons. Sendo assim, consideramos, que mesmo que essas espécies se encontrem no futuro, devido às mudanças ambientais, as fortes barreiras reprodutivas impedirão a produção de híbridos entre elas. Além disso, sugerimos que esse grupo possa representar um importante modelo para estudos evolutivos na subfamília Triatominae e ressaltamos a importância de novas análises, taxonômicas e evolutivas, com maior esforço amostral do clado *geniculatus*.

REFERÊNCIAS

- ALEVI, K. C. C. *et al.* Homogeneidade cromossômica em diferentes populações de *Panstrongylus megistus* do Brasil. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, 2015, 36(2): 307-310.
- ALEVI, K. C. C. *et al.* Karyosystematic and karyotype evolution of *Panstrongylus lutzi* (Neiva & Pinto, 1923) (Hemiptera, Triatominae). **Brazilian Journal of Biology**, 2018, 78(1):180-182. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.166442>
- ALEVI, K. C. C. *et al.* Would *Nesotriatoma bruneri* Usinger, 1944 be a valid species? **Zootaxa**, 2016, vol. 4103, pp. 396–400.
- BELISÁRIO, C. J.; PESSOA, G. C. D.; DIOTAIUTI, L. Biological aspects of crosses between *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) and *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964 (Hemiptera: Reduviidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2007, 102: 517-521.
- BORSATTO, K. C. *et al.* New evidence of the evolutionary relationship of the *flavida* complex with the genus *Panstrongylus* (Hemiptera, Triatominae) by karyosystematic. **Brazilian Journal of Biology**, 2018, 78.
- CARCAVALLO R. U. *et al.* Mutations, Hybrids and Teratologies. *In*: CARCAVALLO, R. U. *et al.* (Org). **Atlas of Chagas Disease Vectors in the Americas**. Editora FIOCRUZ. Rio de Janeiro, 1998, 515-536.
- CORREIA, N. *et al.* Crossing experiments confirm *T. sherlocki* as a member of the *Triatoma brasiliensis* species complex. **Acta Tropica**, 2013, 128: 162-167.
- COSTA, J. *et al.* Crossing Experiments Detect Genetic Incompatibility among Populations of *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Heteroptera, Reduviidae, Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2003, 98: 637-639.
- 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**, 2009, 9: 263-270.
- CROSSA, R. P. *et al.* Chromosomal evolution trends of the genus *Panstrongylus* (Hemiptera, Reduviidae), vectors of Chagas disease. **Infection, Genetics and Evolution**, 2002, 2, 47–56.

DOBZHANSKY, Theodosius. Nothing in Biology Makes Sense except in the Light of Evolution. **The American Biology Teacher**, 1973, Vol. 35, No. 3, pp. 125-129.

DORN, P. L. *et al.* Description of *Triatoma mopan* sp. n. from a cave in Belize (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **ZooKeys**, 2018, 775: 69-95. DOI: <https://doi.org/10.3897/zookeys.775.22553>

DUJARDIN, J. P.; SCHOFIELD, C. J.; PANZERA, F. Los vectores de la enfermedad de Chagas. **Royal Academy for Overseas Sciences**, Brussels, Belgium, 2002.

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

FABRE, P. *et al.* Rodents of the Caribbean: origin and diversification of hutias unravelled by next-generation museomics Rodents of the Caribbean: origin and diversification of hutias unravelled by next-generation museomics. **Biology Letters**, 2014; 10: 2014. 266. DOI: <https://doi.org/10.1098/rsbl.2014.0266>.

GALVÃO, Cleber (Org). **Vetores da doença de chagas no Brasil**. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014, 289p.

GARCÍA, M. *et al.* Reproductive isolation revealed in preliminary crossbreeding experiments using field collected *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) from three ITS-2 defined groups. **Acta Tropica**, 2013, 128: 714–718.

JUSTI, S.; GALVÃO, C.; SCHRAGO, C. G. Geological changes of the Americas and their influence on the diversification of the Neotropical kissing bugs (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **PLOS Neglected Tropical Disease**, 2016; 10(4): e0004527.

JUSTI, Silvia; GALVÃO, Cleber. The evolutionary origin of diversity in Chagas disease vectors. **Trends in Parasitology**, 2017; 33: 42-52.

LAMB, Trip; AVISE, John. Directional introgression of mitochondrial DNA in a hybrid population of tree frogs: The influence of mating behavior. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, 1986 [s.l.], v. 83, n. 8, p.2526-2530. DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.83.8.2526>.

LENT, Herman; WYGODZINSKY, Pedro. Revision of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) and their significance as vector of Chagas's disease. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, 1979, 163: 123-520.

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

MARTÍNEZ-IBARRA, J. A. *et al.* Biological and genetic aspects of crosses between phylogenetically close species of Mexican Triatomines (Hemiptera: Reduviidae). **Journal of Medical Entomology**, 2011, 48: 705-707.

MARTÍNEZ-IBARRA, J. A. *et al.* Biological and genetic aspects of experimental hybrids from species of the *Phyllosoma* complex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2008, 103: 236-243.

MARTÍNEZ-IBARRA, J. A. *et al.* 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**, 2016 [s.l.], v. 69, n. 3, p.202-206. DOI: <http://dx.doi.org/10.7883/yoken.jjid2015.111>

MENDONÇA, V. J. *et al.* Cytogenetic and morphologic approaches of hybrids from experimental crosses between *Triatoma lenti* Sherlock & Serafim, 1967 and *T. sherlocki* Papa *et al.*, 2002 (Hemiptera: Reduviidae). **Infection, Genetics and Evolution**, 2014, 26: 123-131.

MENDONÇA, V. J. *et al.* Revalidation of *Triatoma bahiensis* Sherlock & Serafim, 1967 (Hemiptera: Reduviidae) and phylogeny of the *T. brasiliensis* species complex. **Zootaxa**, 2016, 4107: 239-254.

NASCIMENTO, J. D. *et al.* Morphology of the spermathecae of twelve species of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) vectors of Chagas disease. **Acta Tropica**, 2017, [s.l.], v. 176, p.440-445.

NOIREAU, F.; DIOSQUE, P.; JANSEN, A. M. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. **Veterinary Research**, 2009, 40(2): 26.

OLIVEIRA, J. *et al.* Combined phylogenetic and morphometric information to delimit and unify the *Triatoma brasiliensis* species complex and the Brasiliensis subcomplex. **Acta Tropica**, 2017, [s.l.], v. 170, p.140-148.

OLIVEIRA, J. *et al.* Description of a new species of *Nesotriatoma* Usinger, 1944 from Cuba and revalidation of synonymy between *Nesotriatoma bruneri* (Usinger, 1944) and *N. flavida* (Neiva, 1911) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Journal of Vector Ecology**, 2018, 43: 148-157.

OLIVEIRA, Jader; ALEVI, Kaio Cesar Chaboli. Taxonomic status of *Panstrongylus herreri* Wygodzinsky, 1948 and the number of Chagas disease vectors. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2017; 50: 434-435.

PANZERA F. *et al.* Chromosome numbers in the Triatominae (Hemiptera-Reduviidae): a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 1996, v. 91, n. 4, p. 515-518.

PANZERA, Y. *et al.* High dynamics of rDNA cluster location in kissing bug holocentric chromosomes (Triatominae, Heteroptera). **Cytogenetic and Genome Research**, 2012; 138: 56-67.

PESSOA, G. C. D. *et al.* History of insecticide resistance of Triatominae vectors. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2015, [s.l.], v. 48, n. 4, p.380-389. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0081-2015>.

POINAR, George. A primitive triatomine bug, *Paleotriatoma metaxytaxa* gen. et sp. nov. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), in mid-Cretaceous amber from northern Myanmar. **Cretaceous Research**, 2019, v. 93, p 90-97.

REIS, Y. V. *et al.* Spermatogenesis in *Nesotriatoma bruneri* (Usinger 1944) (Hemiptera, Triatominae). **Genetics and Molecular Research**, 2016, 19;15(3). <http://dx.doi.org/10.4238/gmr.15038286>

RHYMER, Judith; SIMBERLOFF, Daniel. Extinction by Hybridization and Introgression. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Vol. 27, 1996, pp. 83-109.

ROSA, J. A; BARATA, J. M, S; BARELLI, N. Morphology of abdominal bristles determined by scanning electron microscopy in six species of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 1995, 90: 487-488.

ROSA, J. A. *et al.* A new species of *Rhodnius* from Brazil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **ZooKeys**, 2017, 675: 1-25. DOI: <https://doi.org/10.3897/zookeys.675.12024>

SANTOS, S. M. *et al.* New sex-determination system in the genus *Panstrongylus* (Hemiptera: Reduviidae) revealed by chromosomal analysis of *Panstrongylus lutzi*. **Parasites and Vectors**, 2016, 9:295.

SCHOFIELD, Christopher John; GALVÃO, Cleber. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. **Acta Tropica**, 2009; 110: 88-100.

SEVERI-AGUIAR, Grasiela Dias de Campos; AZEREDO-OLIVEIRA, Maria Tercília Vilela. Cytogenetic study of holocentric chromosomes in three species of Triatomines (Heteroptera, Reduviidae). **Cytologia**, 2004, v. 69, n. 1, p. 53-57.