



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Análisis filogenético de la especie *Triatoma sanguisuga*: vector de la enfermedad de Chagas

Bruno Augustín Sansoni Ruidíaz

Orientador: Dr. Sebastián Pita Mimbacas

Sección Genética Evolutiva, Facultad de Ciencias,
Universidad de la República (UdelaR)
Montevideo, Uruguay

Dedicado a mis abuelos María y Leonel.

Agradecimientos

Quiero agradecer en principio a mi familia, que desde siempre me ha inculcado la valoración inquebrantable por el trabajo y el esfuerzo, al mismo tiempo que me animó a la persecución constante del conocimiento al servicio del crecimiento personal y colectivo. En especial, quiero agradecer a mi madre, que con un amor y determinación incalculables, ha sido el principal motor de mi progreso en cualquier dirección.

A mi novia, Amira, a quién agradezco su apoyo y comprensión, su tiempo y espacio. A su familia, que también han sabido acompañarme en este camino.

A mis amigos, que me bancaron siempre y celebraron conmigo hasta la más mínima conquista y pusieron su hombro hasta en la peor de las derrotas. Mención especial a Pía, Pablo y Cami, que me han acompañado casi desde el principio y con los que formamos una alianza sólida, compartiendo una multitud de cosas dentro y fuera de la Facultad. También a Rodrigo, porque me lo pidió.

A mis compañeros TAS de FCien. Fuente inagotable de risas y delirios, pero también de ánimo y consuelo en todo momento.

A Seba, mi tutor, que ha sido mucho más que un mentor. Su dedicación y su disponibilidad, y su experiencia son una pieza fundamental en mi crecimiento. Una persona capaz de hacerme sentir un socio además de un aprendiz.

A la gente de la Sección Genética Evolutiva, por compartir instalaciones, materiales y consejos. A Néstor, Ana, Sofía y Magui, a Gabriela, a Emma y Joaco.

A los profesores Gabriel Hamer, Ph.D., del Departamento de Entomología de la Universidad A&M de Texas, Sarah A. Hamer, Ph.D., del Departamento de Biociencias Integrativas Veterinarias de la Universidad A&M de Texas, y Norman Beatty, MD, de la División de Enfermedades Infecciosas y Medicina Global de la Universidad de Florida, por proporcionarme los elementos con los cuales pude realizar mi trabajo final. Sin su colaboración, este trabajo no habría sido posible.

Al tribunal evaluador, por su tiempo y disposición en épocas complicadas.

Finalmente, a la Facultad de Ciencias, semillero de grandes investigadores y docentes que han sentado las bases sobre las cuales podemos pararnos miles de estudiantes determinados a perseguir una carrera científica de calidad.

Índice

Agradecimientos	3
Resumen	6
Introducción	7
Enfermedad de Chagas.....	7
Importancia sanitaria de la enfermedad de Chagas.....	7
Transmisión y ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	8
Vectores de la enfermedad y epidemiología.....	11
Triatoma sanguisuga, vector de la enfermedad de Chagas en Estados Unidos..	13
Dificultades en la taxonomía de Triatomíneos.....	18
Antecedentes en el estudio filogenético de Triatoma sanguisuga.....	19
Objetivos	22
Objetivo general.....	22
Objetivos específicos.....	22
Materiales y métodos	23
Extracción de ADN.....	24
Cuantificación y evaluación de la calidad del ADN.....	25
Amplificación por Polymerase Chain Reaction (PCR) del Cytb.....	26
Secuenciación de los productos de PCR.....	27
Análisis filogenético y diversidad genética.....	28
Resultados	30
Jerarquización e inferencia bayesiana.....	30
Inferencia por máxima verosimilitud.....	33
Inferencia por máxima parsimonia.....	35
Diversidad genética.....	35
Red de haplotipos.....	38
Discusión	40
Conclusiones	49
Perspectivas	50
Anexos	51
Bibliografía	57

Resumen

Los Triatomíneos son insectos hematófagos vectores de *Trypanosoma cruzi*, el agente causante de la enfermedad de Chagas. Esta subfamilia comprende más de 150 especies, de las cuales más de 130 se encuentran en las Américas. Estos se encuentran en una diversidad de hábitats, entre los cuales encontramos el ambiente doméstico y peridoméstico y se alimentan de una amplia variedad de hospederos. La especie norteamericana *Triatoma sanguisuga* es la especie con mayor distribución geográfica en los Estados Unidos, habitando gran parte de la región sureste del país y ha sido asociada a una variada cantidad de microhábitats y hospederos. Se ha detectado en ella una alta prevalencia de *T. cruzi* en ejemplares a lo largo de toda su distribución y ha sido directamente asociada a al menos dos de los siete casos de transmisión autóctona de *T. cruzi* en Estados Unidos.

A pesar de la importancia de esta especie como vector de la enfermedad de Chagas y su amplia distribución, solamente un único estudio filogenético fue llevado a cabo con 54 especímenes del estado de Louisiana. Para lograr una mejor comprensión de la variabilidad genética de la especie, tomamos todas las secuencias disponibles en GenBank del gen mitocondrial *citocromo b* (*cytb*), e incorporamos ejemplares adicionales de *T. sanguisuga* de los estados de Texas, Mississippi, Alabama, Tennessee, Virginia Occidental y Florida. Se realizaron extracciones de ADN a 41 individuos, para la posterior amplificación por PCR del *cytb*. Asimismo, fueron incorporadas al análisis otras secuencias del *cytb* identificadas como *Triatoma indictiva* y *Triatoma sp.*, disponibles en GenBank, con alta identidad a las secuencias de *T. sanguisuga*.

El análisis realizado a partir de un fragmento de 453 pb del *cytb*, mostró una alta diversidad genética de *T. sanguisuga*, con una fuerte estructuración poblacional que define cuatro grupos bien distinguidos entre sí. Uno de los grupos comprende ejemplares exclusivamente de Florida y presenta valores de distancia genética altos, que exceden a los consensuados como esperados dentro de una misma especie en Triatomíneos. Se trata de la primera evidencia molecular de una posible nueva especie hermana de *T. sanguisuga*. Además, el análisis indicó que los individuos identificados como *T. indictiva* en GenBank son, en realidad, ejemplares de *T. sanguisuga*, sugiriendo una posible identificación morfológica errónea de estos ejemplares y la necesidad de revisar su taxonomía.

Introducción

Enfermedad de Chagas

La tripanosomiasis americana, conocida popularmente como enfermedad de Chagas, es una afección potencialmente mortal causada por la infección del parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*. La enfermedad fue descrita por primera vez en 1909 por el médico sanitarista Dr. Carlos Ribeiro Justiniano Das Chagas, el cual se desempeñaba en el Instituto Bacteriológico de Manguinhos (hoy Instituto Oswaldo Cruz) de Río de Janeiro, Brasil (Chagas, 1909). Esta enfermedad presenta una fase aguda y una fase crónica. La fase aguda, ocurre inmediatamente después de la infección, puede durar entre 4 y 8 semanas y durante ésta podemos encontrar parásitos en el torrente sanguíneo. Generalmente es asintomática o presenta síntomas leves como fiebre moderada y rara vez se produce la muerte del individuo en esta fase. Entre un 60 y un 70% de los individuos infectados no llega a desarrollar la enfermedad de manera aparente en términos clínicos, lo que se conoce como fase crónica indeterminada. Dentro del 30 al 40% restante, se desarrollará alguna forma determinada de la fase crónica, entre 10 y 30 años después de la infección. Quienes desarrollan la fase crónica determinada, enfrentan problemas médicos tales como megaesófago y megacolon (digestivos), arritmias cardíacas, tromboembolismo, falla cardíaca y muerte súbita (problemas cardiocirculatorios). La principal causa de muerte de esta enfermedad es la muerte súbita, seguida de la falla cardíaca refractaria y el tromboembolismo (Rassi et al., 2010).

Importancia sanitaria de la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas es una de las enfermedades endémicas de Latinoamérica y el Caribe más determinantes en términos sanitarios y económicos en dicha región. Según la Organización Mundial de la Salud (WHO), se trata de una de las 17 enfermedades tropicales desatendidas, una lista de afecciones humanas elegidas en base a su impacto adverso, relativo desconocimiento y escasa disponibilidad de herramientas para su combate (WHO, 2010). Afecta aproximadamente a 6 millones de personas a través de 21 países del continente

americano y alrededor del 13% de la población latinoamericana se encuentra bajo riesgo de infección por transmisión activa del parásito en el ámbito doméstico (WHO, 2015). Se estima que esta afección es responsable de unas 12 500 muertes anuales (Moncayo y Silveira, 2009) y en 2010 causó entre 274 000 y 1 069 000 de años de vida ajustados por discapacidad (AVAD) (Murray et al., 2012), una medida que captura tanto mortalidad prematura como pérdida de salud no fatal. Desde el punto de vista económico, se ha estimado por métodos computacionales que esta enfermedad podría llegar a tener un impacto a nivel global de U\$S 627 500 000 en costos anuales de atención médica y más de U\$S 800 000 en AVAD, brindando un argumento extra al momento de prestar atención a esta enfermedad que ha sido históricamente descuidada (Lee et al., 2013).

La enfermedad de Chagas afecta principalmente áreas rurales con altos índices de pobreza, donde los pobladores están más expuestos a las picaduras de vectores debido a la precariedad de sus viviendas. La mayor prevalencia de la enfermedad se observa en Bolivia, Argentina, Paraguay, Ecuador, El Salvador y Guatemala; sin embargo, recientemente se ha esparcido la enfermedad a regiones que anteriormente no estaban afectadas, debido a factores como la inmigración, transmisión congénita y donación sanguínea (Pérez-Molina y Molina, 2018). Dadas las tendencias al aumento de la inmigración en las últimas décadas, existen millones de personas de países endémicos para la enfermedad de Chagas que ahora viven en América del Norte, Europa, Australia y Japón, incluyendo miles de personas con infección por *T. cruzi*. La mayoría de los individuos infectados no son conscientes de su estado. Si bien se ha logrado documentar la transmisión congénita, transfusional y/o relacionada con trasplantes en Estados Unidos, España, Canadá y Suiza; la mayoría de las infecciones probablemente pasan desapercibidas (Gascon et al., 2010).

Transmisión y ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

La principal vía de transmisión del parásito *T. cruzi* es vectorial y se da a través de la contaminación con heces de insectos hematófagos pertenecientes a la subfamilia Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), conocidos coloquialmente como “vinchucas” en nuestro país. El parásito se encuentra en las heces del insecto y se transmite al

ser humano cuando éste rasca la picadura y deposita las heces infectadas en la herida, mucosas u ojos (Rassi et al., 2010, Pérez-Molina y Molina, 2018) (Figura 1). Además, se puede transmitir el parásito por consumo de alimentos contaminados con heces del vector, consumo directo del vector y, por último, verticalmente a través de una madre infectada al feto durante el embarazo (Bern et al., 2019). Si bien actualmente el parásito se transmite en mamíferos principalmente a través de los triatominos, numerosos estudios moleculares sugieren que el linaje *T. cruzi* se originó como parásito de murciélagos hace aproximadamente 55-70 millones de años (hipótesis llamada “*bat-seeding*”), (Hamilton y Steves, 2017). Inclusive, hay trabajos que sostienen un origen del linaje aún más antiguo, hace alrededor de 100 millones de años (Tomasini y Diosque, 2015). Este posible origen es más antiguo que la aparición de los triatominos hematófagos, los cuales se habrían originado, según estudios recientes, hace 35-40 millones de años (Monteiro et al., 2018). Asimismo, se planteó la hipótesis de que *T. cruzi* habría coevolucionado, desarrollando adaptaciones para sobrevivir en el tracto digestivo de los triatominos y diversificándose hacia nuevos hospederos, aprovechando la dispersión facilitada por estos insectos (Galvão y Justi, 2015).

El ciclo de vida de *T. cruzi* es complejo, con diferentes formas a lo largo de su desarrollo en vectores y hospederos. Las formas típicas que se han observado en hospederos mamíferos son el tripomastigota (no replicativo) en el torrente sanguíneo y el amastigota (replicativo) intracelular, mientras que las formas epimastigota (replicativa) y tripomastigota metacíclico infectan al vector triatomino (Figura 1). En un principio, se cree que el insecto vector parece no ser afectado por la infección con el parásito (Pérez-Molina y Molina, 2018). No obstante, existe mucha discusión sobre este tema y se ha publicado recientemente evidencia de que la infección por *T. cruzi* reduce la eficacia reproductiva en la especie *Mepraia spinolai* (de Bona et al., 2023).

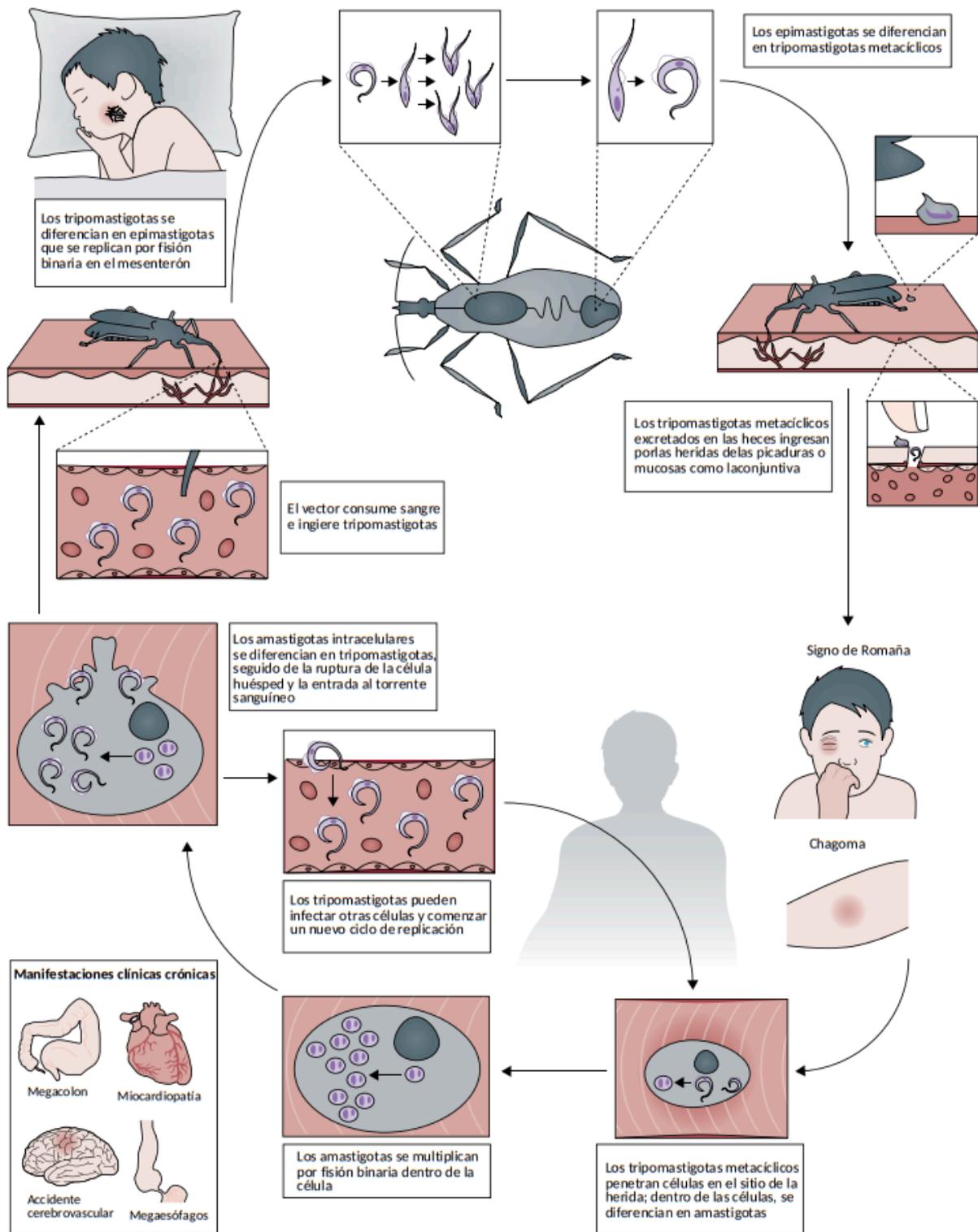


Figura 1. Ciclo de vida de *T. cruzi*. Imagen tomada y adaptada de Pérez-Molina y Molina, 2018

Vectores de la enfermedad y epidemiología

Los triatominos, son insectos hematófagos miembros de la familia principalmente depredadora Reduviidae (Orden Hemiptera). No tienen etapa pupal y su metamorfosis se define como incompleta (insectos hemimetábolos). Tiene cinco etapas inmaduras sucesivas que se asemejan cada vez más al adulto, y las alas rudimentarias solo son aparentes en etapas adultas (insectos exopterigotos). El ciclo está compuesto por huevos, cinco etapas de ninfa, y los imagos macho y hembra. Las ninfas se diferencian de los adultos principalmente por la falta de alas y/o genitales completamente desarrollados. Generalmente, adultos y ninfas ocupan el mismo hábitat y se alimentan de sangre de vertebrados, lo cual significa que tanto las cinco etapas ninfales como los adultos son capaces de infectarse y transmitir (Catalá et al., 2017). La subfamilia Triatominae consta de 153 especies vivas, divididas en cinco tribus: Alberproseniini, Bolboderini, Cavernicolini, Rhodniini y Triatomini, siendo la última la más abundante en riqueza de especies (Galvão, 2021). Casi todas las especies están distribuidas en las Américas, aunque varias de ellas se encuentran en Asia y *Triatoma rubrofasciata* se considera invasora en todo el trópico (Otálora-Luna et al., 2015; Justi et al., 2014; Gil-Santana et al., 2022). En América, más de 130 especies de triatominos tienen el potencial de transmitir el parásito (Monteiro et al., 2018). Sin embargo, solo un subgrupo pequeño de especies es responsable de la mayoría de la transmisión del parásito a humanos: *Triatoma infestans* y *Panstrongylus megistus* en el cono sur, *Triatoma dimidiata* en el sur de México y Centroamérica y *Rhodnius prolixus* en la zona norte de Sudamérica. Debido a su tendencia a colonizar viviendas humanas, son reconocidos como los principales vectores de la enfermedad de Chagas (WHO, 2002).

El entorno doméstico proporciona fuentes abundantes de ingestas de sangre para los triatominos, que incluyen tanto a humanos como a animales. Los triatominos encuentran refugios seguros durante el día en grietas de paredes de adobe, corrales de animales y nidos de aves (WHO, 2002). Independientemente de su sexo, necesitan ingestas de sangre durante cada una de sus cinco etapas de ninfa, y las hembras necesitan comidas de sangre para poner huevos. A medida que envejecen, tanto las ninfas como los adultos, machos y hembras, pueden portar el parásito *T. cruzi*, con tasas de infección que aumentan. Muchas especies de

triatominos silvestres colonizan los nidos de sus hospederos y están estrechamente asociadas con especies de mamíferos como roedores del género *Neotoma* y/o marsupiales del género *Didelphis* (Lent y Wygodzinsky, 1979).

En Estados Unidos, aunque inicialmente se consideraba que la enfermedad de Chagas no era endémica, recientemente se ha demostrado una amplia presencia de *T. cruzi* como enzoótico en diferentes regiones de la mitad sur del país, desde Georgia hasta California (García et al., 2017). Entre 2007 y 2019, un screening de donantes de sangre realizado en la plataforma de la Red de Biovigilancia del Chagas de la *Association for the Advancement of Blood & Biotherapies* (AABB) obtuvo a partir de 15999 donaciones inicialmente reactivas, un total de 2462 donaciones confirmadas positivas para anticuerpos de *T. cruzi* (AABB, 2019). Por otra parte, un informe realizado en 2010 estimó que entre 240 000 y 350 000 personas residentes en Estados Unidos estarían infectadas por *T. cruzi*, basándose en la cantidad de inmigrantes provenientes de países con enfermedad de Chagas endémica y la seroprevalencia esperada en las poblaciones de cada uno de esos países (Manne-Goehler et al., 2016). Hasta el 2007, se habían reportado un total de siete infecciones autóctonas confirmadas de *T. cruzi* mediadas por vector: cuatro en Texas, una en California, otra en Tennessee y una en Louisiana. Sin embargo, a partir del *screening* realizado por la AABB, se publicaron 35 casos positivos adicionales presuntamente mediados por vector y autóctonos en Estados Unidos de *T. cruzi* (Bern et al., 2019). Si bien el riesgo de contagio mediado por vector es bajo, la enfermedad de Chagas está claramente presente en esta región y es plausible considerar que existe un reservorio *T. cruzi* en un ciclo de vida silvestre, habiéndose identificado la prevalencia del patógeno en 26 especies de mamíferos en 15 estados del sudeste estadounidense (Hodo y Hamer, 2017). La prevalencia de *T. cruzi* en mamíferos con estrecha proximidad a seres humanos en ambientes urbanos como mapaches (género *Procyon*) y roedores (suborden *Myomorpha*), así como numerosos reportes de perros (*Canis lupus familiaris*) infectados en diferentes estados del sudeste estadounidense (Bern et al., 2019), brindan evidencia en favor de un posible ciclo peridoméstico mantenido por el parásito en proximidad con humanos.

Triatoma sanguisuga, vector de la enfermedad de Chagas en Estados Unidos

Un total de 11 especies de triatominos han sido reportadas en 27 estados de Estados Unidos: *Triatoma gerstaeckeri*, *Triatoma incrassata*, *Triatoma indictiva*, *Triatoma lecticularia*, *Triatoma neotomae*, *Triatoma protracta*, *Triatoma recurva*, *Triatoma rubida*, *Triatoma rubrofasciata*, *Triatoma sanguisuga* y *Paratriatoma hirsuta* (Figura 2), ocupando aproximadamente dos tercios del territorio estadounidense al sur. Texas y los estados del sudoeste tienen la mayor diversidad de especies de triatominos, con al menos 7 especies en Texas y seis en Arizona (Bern et al., 2019).

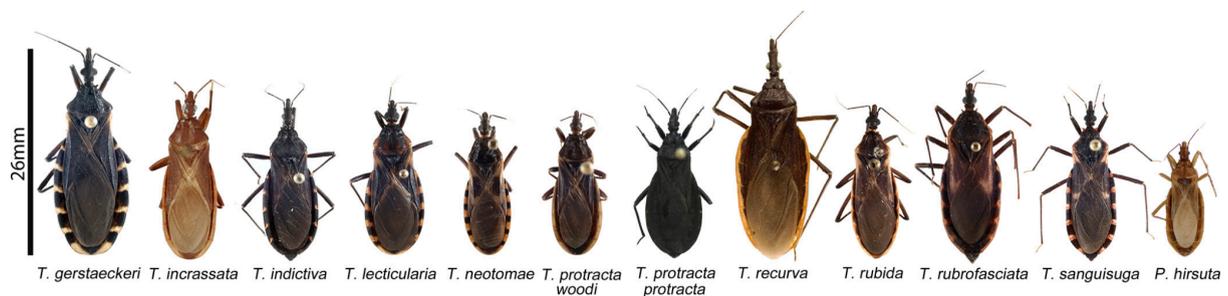


Figura 2. Fotos de especies de triatominos de los géneros *Triatoma* y *Paratriatoma*. Tomada de Bern et al., 2019.

De las once especies, *T. sanguisuga* cuenta con la distribución demográfica más amplia, con presencia en 23 estados al sur de Estados Unidos desde Wyoming hasta la costa este (Bern et al., 2019, Reeves et al., 2020, Nielsen et al., 2021) (Figura 3). Miles de ejemplares de estos insectos han sido colectados en cercanías o dentro de localidades residenciales en las que se reportaron infecciones de *T. cruzi* adquiridas de forma autóctona (Bern et al., 2019, Beatty et al., 2023). La especie *T. sanguisuga* es responsable de al menos dos casos de infección de *T. cruzi* autóctonos descritos en humanos (Dorn et al., 2007; Ochs et al., 1996) y se ha reportado en este vector un considerable consumo de sangre humana además de mamíferos que forman parte del ciclo salvaje de *T. cruzi*, así como una importante prevalencia del parásito en ejemplares colectados en zonas rurales (Waleckx et al., 2014, Cesa et al., 2011, Beatty et al., 2022a). Esta especie es variable en cuanto a tamaño y patrón cromático, y ha presentado algunas dificultades históricas con respecto a su clasificación. En la mayoría de su distribución, los adultos alcanzan o

superan los 20 mm, mientras que en la parte más sureña de Texas y Florida son más pequeños (16-19 mm).

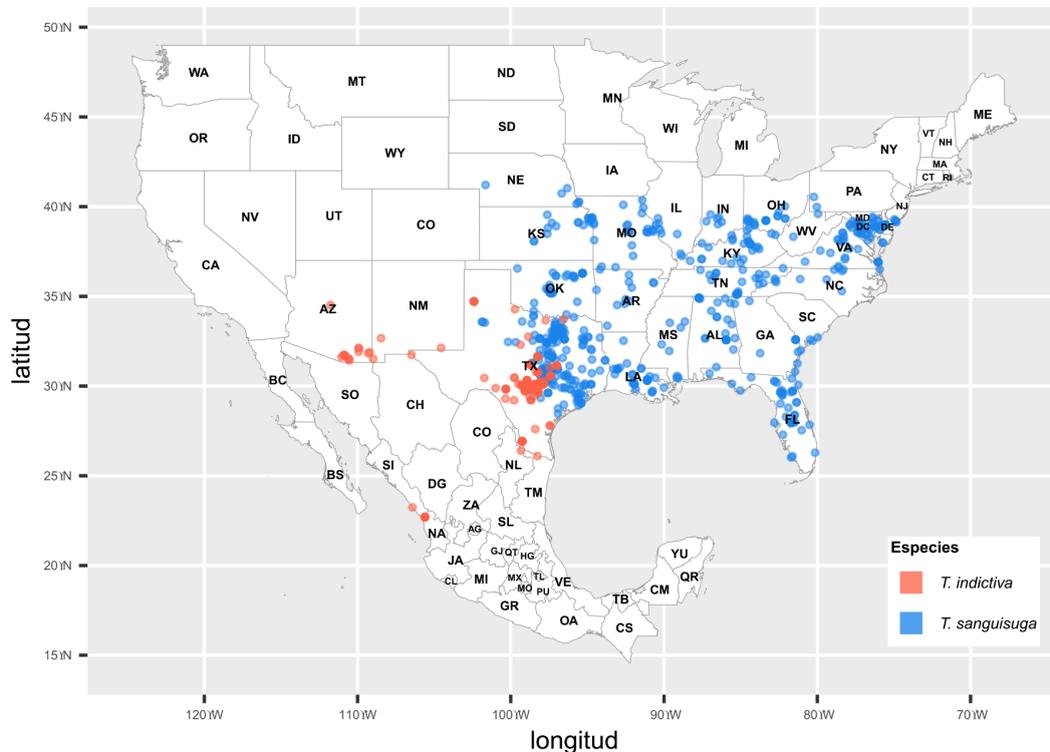


Figura 3. Rangos de las especies *T. indictiva* y *T. sanguisuga*. Datos de ocurrencias obtenidas a partir de la interfaz en R *rgbif* v3.7.8 del servicio web *Global Biodiversity Information Facility* (www.gbif.org).

Usinger (1944) describió cuatro subespecies de *T. sanguisuga* basadas en el tamaño del hábito dorsal, los ojos y la distribución de las marcas conexivales: *T. sanguisuga texana*, *T. sanguisuga ambigua*, *T. sanguisuga occidentalis* y *T. sanguisuga indictiva*. En dicha clasificación, se desestimó el estatus de la especie *Triatoma indictiva* (Figura 4), descrita por Neiva (1912). Lent y Wygodzinsky (1979) posteriormente entendieron que no existían razones para considerar a *T. s. occidentalis* y *T. s. indictiva* como subespecies de *T. sanguisuga* debido a que difieren constantemente en sus patrones cromáticos y no han sido encontrados especímenes con un patrón intermedio entre ambas especies. Además, explicaron que no existían diferencias significativas entre *T. s. occidentalis* y *T. s. indictiva*, por lo tanto fueron sinonimizadas, restableciendo el estatus de especie de *T. indictiva*.

Con respecto a las subespecies *T. s. texana* y *T. s. ambigua* (Figura 5), Lent y Wygodzinsky (1979) rechazaron su clasificación debido a que consideraron que las variaciones en los caracteres distintivos utilizados (tamaño y coloración de las

marcas del conexivo, tamaño de los ojos y distancia interocular) son “menores” y las poblaciones no están separadas por una brecha geográfica o en caracteres distintivos, además no se encontraron ejemplares intermedios entre sus diferenciados patrones colorimétricos. Por otra parte, Mead (1965) afirmó que existe una zona de integración en la zona centro-norte de Florida que alberga formas intermedias entre *T. s. sanguisuga* y *T. s. ambigua* y que se necesitan largas series de especímenes a lo largo del Estado para una mejor comprensión de las formas. Asimismo, un análisis estadístico cuidadoso de especímenes salvajes y experimentos de cruzamientos son necesarios para entender completamente a la especie y la cercanamente relacionada *T. indictiva* (Lent y Wygodzinsky, 1979).



Figura 4. *Triatoma indictiva*. Macho, Arizona. Tomada de Lent y Wygodzinsky, 1979.

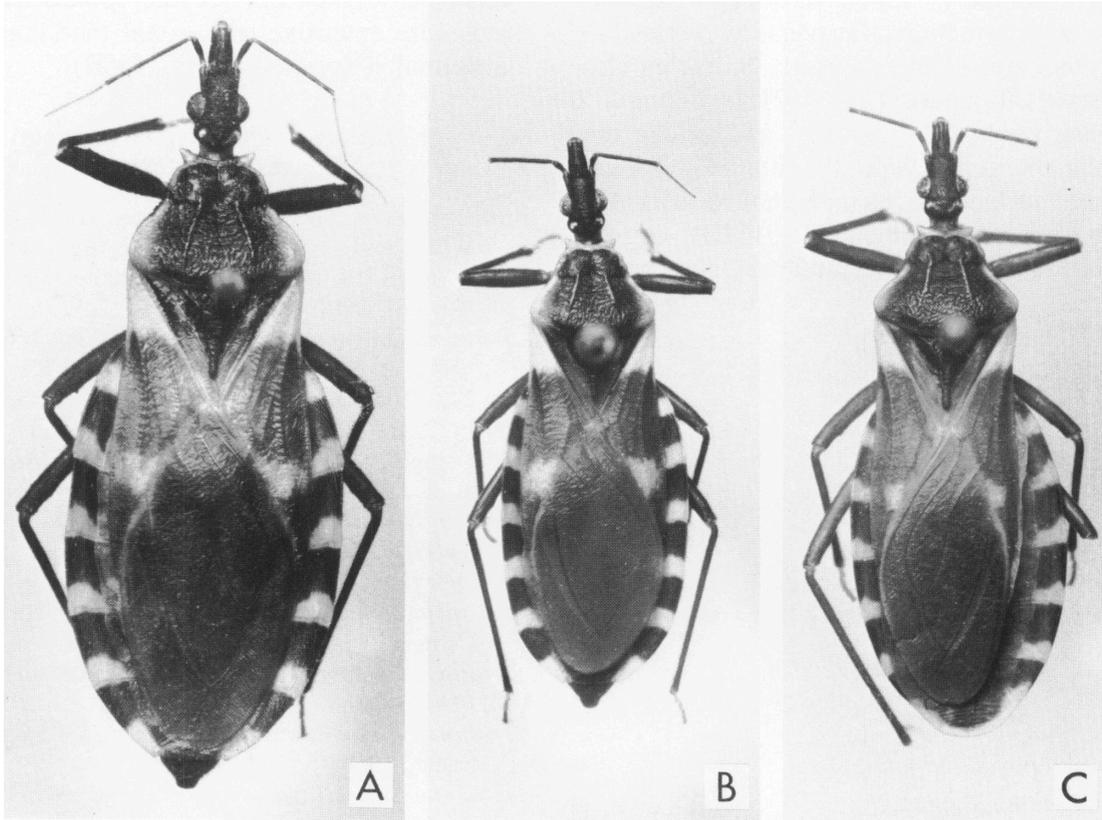


Figura 5. *Triatoma sanguisuga*. A. Hembra, forma nominal, Carolina del Sur. B. Hembra, *T. s. ambigua*, Florida. C. Macho, *T. s. texana*, Texas. Tomada de Lent y Wygodzinsky, 1979. Actualmente las formas *T. s. ambigua* y *T. s. texana* no son consideradas en la identificación (Lent y Wygodzinsky, 1979).

La identificación morfológica de *T. sanguisuga* en Florida puede ser resuelta por la clave de Lent y Wygodzinsky (1979) (Beatty et al., 2023). Hay varias características morfológicas que permiten diferenciar a ejemplares de *T. sanguisuga* encontradas en este estado de otras especies del género *Triatoma*. Presentan una coloración predominantemente negra amarronada con marcas de color anaranjado-amarillo en ambos lados del cuello, la zona lateral del pronoto, la base de los hemielitros y el conexivo (Figura 6). Pero en otros estados, como Texas, la identificación plantea otros problemas, ya que se puede confundir con otras especies, como *T. indictiva*, principalmente en estadios ninfales. En un estudio realizado por Kjos et al. (2013), no se logró identificar morfológicamente ninfas entre *T. sanguisuga* y *T. indictiva* y tampoco se logró identificarlas genéticamente para ninguno de los marcadores moleculares utilizados, el *cytb* y la sección D2 del gen ribosomal 28S. El mismo resultado en la identificación molecular utilizando el *cytb* se repetiría en el trabajo de Curtis-Robles et al. (2018). En este, individuos adultos previamente identificados morfológicamente como *T. sanguisuga* y *T. indictiva*, así como también adultos y ninfas cuya identificación no fue posible mediante caracteres morfológicos, no lograron ser diferenciados en especies distintas utilizando el marcador *cytb*.

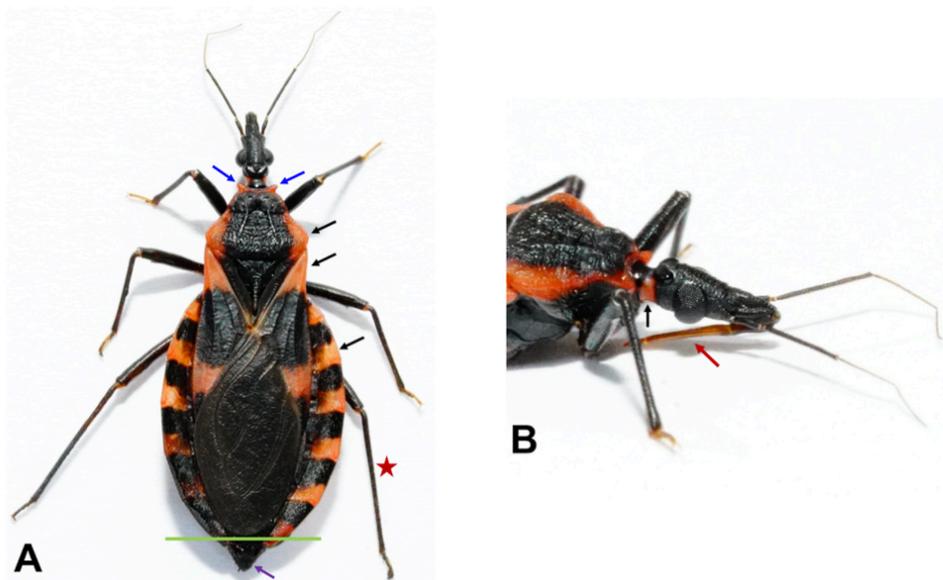


Figura 6. Hembra de *T. sanguisuga*. **A.** Vista dorsal con sus distintivas marcas anaranjadas en el pronoto lateral (flechas azules) base de los hemielitros y mitad distal de cada conexivo del abdomen (flechas negras). Las alas no se extienden más allá del abdomen cuando están retraídas (línea verde). Las patas son de coloración oscura, largas, finas y sin apéndices (estrella roja). Las hembras tienen su genitalia expuesta (flecha morada) mientras que los machos presentan su abdomen redondeado. **B.** Vista lateral. El rostro (probóscide) es recto, con forma de aguja y reposa debajo de la cabeza, con un segundo segmento (flecha roja) que se extiende hasta la base del cuello. Marcas anaranjadas se ubican lateralmente en el cuello (flecha negra) pero generalmente no lo envuelven completamente. Tomada de Beatty et al., (2023).

Dificultades en la taxonomía de Triatominos

Si bien los caracteres morfológicos han sido históricamente utilizados para distinguir la mayoría de las especies de triatominos (Abad-Franch y Monteiro 2005; Lent y Wygodzinsky 1979; Nattero et al., 2017), el desarrollo de técnicas genéticas y moleculares ha revelado numerosos casos de identificación errónea de especies. En ocasiones, especies que divergieron recientemente pueden mostrar diferencias morfológicas notables o ser isomorfas, lo cual dificulta su taxonomía (Abad-Franch y Monteiro, 2005; Monteiro et al., 2018). Las variantes cromáticas proporcionan un ejemplo en el que la estructura taxonómica subyacente no puede ser resuelta únicamente mediante estudios morfológicos. Estas confusiones taxonómicas se atribuyen en gran medida a los altos niveles de plasticidad fenotípica que presentan los triatominos (Dujardin et al., 1999; Gourbière et al., 2012). Existe evidencia de que las similitudes morfológicas han conducido a que existan secuencias genéticas en repositorios públicos (como Genbank del NCBI) cuya identificación específica es errónea (Panzera et al., 2015, Gómez-Palacio et al., 2023). Dada esta problemática en la asignación taxonómica y el establecimiento de relaciones sistemáticas y evolutivas, muchos investigadores han recurrido a enfoques moleculares en un intento por aclarar el panorama sistemático y evolutivo (Abad-Franch y Monteiro, 2005). Con el crecimiento de las técnicas moleculares de las últimas décadas, la clasificación de especies se ha enfocado en buscar agrupaciones de organismos que sean esencialmente monofiléticos. Este criterio se utiliza actualmente para denominar aquellas especies que morfológicamente se identifican como la misma especie, pero que genéticamente se encuentran diferenciados en taxa separados: las especies crípticas (Monteiro et al., 2018). Los estudios moleculares de las últimas décadas han contribuido significativamente a los avances en la sistemática de los triatominos. La sistemática molecular ha revelado que varias especies, previamente definidas según criterios fenotípicos, esconden taxones genéticamente distintos. A modo de ejemplo, podemos mencionar a *R. prolixus* y *Rhodnius robustus* (Monteiro et al., 2003), *T. dimidiata* (Bargues et al., 2008), *Triatoma brasiliensis* (Monteiro et al., 2004) y *Triatoma sordida* (Panzera et al., 1997, 2015). Algunas especies con similitudes morfológicas pueden ni siquiera tener una relación

evolutiva cercana, como es el caso de *T. sordida* y *Triatoma guasayana* (Panzera et al., 2015). Al mismo tiempo, especies estrechamente relacionadas pueden presentar notables diferencias en su fenotipo, como *T. guasayana* y *Triatoma rubrovaria* (Monteiro et al., 2018).

En los estudios filogenéticos, es clave la elección del marcador molecular que se va a utilizar para el análisis, y dicha elección va a depender de la pregunta que se intente responder. Esto se debe principalmente a que distintos marcadores moleculares presentan distintas tasas de evolución (Mas-Coma y Bargues 2009; Wang et al., 2015). Aquellos marcadores que acumulan cambios más rápidamente resuelven mejor las relaciones de individuos cercanamente emparentados (poblaciones, especies), mientras que los marcadores que acumulan cambios más lentamente en el tiempo resultan más útiles para el estudio de taxa más alejados evolutivamente (Abad-Franch y Monteiro, 2005; Mas-Coma y Bargues, 2009). Dadas las tasas de sustitución relativamente altas del ADN mitocondrial en comparación con el genoma nuclear, se han utilizado genes mitocondriales para análisis filogenéticos intra-específicos (Mas-Coma y Bargues, 2009). Entre ellos, el gen mitocondrial más utilizado en triatominos es el *citocromo b (cytb)* debido a su alta tasa evolutiva (Mas-Coma y Bargues, 2009; Wang et al., 2015). Para análisis filogenéticos realizados con este marcador, se propuso un valor umbral de distancia genética de 7,5%, según el modelo K2-p, para validar especies de triatominos diferentes (Monteiro et al., 2004).

Antecedentes en el estudio filogenético de *Triatoma sanguisuga*

A pesar de la evidencia disponible para *T. sanguisuga* sobre su capacidad vectorial, prevalencia de *T. cruzi* y contactos humano-vector, hasta donde sabemos, sólo un único estudio filogenético ha sido llevado a cabo para esta especie. En el estudio publicado en 2011 (De la Rúa et al., 2011), se seleccionaron 54 especímenes a partir de 344 muestras colectadas en Nueva Orleans, Louisiana, en sitios cercanos al sexto caso autóctono confirmado de infección por *T. cruzi*. En dicho trabajo, se encontró una alta diversidad intraespecífica a partir del marcador molecular *cytb* (37 haplotipos en 54 especímenes) y en el análisis filogenético basado en el método de

máxima parsimonia sobre dicho marcador, se obtuvieron dos clados fuertemente respaldados por bootstrap, a los que llamaremos en este trabajo Grupo I y Grupo II, A su vez, el Grupo II se separó en Grupo IIA y Grupo IIB (Figura 7). Además, apoyan sus conclusiones con la diversidad haplotípica analizada para el marcador 16S, en la cual se encontró un total de 6 haplotipos de los cuales 2 sólo se encuentran en el Grupo I, 4 en el Grupo IIA y 1 en los Grupo IIA y Grupo IIB. En otros dos estudios (Kjos et al., 2013; Curtis-Robles et al., 2018), si bien no se realizó un estudio filogenético estricto de *T. sanguisuga*.

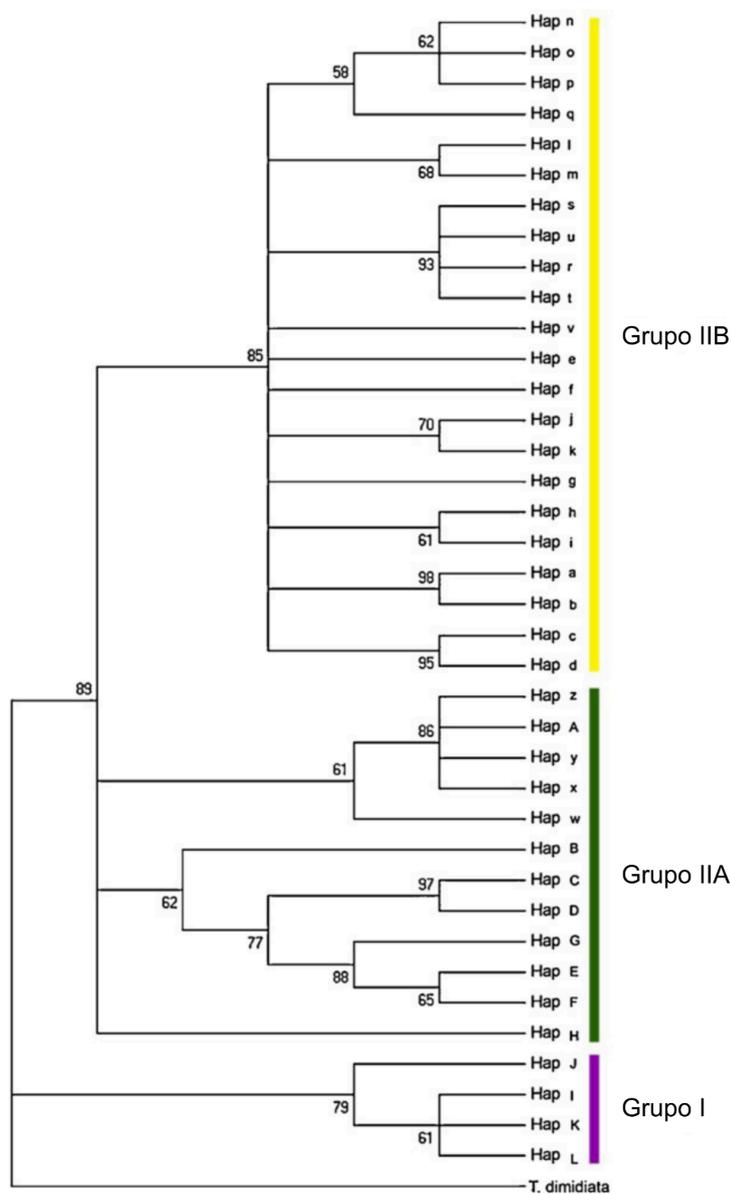


Figura 7. Árbol filogenético consenso obtenido por máxima parsimonia de 37 haplotipos inferidos a partir de secuencias de *cytb* de *T. sanguisuga*. Los números en los nodos representan valores de bootstrap luego de 1000 réplicas (tomado y adaptado de De La Rúa et al., 2011).

Considerando los antecedentes en la clasificación de *T. sanguisuga* durante el siglo XX, que incluyen descripciones de subespecies morfológicas que fueron posteriormente desestimadas, la conflictiva identificación entre *T. sanguisuga* y *T. indictiva*, la gran variabilidad genética registrada por De la Rúa y colaboradores (2011) en una única población del estado de Louisiana, la evidencia de especies crípticas en varios linajes del género *Triatoma* y la limitada atención que ha recibido esta especie en estudios filogenéticos (a pesar de su potencial relevancia como vector de la enfermedad de Chagas), nuestra hipótesis de trabajo plantea la posibilidad de que existe una diversidad genética no detectada dentro de *T. sanguisuga*. La finalidad de este trabajo es utilizar el marcador mitocondrial *cytb* para inferir las relaciones filogenéticas entre múltiples ejemplares de esta especie, provenientes de distintas localidades en diferentes estados a lo largo del sudeste estadounidense.

Objetivos

Objetivo general

Determinar la diversidad genética entre distintas poblaciones del taxón *T. sanguisuga*.

Objetivos específicos

- 1) Delimitar linajes dentro del taxón *T. sanguisuga* mediante el uso de herramientas informáticas.
- 2) Determinar, mediante el uso de herramientas de análisis de secuencias, el patrón de diferenciación genética entre los linajes.

Materiales y métodos

Para este trabajo se utilizaron 41 muestras, identificadas como adultos de *T. sanguisuga* según los protocolos descritos en el trabajo de Lent y Wygodzinsky (1979), provenientes de varios estados del sureste de Estados Unidos, con mayor hincapié en Texas y Florida (Tabla 1, Anexo; Figura 8). Estas muestras fueron proporcionadas por los profesores Gabriel Hamer, Ph.D., del Departamento de Entomología de la Universidad A&M de Texas, Sarah A. Hamer, Ph.D., del Departamento de Biociencias Integrativas Veterinarias de la Universidad A&M de Texas, y Norman Beatty, MD, de la División de Enfermedades Infecciosas y Medicina Global de la Universidad de Florida. Además se utilizaron 83 secuencias disponibles en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), GenBank, correspondientes al *cytb* de individuos identificados como *T. sanguisuga* (69 muestras), *T. indictiva* (8 muestras) y *Triatoma sp.* (6 muestras) (Tabla 1, Anexo; Figura 8). Entre las secuencias identificadas como *T. sanguisuga*, se encuentran las secuencias de los haplotipos de *cytb* obtenidos en el trabajo de De la Rúa y colaboradores (2011). Los individuos identificados como *T. sp.* corresponden a ejemplares que no pudieron ser identificadas ni morfológica ni molecularmente entre *T. sanguisuga* y *T. indictiva*. Estas secuencias se incluyeron para evaluar las relaciones filogenéticas con el resto de los individuos, debido a las históricas dificultades en la identificación de *T. sanguisuga* y *T. indictiva*. Estas secuencias provienen del estado de Texas y junto con 6 individuos de *T. sanguisuga*, no se logró obtener su información geográfica más allá del estado en el que fueron colectadas (Tabla 1, Anexo).

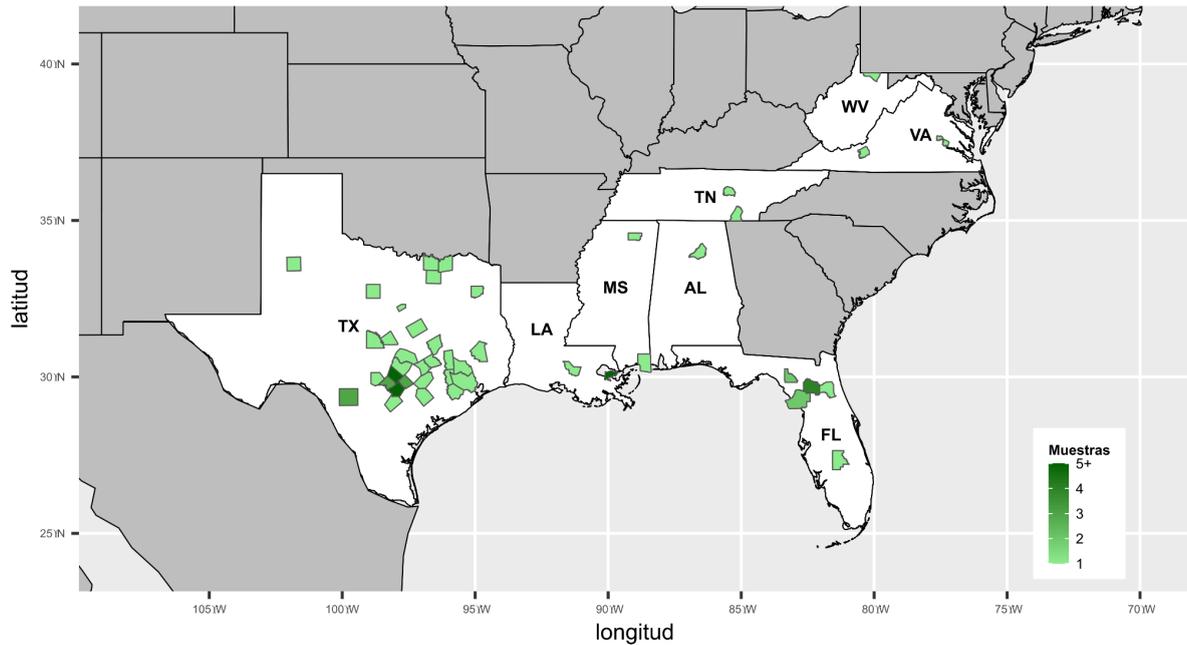


Figura 8. Distribución geográfica de ejemplares utilizados para este trabajo. En blanco se resaltan los estados de donde se obtuvieron las muestras, y en verde se indica el condado. El tono de verde varía de acuerdo a la cantidad de muestras en cada condado. Los condados con una sola muestra son los más claros y los que tienen más de cinco muestras los más oscuros.

Extracción de ADN

El procedimiento de purificación de ADN total se llevó a cabo a partir de las patas de 41 individuos identificados como adultos de *T. sanguisuga*, utilizando el kit *DNeasy Blood & Tissue* de QIAGEN, siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante, con algunas modificaciones, que se describe a continuación:

- Se colocaron 80 μ l de Solución *Buffer* ATL en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y a continuación se colocaron entre 2 y 4 patas. Luego se procedió a triturar el material con tijeras estériles.
- Se agregaron 100 μ l de Solución *Buffer* ATL y 20 μ l de Proteínasa K. Se mezcló vigorosamente.
- Se incubaron las muestras a 56°C *Overnight* en Thermoblock o en estufa.

- Se agitaron las muestras en vortex por 15 segundos y se agregaron en el tubo 200 µl de Solución *Buffer* AL junto con 200 µl de Etanol absoluto. Luego se agitó nuevamente la mezcla por 15 segundos.
- Se centrifugó la mezcla a 14000 x g durante 10 segundos.
- Se colocó el sobrenadante en una columna de microcentrifugación *DNeasy* colocada en un tubo colector de 2 ml y se centrifugó a 6500 x g durante un minuto. Luego se descartó el tubo colector con el líquido incluido.
- Se colocó la misma columna en un nuevo tubo colector de 2 ml, se agregaron 500 µl de Solución *Buffer* AW1 y se centrifugó nuevamente a 6500 x g durante un minuto. Se descartó el tubo colector con el líquido.
- La columna se colocó en un nuevo tubo colector de 2 ml, se agregaron 500 µl de Solución *Buffer* AW2 y se centrifugó a 17000 x g durante 3 minutos. Se descartó el tubo colector con el líquido.
- Se colocó la columna en un nuevo tubo de microcentrifuga de 1,5 ml, se agregaron 50 µl de Solución *Buffer* AE y se centrifugó a 6500 x g durante un minuto.
- Finalmente se repitió el paso anterior una vez más para un mayor rendimiento.

El ADN extraído se conservó a -20°C para aplicaciones posteriores.

Cuantificación y evaluación de la calidad del ADN

La concentración del ADN extraído se determinó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop2000 (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La calidad del ADN extraído se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa siguiendo los siguientes pasos:

- Se preparó un gel de agarosa al 0,8% (w/v) en solución *buffer* TAE (40 mM Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA). Además, se añadieron 2 µl de agente intercalante (GelRed® 10000X) a la solución de agarosa

- Se mezclaron 2 μ l de cada muestra de ADN con 3 μ l de H₂O estéril y 1 μ l de agente de carga (*Gel Loading Dye*, 6X). Finalmente se cargaron las mezclas en los pocillos del gel.
- El gel de agarosa se sometió a una tensión constante de 80 V durante 20 minutos para separar los fragmentos de ADN según su tamaño.
- Después de la electroforesis, el gel se expuso a una fuente de luz azul para la visualización de los fragmentos de ADN.

Amplificación por *Polymerase Chain Reaction* (PCR) del *Cytb*

La amplificación por PCR del *cytb* fue realizada utilizando los siguientes primers:

- CYTB7432F, 5'-GGACG(AT)GG(AT)ATTTATTATGGATC (Monteiro et al., 2003)
- CYTB7433R, 5'-GC(AT)CCAATTCA(AG)GTTA(AG)TAA (Monteiro et al., 2003)

Preparación de la mezcla de reacción

En un tubo de PCR en hielo se agregaron los siguientes componentes:

- 1 μ l de ADN (con concentraciones variables entre las muestras).
- 12,5 μ l de Taq 2X *Master Mix* (20 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0,4 mM dNTPs, 10% Glycerol, 0,16% IGEPAL® CA-630, 0,1% Tween® 20, 50 units/ml Taq *DNA Polymerase*, pH 8,6 a 25°C).
- 0,5 μ l de MgCl₂ (25 mM).
- 0,7 μ l de *primer* CYTB7432F (10pM).
- 0,7 μ l de *primer* CYTB7433R (10pM).
- H₂O estéril para completar un volumen final de 25 μ l.

Termociclado

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador en condiciones que se detallan en el siguiente programa:

- Desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos.
- Ciclos de amplificación (35):
 - Desnaturalización a 95°C durante 30 segundos.
 - Hibridación de cebadores a 47°C durante 30 segundos.
 - Extensión a 72°C durante 60 segundos.
- Extensión final a 72°C durante 10 minutos.

Con el fin de verificar y analizar los productos de la PCR, se sometió a las muestras a una electroforesis en gel de agarosa siguiendo los siguientes pasos:

- Se preparó un gel de agarosa al 0,8% (w/v) con el mismo procedimiento que el anterior, con 5 µl de muestra de producto de PCR.
- Además, se cargó en un pocillo un marcador de peso molecular (Quick-Load® Purple 100 bp *DNA Ladder*).
- El gel de agarosa se sometió a una tensión constante de 80 V durante 20 minutos para separar los fragmentos de ADN según su tamaño.
- Después de la electroforesis, el gel se expuso a una fuente de luz azul para la visualización de los fragmentos de ADN.

Secuenciación de los productos de PCR

Después de la verificación de los productos de PCR, los fragmentos de ADN amplificados se sometieron a secuenciación utilizando la tecnología de secuenciación de Sanger. Este proceso de secuenciación se llevó a cabo en la empresa MacroGen, Inc. (Corea). Las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron

curadas manualmente mediante la observación de los electroferogramas brindados por la empresa a través del programa informático *FinchTV* v1.4.0 (Geospiza, 2009).

Análisis filogenético y diversidad genética

Las secuencias curadas del gen *cytb* se alinearon utilizando el programa *MAFFT* v.7.453 (Katoh y Standley, 2013). Los paquetes de R *ape* v.5.7-1 (Paradis y Schliep, 2019) y *pegas* v.1.2 (Paradis, 2010) se utilizaron para identificar los haplotipos presentes en los datos. El paquete de R *phangorn* v.2.11.1 (Schliep et al., 2017) se utilizó para determinar el modelo de sustitución nucleotídica que mejor se adapta a los datos, basado en el criterio de información bayesiana (Schwarz, 1978)

Se definieron los diferentes grupos de individuos dentro del conjunto de datos utilizando dos métodos: *Hierarchical Bayesian Analysis of Population Structure* (HierBAPS) con el paquete de R *rhierBAPS* v.1.1.3 (Cheng et al., 2013), y un análisis de delimitación de especies *Generalized Mixed Yule-Coalescent* (GMYC) (Pons et al., 2006) utilizando el paquete de R *splits* v1.0 (Ezard et al., 2021). La entrada del análisis de GMYC es un árbol bayesiano ultramétrico y dicotómico. Para generarlo se utilizó el programa *BEAST* v1.10 (Suchard et al., 2018), seleccionando el modelo de sustitución TN93 + G (distribución gamma) (Tamura y Nei, 1993). Se realizó el análisis con el modelo de Yule y un reloj molecular estricto como *priors*, los cuales suponen una tasa de natalidad de linaje constante para cada rama del árbol, que define el patrón de ramificación. Las cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC) se ejecutaron para 100 millones de generaciones y la convergencia se verificó mediante el programa *Tracer* v1.7 (Rambaut et al., 2018).

Con el programa *IQ-TREE* v.1.6.12 (Nguyen et al., 2015), se estimó el mejor modelo de sustitución nucleotídica ajustado a los datos. A partir del modelo de sustitución obtenido, se realizó una inferencia filogenética por el método de máxima verosimilitud. El cálculo del soporte estadístico de los nodos del árbol obtenido se

realizó mediante 1000 pseudoréplicas de UltraFast bootstrap. También se estimaron las tasas de sustituciones y frecuencias de bases.

El programa *MrBayes* v3.2.7 (Ronquis et al., 2012) fue utilizado para realizar una inferencia bayesiana distinta a la obtenida con *BEAST*. Se eligió el modelo GTR + G (Lanave et al., 1984) y se indicaron las tasas de sustituciones y frecuencias de bases obtenidas con *IQ-TREE*. Dos corridas de 4 cadenas de MCMC se corrieron por un total de 5 millones de generaciones.

El paquete *phangorn* también se utilizó para elaborar una inferencia filogenética bajo el modelo de máxima parsimonia. El soporte estadístico del árbol obtenido se calculó mediante la generación de 1000 pseudoréplicas.

Las librerías *ape* y *pegas* también se utilizaron para obtener distintos índices de diversidad genética poblacional para todo el set de datos y para cada grupo obtenido por GMYC. Se obtuvieron los sitios segregantes (S), diversidad nucleotídica (π) y diversidad haplotípica (H_d). Con estos paquetes también se evaluó la hipótesis de neutralidad mutacional con los test de Tajima (Tajima, 1989) y Ramos-Onsins–Rozas (Ramos-Onsins y Rozas, 2002). Se estimaron las distancias genéticas según el modelo de Kimura 2-parámetros (K2-p) (Kimura, 1980) y la distribución gamma con el paquete *ape* y se calcularon las medias entre grupos utilizando el paquete de R *vegan* v2.6.4 (Oksanen et al., 2022).

Con el fin de visualizar y analizar el patrón de distribución de los haplotipos, se construyó una red de haplotipos utilizando la herramienta informática *PopART* (Leigh y Bryant, 2015) por el método *Median Joining*.

Finalmente, se emplearon los paquetes de R *ggtree* v.3.8.2 (Yu et al., 2017) y *ggplot2* v.3.4.3 (Wickham et al., 2011) para la visualización y edición de los árboles obtenidos y el mapa de calor de las distancias según el modelo K2-p entre haplotipos.

Resultados

Jerarquización e inferencia bayesiana

La agrupación de los haplotipos de *cytb* usando los modelos de GMYC y hierBAPS, mostró resultados similares para los datos utilizados. Se logró definir 4 grupos basados en GMYC y 5 grupos de nivel 1, con 11 subgrupos de nivel 2, obtenidos con hierBAPS. Si bien los grupos en los distintos métodos fueron esencialmente los mismos, el Grupo 2 definido por GMYC se encuentra dividido en dos grupos por el método hierBAPS (Figura 11).

En el árbol filogenético realizado por *BEAST* (Figura 9) se distinguen 4 clados bien soportados por las probabilidades posteriores ($PP > 0,95$). El Grupo 1, es monofilético y hermano al clado conformado por los otros 3 grupos. Está compuesto completamente por especímenes de *T. sanguisuga* provenientes del estado de Florida. A su vez, este grupo presenta un subgrupo bien soportado de 8 especímenes de la región centro-norte de Florida, separado de otros 2 especímenes de la zona centro-norte y 1 espécimen de la zona más al sur. El resto de los grupos son parte de un mismo clado, hermano al Grupo 1. El Grupo 2 presenta principalmente especímenes de Louisiana, con algunos de Texas y ejemplares en localidades más al norte: Mississippi, Alabama, Tennessee y Virginia Occidental. El Grupo 3 presenta principalmente individuos de Texas, algunos de Louisiana y el sur de Mississippi. Este grupo también comprende al haplotipo con amplia distribución H31, el cual reúne 4 especímenes, cada uno de Texas, Tennessee, Virginia y Louisiana. Finalmente, el Grupo 4 tiene la característica de tener muchos taxa, al igual que el Grupo 2, con la diferencia sustancial de que solo se encuentra en Texas. También, es el único que además de ejemplares de *T. sanguisuga*, está integrado por especímenes identificados como *T. indictiva* (haplotipos H15, H16 y

H18) y como *T. sp.* (haplotipos H17, H23 y H30), siendo el único que contiene ejemplares con una identificación conflictiva.

A pesar de ser también una inferencia bayesiana, el árbol obtenido por *MrBayes* (Figura 1, Anexo) fue diferente al obtenido por *BEAST*. En este árbol, el Grupo 1 también es monofilético (PP=1), pero se presenta como más emparentado al Grupo 4, aunque con soporte no significativo (PP>0,70). El Grupo 2 aparece como hermano a los dos grupos mencionados, pero no significativamente (PP>0,77), no obstante, es monofilético con un soporte significativo (PP>0,95). El Grupo 3 deja de ser monofilético ya que, por un lado, el haplotipo H34 se separa del conjunto de datos con un soporte significativo, y por otro, el resto de sus ramas forman una politomía.

Inferencia por máxima verosimilitud

El modelo de sustitución nucleotídica al que mejor se ajustaron los datos es el modelo de Tamura-Nei modelado por una distribución Gamma discreta con un valor alfa de 4 y presencia de sitios invariables ($\text{TrN}+\text{G}(4)+\text{I}$). A partir del modelo de sustitución obtenido, se generó un árbol filogenético por el método de máxima verosimilitud en el cual se mantienen los grupos de GMYC, sin embargo, los únicos que se encuentran soportados significativamente ($P>0,95$) son el Grupo 1 y el Grupo 2, mientras que el resto muestra conflictos y niveles de soporte más bajos, en especial el Grupo 3 (Figura 10).

El Grupo 1 es monofilético ($P>0,99$), pero se encuentra incluido dentro del Grupo 4, volviendo a este último parafilético. Asimismo, el Grupo 4 presenta un soporte estadístico menor (0,81) y se encuentra subdividido en dos con una importante concordancia con la jerarquización de nivel 2 de hierBAPS.

El Grupo 2 también es monofilético ($P>0,99$) y en líneas generales mantiene las relaciones filogenéticas internas observadas en árbol generado por inferencia bayesiana. Existen dos clados bien soportados que se diferencian de acuerdo a la jerarquización de hierBAPS y un tercer clado con soporte más bajo, aunque no despreciable (0,89), que agrupa ejemplares del centro-norte de la región estudiada.

El Grupo 3 es el que presenta el menor soporte estadístico de todos (0,36) y es polifilético gracias a que se separa de un solo haplotipo, el H104, con un alto soporte (0,98). Sin embargo, en la red de haplotipos, el H104 se posiciona dentro del Grupo 3 (Figura 12)

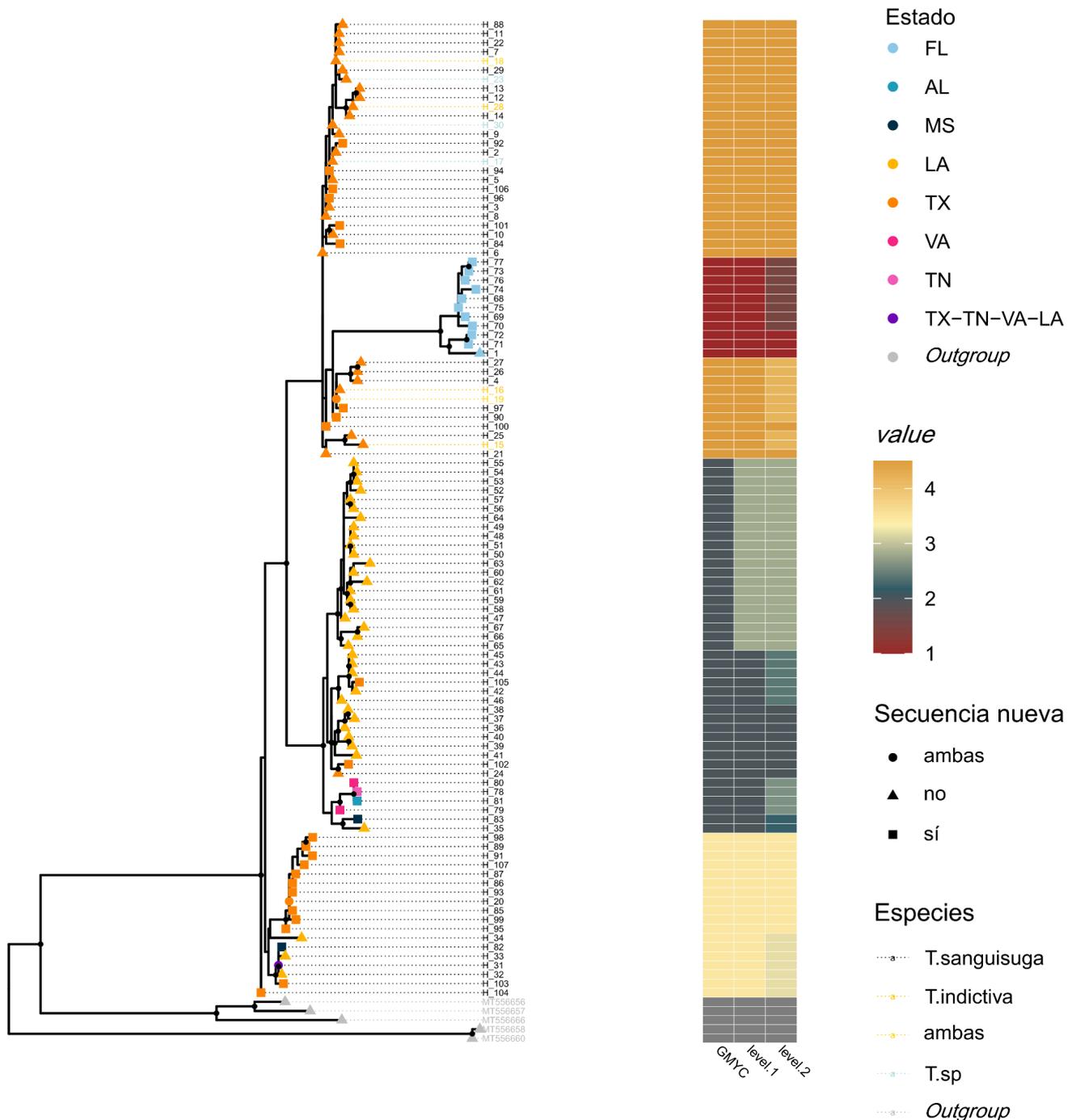


Figura 10. Árbol filogenético de máxima verosimilitud obtenido de un fragmento de *citocromo b* (*cytb*) de ejemplares de *T. sanguisuga*, *T. indictiva* y *T. sp.* Los círculos negros indican nodos con soporte de bootstrap mayor a 0,95. Se indican los grupos delimitados por GMYC: Grupo 1 (rojo), Grupo 2 (verde oscuro), Grupo 3 (amarillo) y Grupo 4 (anaranjado). Se indican también los grupos delimitados por hierBAPS: nivel 1: Grupo 1 (rojo), Grupo 2A (verde oscuro), Grupo 2B (verde claro), Grupo 3 (amarillo) y Grupo 4 (anaranjado). Para el nivel 2 se utilizan los mismos colores, con diferentes tonalidades. Las puntas de las ramas están coloreadas según el estado del cual proviene el haplotipo correspondiente: Florida (celeste) Alabama (azul claro), Mississippi (azul oscuro), Louisiana (anaranjado claro), Texas (anaranjado oscuro), Virginia (fuxia), Tennessee (rosa).

Inferencia por máxima parsimonia

El árbol filogenético generado por este método arrojó una topología en la que solamente tiene soporte significativo ($P > 0,95$) el Grupo 1 como clado monofilético y hermano al resto de grupos (Figura 2, Anexo). El Grupo 2 aparece separado a los Grupos 3 y 4, y hermano a éstos con un soporte menor (0,92). El Grupo 3 como grupo monofilético presenta un soporte todavía menor (0,90). Por último, el Grupo 4 presenta el menor soporte de todos (0,81). El nodo que une el Grupo 3 al Grupo 4 tiene un soporte de menor a 0,5).

Diversidad genética

En este trabajo, se obtuvo un total de 41 fragmentos de 453 pb del gen *cytb* de ejemplares de *T. sanguisuga*. Un total de 116 sitios fueron segregantes (25,61%). El conjunto de datos mostró un mayor enriquecimiento A+T (62,96%), una tendencia normal en genomas mitocondriales de insectos. Fueron encontrados un total de 107 haplotipos en 143 individuos, y la diversidad haplotípica (H_d), la cual indica la probabilidad de que dos haplotipos tomados al azar sean diferentes, para todo el conjunto de datos fue alta (0,992). Por otra parte, la diversidad nucleotídica (π), la cual mide las diferencias en la secuencia de nucleótidos entre todas las parejas posibles de secuencias en el conjunto, fue baja (0,046) (Tabla 1). En el Grupo 1 fue encontrando un haplotipo por cada individuo. Con una H_d de 1, es el grupo con el valor más alto y la segunda π más alta (0,021), aunque es el grupo cuyo muestreo es el más bajo (11 individuos). El Grupo 4 es el segundo más diverso en cuanto a H_d (0,987), con 37 haplotipos en 48 individuos. Además, tiene la π más baja, junto con el Grupo 3 (0,016). Este último obtuvo también la H_d más baja (0,929), con 18 haplotipos en 27 individuos, siendo el menos diverso en diversidad genética de acuerdo a estos valores. Luego, el Grupo 2 obtuvo una H_d de 0,979, con 41 haplotipos en 57 individuos; y una π de 0,023, siendo la más alta del conjunto (Tabla 1). El haplotipo más frecuente fue H31, con 7 individuos y presencia en los estados de Texas, Tennessee, Virginia Occidental y Louisiana. Curiosamente,

el haplotipo H18 está presente en dos especímenes de las presuntamente diferenciadas especies de *T. sanguisuga* y *T. indictiva*.

Al realizar el Test de Neutralidad de Tajima, el valor D es muy cercano a cero (0,003) para todo el conjunto, con un p-valor asociado de 0,998 (Tabla 1). Este p-valor es mayor que 0,05, indicando que no hay evidencia significativa para rechazar la hipótesis nula de neutralidad. Los D obtenidos en los Grupos 1 (-0,75), 2 (-1,05), 3 (-0,48) y 4 (-1,26) tampoco arrojaron valores significativos para ninguna de las distribuciones. Con respecto al Test de Neutralidad de Ramos-Onzins y Rozas, se obtuvo un valor de 0,089 para todo el conjunto, con un p-valor de 0,63, impidiendo rechazar la hipótesis nula de neutralidad. Dentro de los grupos, el único que tuvo un p-valor significativo (0,048) fue el Grupo 1 con un R2 de 0,11 (Tabla 1).

Tabla 1. Datos y valores estadísticos genéticos obtenidos a partir de un fragmento del *citocromo b* (*cytb*) de los grupos de GMYC obtenidos en nuestro conjunto de datos.

	N	S	Nh	Hd	π	D	D P-val	R2	R2 P-val
Grupo 1	11	33	11	1,000	0,021	-0,749	0,454	0,112	0,048
Grupo 2	57	69	41	0,979	0,023	-1,005	0,294	0,071	0,180
Grupo 3	27	33	18	0,929	0,016	-0,475	0,635	0,097	0,229
Grupo 4	48	49	37	0,987	0,016	-1,256	0,209	0,064	0,118
Total	143	116	107	0,992	0,046	0,003	0,998	0,088	0,630

N: cantidad de individuos. S: sitios segregantes. Nh: cantidad de haplotipos. Hd: diversidad haplotípica. π : diversidad nucleotídica. D: Valor del Test de Neutralidad de Tajima. D P-val: p-valor del test de Tajima R2: Valor del Test de Neutralidad de Ramos-Onsins–Rozas. R2 P-val: p-valor del test R2.

Los valores de distancia K2-p entre el Grupo 1 y los demás fueron superiores al 7,5% en todos los casos. (Figura 11, Tabla 2). Además, al considerar el Grupo 1 contra todo el conjunto de datos, la distancia fue de $8,3 \pm 1,1\%$ (Tabla 2, Anexo). Los Grupos 2, 3 y 4 presentaron valores más moderados de distancias promedio entre sí ($5,0 \pm 0,6\% < K2-p < 6,6 \pm 0,9\%$). La distancia intra-grupo más alta fue la del Grupo 2 ($2,7 \pm 1,0\%$), mientras que la más baja fue la del Grupo 4 ($1,6 \pm 0,9\%$), aunque muy cercana a la del Grupo 3 ($1,7 \pm 0,9\%$) (Tabla 2). Es notable observar que el haplotipo H1 presenta valores de distancia K2-p superiores al 10% en muchos casos, sobre todo con el Grupo 2 (Figura 11)

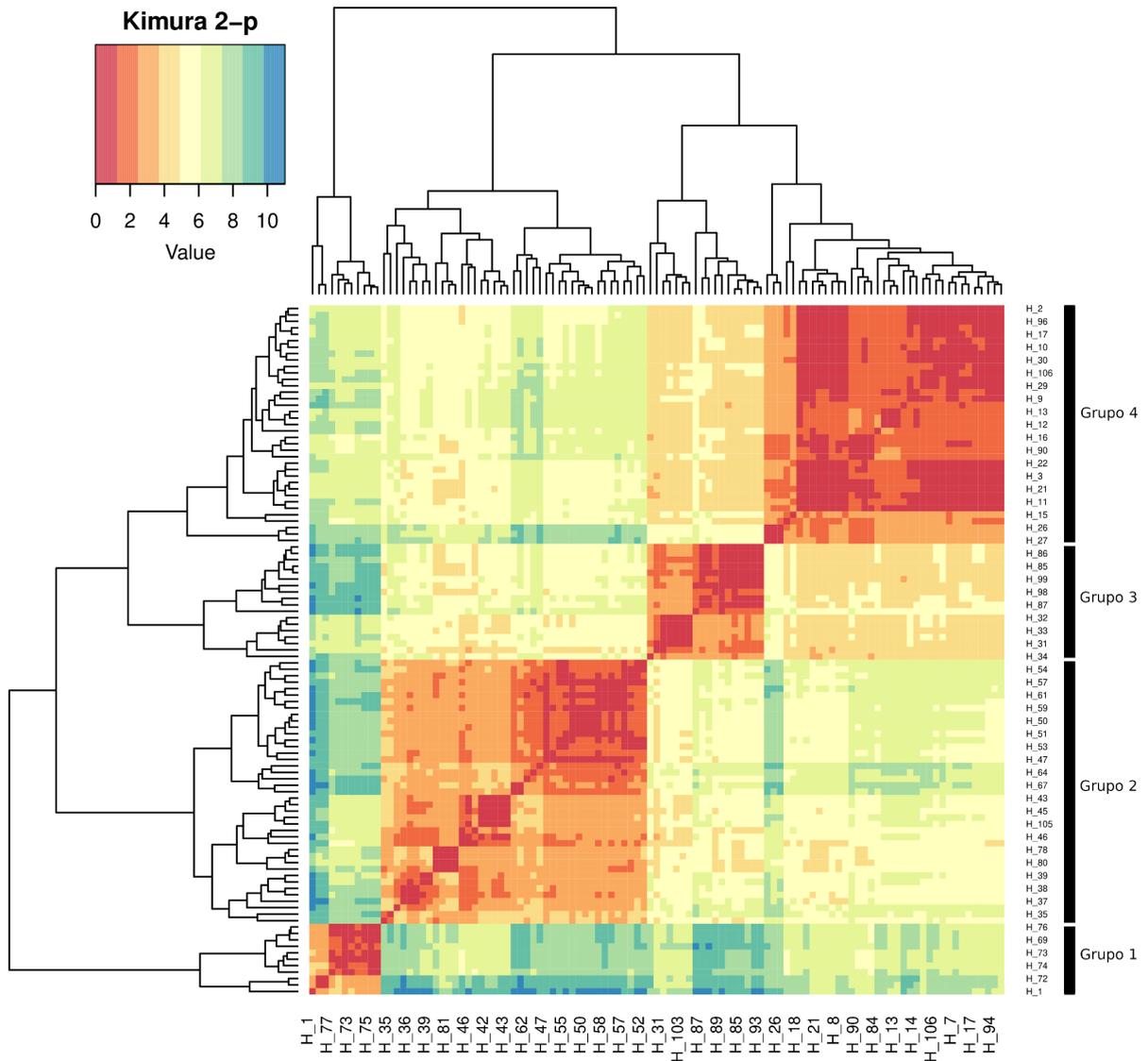


Figura 11. Mapa de calor de las distancias genéticas basadas en el modelo de Kimura 2-p, entre los haplotipos encontrados en un fragmento del *citocromo b* (*cytb*) en nuestro grupo de datos. En rojo se indican las distancias más cercanas a 0 y en azul las que son iguales o mayores al 10%. Los grupos de GMYC se señalan mediante barras negras. Solo algunos de los 107 haplotipos se encuentran etiquetados, con el fin de que se puedan observar en la figura.

Tabla 2. Distancia genética media (%), según el modelo K2-p, entre los grupos definidos utilizando GMYC.

	1	2	3	4
Grupo 1	2,2±1,3	-	-	-
Grupo 2	8,8±1,1	2,7±1,0	-	-
Grupo 3	8,8±1,0	5,9±0,7	1,7±0,9	-
Grupo 4	7,7±0,6	6,6±0,9	5,0±0,6	1,6±0,9

Red de haplotipos

La topología de la red de haplotipos observada refleja de manera consistente los resultados obtenidos tanto en el análisis filogenético de máxima verosimilitud como en el análisis bayesiano y el GMYC (Figura 12). En esta estructura, el Grupo 1 es el más alejado, con un total de 22 pasos mutacionales con el grupo más cercano: el Grupo 4. Dentro del Grupo 1, los haplotipos H71 y H72 presentan 12 pasos mutacionales con respecto al más cercano (H75). Por su parte, el haplotipo H1 suma otros 12 pasos mutacionales con respecto a H71. Los pasos mutacionales entre estos haplotipos y el núcleo del grupo son de una magnitud similar a los observados entre el Grupo 3 y el Grupo 4. Contrastando con esta estructura, el Grupo 4 presenta escasos pasos mutacionales entre sus haplotipos y se separa del Grupo 3 por 13 pasos. En cuanto al Grupo 2, se distingue por presentar la mayor estructuración en la red. Este grupo se fragmenta principalmente en dos subgrupos, cuyos haplotipos agrupados coinciden con la jerarquía identificada por hierBAPS. Los 5 pasos mutacionales entre estos subgrupos son menores a los observados entre haplotipos específicos de otros grupos, como H34 en el Grupo 3 (10), H15 (14) en el Grupo 4. Es importante destacar que la jerarquización de hierBAPS en este caso no se distingue de la obtenida mediante GMYC.

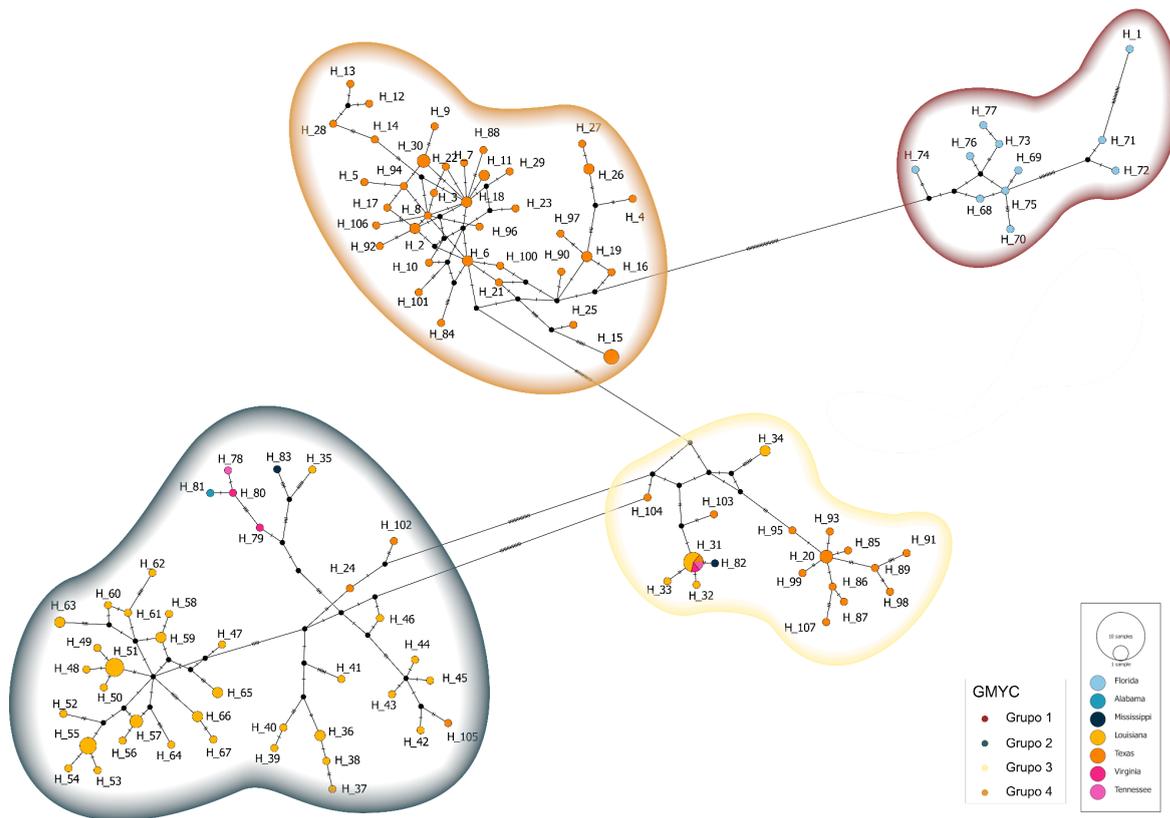


Figura 12. Red de haplotipos elaborada en PopART por el método Median-Joining para los 107 haplotipos encontrados a partir de un fragmento de *citocromo b* (*cytb*) de ejemplares de *T. sanguisuga*, *T. indictiva* y *T. sp.* Los haplotipos están coloreados según el estado del cual provienen: Florida (celeste) Alabama (azul claro), Mississippi (azul oscuro), Louisiana (anaranjado claro), Texas (anaranjado oscuro), Virginia (fuxia), Tennessee (rosa). Los grupos de GMYC se indican con bordes de colores: Grupo 1 (rojo), Grupo 2 (verde oscuro), Grupo 3 (amarillo), Grupo 4 (anaranjado). Las marcas en los vértices indican pasos mutacionales: 22 entre Grupo 1 y Grupo 4, 13 entre Grupo 4 y Grupo 3 y 15 entre Grupo 3 y Grupo 2. Los pequeños círculos negros representan haplotipos faltantes.

Discusión

Hemos hablado cómo históricamente *T. sanguisuga* y *T. indictiva* han sido objeto de controversia con respecto a su identificación como especies separadas (Lent y Wygodzinsky, 1979). A partir de nuestros resultados, observamos que *T. sanguisuga* es parafilética con respecto a los individuos identificados como *T. indictiva* y *T. sp.*. Este último resultado se encuentra en concordancia con lo observado en investigaciones anteriores, donde utilizando el marcador mitocondrial *cytb*, tampoco se logró diferenciar genéticamente las especies *T. sanguisuga* y *T. indictiva* (Curtis-Robles et al, 2018; Kjos et al., 2013). La especie *T. indictiva* presenta una distribución que abarca los estados mexicanos de Sonora y Chihuahua, y los estados de Arizona, Nuevo México y Texas (Lent y Wygodzinsky, 1979), siendo este último estado el lugar donde se solapa su distribución con la de *T. sanguisuga*. Se trata de dos especies muy similares cuya identificación se basa principalmente en diferencias en los patrones cromáticos y sutiles diferencias en el tamaño general del cuerpo (Lent y Wygodzinsky, 1979). Curiosamente, no se han realizado descripciones de la genitalia masculina de estas especies para establecer diferencias. La principal diferencia morfológica entre las especies es su coloración, siendo ambas de un color oscuro con tonos cercanos al negro, pero *T. sanguisuga* presenta marcas anaranjadas en el conxivo y los hemielitros más conspicuas que *T. indictiva* (Figuras 3 y 4).

La variabilidad morfológica intraespecífica a menudo afecta a características comúnmente utilizadas en la taxonomía clásica en triatominos, como los patrones de coloración (Abad-Franch et al., 2009; Pavan et al., 2015), el tamaño y la forma de los cuerpos, cabezas y alas (Schachter-Broide et al., 2004; Hernández et al., 2011; Nattero et al., 2013; Sandoval et al., 2015). Las variaciones cromáticas dentro de una especie o entre especies hermanas pueden ser resultado de plasticidad adaptativa, lo que puede complicar la clasificación taxonómica. Por ejemplo, la existencia de formas melánicas ha sido observada dentro de otras especies de triatominos como *T. infestans* (Noireau et al., 1997), *Rhodnius stali* (Dujardin et al., 2009), *Rhodnius nasutus* (Dias et al., 2014) y *Triatoma mexicana* (Rivas et al., 2021). El descubrimiento de linajes crípticos con capacidades vectoriales diferentes

y también variantes cromáticas de una misma especie en diferentes microambientes fueron algunos de los mayores logros en la taxonomía de triatomíneos a principios de la década del 2000 (Pavan et al., 2021). Dada la notable plasticidad fenotípica presente en Triatominae y la existencia de variantes cromáticas en otras especies, y considerando los resultados filogenéticos de nuestro trabajo, creemos que existen errores en la identificación de *T. indictiva* y *T. sanguisuga* en el estado de Texas. A raíz de eso, sugerimos llevar a cabo una exhaustiva revisión taxonómica de *T. indictiva* en toda su distribución, haciendo hincapié en las diferencias con *T. sanguisuga* en su región de simpatria, dentro del estado de Texas. Además, se enfatiza la necesidad de realizar múltiples estudios genéticos adicionales con el fin de obtener evidencia sólida sobre la relación entre estas especies.

En este análisis realizado a partir de un fragmento de *cytb* de *T. sanguisuga* se descubrió que existe una amplia diversidad genética dentro de esta especie. Esta alta diversidad es evidente en el descubrimiento de 107 haplotipos en tan solo 143 individuos para un fragmento de 453 pb (dando una diversidad haplotípica cercana a 1, $H_d = 0,992$). Nuestro resultado es similar al encontrado por De la Rúa y colaboradores (2011) ($H_d = 0,978$) y superior a la diversidad encontrada en especies en las que fueron analizadas más poblaciones y/o muestras (Monteiro et al., 2004; Giordano et al., 2005; Fitzpatrick et al., 2008; Almeida et al., 2008). A partir de los datos moleculares, pudimos reconocer cuatro grupos bien diferenciados entre sí a lo largo del sudeste estadounidense (Grupo 1-4). La delimitación de grupos dentro del conjunto total de secuencias, obtenida por dos métodos informáticos diferentes (GMYC *versus* hierBAPS), fue bastante similar. Estos métodos presentaron una única diferencia: el Grupo 2 delimitado por GMYC se divide en dos según el criterio de hierBAPS. Teniendo en cuenta esta diferencia, los grupos fueron nombrados en base al análisis de GMYC, puesto que es el más conservador. Las distintas inferencias filogenéticas realizadas no mostraron concordancia entre sí, y esta falta de acuerdo se atribuye en gran medida a las diferencias en la construcción de los algoritmos utilizados en cada método. Por ejemplo, a diferencia de las inferencias por máxima verosimilitud, las inferencias bayesianas incorporan la variable de los *priors* en la elaboración de los patrones de ramificación, lo cual influye en las hipótesis resultantes. Incluso dentro de las inferencias bayesianas, los programas utilizados exploran estos *priors* de manera diferente. Por otro lado, el método de

inferencia de máxima parsimonia se distingue por no depender de un modelo evolutivo para determinar las relaciones entre los taxa. En lugar de buscar la hipótesis más probable, este método determina aquella que presenta el menor número de cambios posibles.

Aunque estos métodos pueden generar discrepancias en los resultados, como en nuestro caso, estas diferencias tienden a disminuir a medida que se incorporan más genes e individuos al análisis (Brooks et al., 2007). En este contexto, los resultados obtenidos nos instan a intensificar nuestros esfuerzos en el análisis y considerar la inclusión de un mayor número de datos para mejorar la robustez y la coherencia de nuestras inferencias.

El Grupo 1 es el más alejado genéticamente a otros grupos y el único que contiene individuos del estado de Florida y que además no abarca ejemplares de otras localidades (Figura 9, Tabla 2). Es el grupo con mayor diversidad haplotípica (Tabla 1), habiendo un haplotipo por cada individuo, aunque este resultado probablemente se deba a la baja cantidad de individuos analizados dentro del mismo; es esperable que al incorporar más individuos la diversidad haplotípica disminuya. En vista de los diferentes árboles filogenéticos obtenidos, la única concordancia entre sus distintas topologías, es que el Grupo 1 es monofilético con un soporte significativo. Este grupo solamente fue considerado como un clado separado al resto en el árbol bayesiano generado por *BEAST* (Figura 10) y en el árbol de máxima parsimonia (Figura 1, Anexo). En el árbol de máxima verosimilitud (Figura 11) y en el árbol bayesiano generado por *MrBayes* (Figura 2, Anexo), el Grupo 1 aparece más emparentado al Grupo 4 que al resto de grupos. Estos dos resultados están en concordancia con la red de haplotipos (Figura 12) y las distancias genéticas K2-p (Tabla 2, Figura 9). Este grupo es el que presenta las distancias genéticas K2-p medias más altas con respecto al cada uno de los otros grupos (Tabla 2) y al observar la distancia media entre el Grupo 1 y todo el resto de del conjunto de datos (Tabla 1, Anexo), vemos que se supera el umbral de 7,5% propuesto para la delimitación de especies en Triatominos (Monteiro et al., 2004). Resultados similares se han obtenido en estudios de sistemática molecular en diferentes especies de triatominos (Monteiro et al., 2003; Díaz et al., 2014; Kieran et al., 2020; Abad-Franch et al., 2021; Monteiro et al., 2013; Nattero et al., 2016; Panzera et al., 2015; Pfeiler et al., 2006; Pita et al., 2021; Campos-Soto et al., 2020). Además, en algunos casos,

abordajes similares han evidenciado la presencia de linajes que posteriormente fueron descritos como nuevas especies (Da Rosa et al., 2012; Souza et al., 2016; Dorn et al., 2018; Lima-Cordón et al., 2019; Alevi et al., 2020; Gil-Santana et al., 2022).

El Grupo 2, es monofilético y está soportado en todos los árboles filogenéticos, con excepción del árbol de máxima parsimonia (Figura 1, Anexo). Su relación con otros grupos no es clara. En el análisis del árbol de máxima verosimilitud (Figura 11), identificamos el único nodo con respaldo estadístico que agrupa a este grupo con otro, específicamente el Grupo 4, que a su vez incluye al Grupo 1. Por otra parte, la red de haplotipos y las distancias genéticas K2-p indican que se encuentra más próximo al Grupo 3. Su distancia genética K2-p media intra-grupo fue la más alta ($2,7 \pm 1,0$). Esto puede verse reflejado en la red de haplotipos, donde podemos observar que hay haplotipos que se encuentran alejados entre sí por más de 30 pasos mutacionales (por ejemplo: H35 de H66 y H67). En este grupo, casi todos los haplotipos son de Louisiana, pero en todos los árboles, la red de haplotipos y las jerarquizaciones (GMYC y hierBAPS), se abarca un clado que reúne unos pocos haplotipos de estados más al norte como Tennessee (H78), Virginia (H79, H80), Alabama (H81) y Mississippi (H83) (Figura 12). Dado el gran sesgo que existe hacia el condado de Orleans (Louisiana) en este grupo, es importante incorporar ejemplares de localidades al norte de éste, para lograr una mejor comprensión de las relaciones entre sus taxa. Dentro del Grupo 2 encontramos los haplotipos obtenidos en el estudio de De la Rúa y colaboradores (2011), con excepción de los incluidos en el Grupo I (H31-34), los cuales fueron agrupados en el Grupo 3 por GMYC. Podemos ver que dentro del estado de Louisiana, más concretamente en la región que rodea a la ciudad de Nueva Orleans, coexisten distintos linajes de *T. sanguisuga*. Los Grupos IIA y IIB definidos por De la Rúa y colaboradores (2011) se encuentran dentro del Grupo 2. La división entre los mismos se mantiene, y coincide con la jerarquización de nivel 1 obtenida por hierBAPS, el cual separa al Grupo 2 de GMYC en dos subgrupos (Figura 11). Nuestro trabajo logra confirmar la propuesta de De la Rúa y colaboradores (2011) con respecto a la existencia de su Grupo II como tal y agregamos información valiosa con respecto a su historia evolutiva gracias a la incorporación de un mayor número de ejemplares de *T. sanguisuga*, con

una distribución más amplia y con diferentes metodologías de inferencia filogenéticas.

El Grupo 3 solamente está soportado como clado en el árbol bayesiano de *BEAST* (Figura 9). En el resto de los árboles no tiene soporte y, además, en el árbol de máxima verosimilitud (Figura 10) y en el árbol bayesiano de *MrBayes* (Figura 1, Anexo) está dividido en diferentes clados, siendo polifilético. En estos últimos 2 árboles, hubo haplotipos que formaron un único clado con un soporte significativo, separado del resto del conjunto de datos: el H34 en el bayesiano y H104 en el de máxima verosimilitud. Estos resultados pueden apreciarse en la red de haplotipos, en la cual no se encuentra clara la relación de estos haplotipos con el resto del grupo ya que se da a través de haplotipos hipotéticos y con cantidades de pasos similares a los obtenidos entre linajes (11 para H104 y 13 para H34) (Figura 12).

Cuando observamos al Grupo 4, vemos que la existencia de este grupo como tal está soportada estadísticamente únicamente en el árbol bayesiano generado por *BEAST*. Si bien los Grupos 2 y 3 presentan ejemplares de Texas, este es el único que es endémico de dicho estado. Con respecto a la clasificación de este grupo en nuestras inferencias filogenéticas, en el árbol calculado por máxima verosimilitud resultó parafilético con respecto al Grupo 1 (Figura 10), presentando el mayor conflicto frente a los agrupamientos por GMYC y hierBAPS. La relación con otros grupos tampoco es clara, aunque la distancia genética K2-p media (Tabla 1) y la red de haplotipos (Figura 12) indican que este grupo se encuentra más cercano al Grupo 1, las inferencias filogenéticas no permiten concluir estos resultados. Por otra parte, como ya mencionamos, vemos en todos los resultados que dentro de este grupo existe un agrupamiento de haplotipos identificados como *T. indictiva* (H15, H16 y H28), haplotipos que contienen tanto secuencias de *T. sanguisuga* como de *T. indictiva* (H18 y H19) y haplotipos cuyos ejemplares no pudieron ser distinguidos entre *T. sanguisuga* y *T. indictiva* (H17, H23 y H30) (incluidos en el trabajo de Kjos et al., 2013), y 40 haplotipos identificados como *T. sanguisuga*. A pesar de esto, es el grupo con la distancia genética media más baja a nivel interno (Tabla 1, Figura 11). Como mencionamos antes, estos resultados concuerdan con otros trabajos en los que se estudió a *T. sanguisuga* y *T. indictiva* (Curtis-Robles et al, 2018; Kjos et al., 2013).

Para aceptar la hipótesis de que el Grupo 1 es una especie diferente a la de los Grupos 2, 3 y 4, hacen falta numerosos estudios adicionales, con diferentes enfoques, que acompañen los resultados obtenidos en este trabajo. Si bien los resultados de distancias genéticas K2-p del *cytb* entre el Grupo 1 y los otros grupos logran superar el umbral interespecie propuesto por Monteiro y colaboradores (2004) y las inferencias filogenéticas muestran una monofilia del Grupo 1, una verdadera comprensión de las relaciones filogenéticas entre los distintos linajes, nos obliga a incorporar marcadores moleculares adicionales, marcadores morfológicos y aumentar los esfuerzos de muestreo. No obstante, resulta un buen ejercicio previo pensar cuáles serían las posibles causas que respalden un proceso de especiación de este grupo. Según Monteiro y colaboradores (2018), la mayoría de los estudios que se centran en la existencia de especies crípticas de triatomíneos utilizando marcadores moleculares a menudo se han basado en dos conceptos de especies: el Concepto Biológico de Especies (Mayr, 1963) y el Concepto Filogenético de Especies (Cracraft, 1989).

La especiación alopátrica parece ser la regla para la mayoría de los Reduviidae (Monteiro et al., 2018). La misma ocurre cuando una población ancestral se divide en al menos dos poblaciones hijas geográficamente aisladas; en las que el flujo génico entre las mismas está ausente o es irrelevante. Por lo tanto, estas poblaciones acumulan mutaciones de manera independiente, desarrollan cierto grado de divergencia genética y pueden llegar a estar genéticamente aisladas. Una especiación alopátrica completa puede ocurrir si las poblaciones de especies incipientes desarrollan barreras pre o postcigóticas para la reproducción (Mayr, 1978). Actualmente, no existen barreras geográficas evidentes entre las poblaciones del Grupo 1 y el resto de los grupos, pero es posible que haya existido una barrera ancestral que desapareció, seguida por la dispersión de las poblaciones divergentes y el origen de un contacto secundario entre ellas. Si bien una especiación alopátrica ancestral y un actual contacto secundario es plausible, debido a nuestro desconocimiento sobre barreras geográficas ancestrales entre las poblaciones dentro del Grupo 1 y las poblaciones que integran el resto de los grupos, podemos considerar modelos de especiación diferentes al alopátrico.

Tradicionalmente, los modos de especiación parapátrica y simpátrica fueron más controvertidos entre los biólogos moleculares, ya que se consideraba que el flujo

génico entre especies dificulta la divergencia poblacional (Jiggins, 2006); no obstante, hoy en día esto ha cambiado y se acepta que es común la especiación con flujo génico (Smajda y Butlin, 2011; Nosil y Flaxman, 2011). En un escenario de bajo flujo génico, es posible que las poblaciones diverjan mediante la fijación de mutaciones adaptativas a través de la selección positiva (Barrett et al., 2008; Nosil y Flaxman, 2011) o simplemente a través de la deriva genética en poblaciones pequeñas. En estos casos, la selección natural puede superar la homogeneización del genoma (impulsada por el flujo génico y la recombinación) al mantener reservorios genéticos aislados sin la necesidad de barreras geográficas (Turelli et al., 2001). La especiación parapátrica se puede explicar como una población ancestral que se convierte en dos especies hijas que ocupan rangos contiguos, mientras que la especiación simpátrica ocurre cuando los rangos geográficos de las especies hijas se superponen. En ambos casos, parece que la especiación está influenciada por la selección disruptiva, como consecuencia de favorecer la evolución de especies especializadas sobre las generalistas mediante la partición de nichos o la preferencia de microhábitats (Pavan et al., 2021).

Una potencial especiación ecológica en *T. sanguisuga* es posible y requiere evaluar los aspectos comportamentales de sus distintas poblaciones. Los triatomíneos se relacionan con sus microhábitats y hospedadores principalmente de dos maneras. Por un lado, los triatomíneos especialistas de nido, que se comportan en gran medida como forrajeros "quedarse y esperar" (del inglés *sit-and-wait*), asociados con los nidos de hospedadores específicos en los que se alimentan preferentemente. Por otra parte, los triatomíneos oportunistas, activos en la búsqueda de hospedadores bajo un forrajeo generalista, ocupan de manera estable y se reproducen en microhábitats discretos (por ejemplo, un afloramiento rocoso, un árbol o una corona de palma) y se alimentan de hospedadores potencialmente diversos independientemente de si los mismos realmente anidan allí (Abad-Franch y Gurgel-Gonçalves, 2021). *T. sanguisuga* muestra un comportamiento mixto en su relación con hospedadores y/o microhábitats; las poblaciones occidentales (de las llanuras secas del centro-sur de los Estados Unidos y el mezquital semiárido de Tamaulipas, México) están considerablemente asociadas con los nidos del roedor *Neotoma micropus*, mientras que las poblaciones orientales (del sureste más húmedo de los Estados Unidos) infestan los nidos de *Neotoma floridana* pero también se encuentran en árboles huecos o muertos (con ardillas, mapaches y zarigüeyas), cavidades de raíces (con

armadillos) y palmas del género *Sabal* (con ranas arbóreas). Tanto las poblaciones occidentales como orientales de *T. sanguisuga* también pueden encontrarse con ratones de algodón *Sigmodon sp.* y entre rocas (Abad-Franch et al., 2021).

En *T. sanguisuga*, se ha encontrado una alta variabilidad ecológica. Diversos estudios realizados en distintas localidades han observado que esta especie presenta diferentes nichos asociados a la dieta (Kjos et al., 2013; Waleckx et al., 2014; Dumonteil et al., 2020; Beatty et al., 2022). No obstante, los estudios son escasos y no brindan evidencias directas que respalden la especiación parapátrica basada en preferencias de microhábitat y hospedero en el caso de *T. sanguisuga*. A pesar de esto, la variabilidad observada en las ingestas sugiere la posibilidad de un proceso evolutivo que podría contribuir a la divergencia genética del Grupo 1. En este contexto, resaltamos la imperante necesidad de realizar estudios más exhaustivos que permitan obtener conclusiones robustas sobre las preferencias de hospederos y microhábitats en diversas poblaciones de *T. sanguisuga*.

La clasificación e identificación de grupos de organismos ha sido un eje importante a través del cual ha avanzado la investigación en ciencias biológicas. Con respecto a los triatominos, una acertada clasificación parece ser especialmente relevante si se desean realizar estudios epidemiológicos certeros que permitan elaborar programas de monitoreo y erradicación de la enfermedad de Chagas (Abad-Franch y Monteiro, 2005). El control de la enfermedad de Chagas depende fundamentalmente del manejo integrado de sus vectores. Los programas de control vectorial pueden ser mejorados significativamente con un mayor conocimiento sobre la biología de los vectores. Entre otros aspectos, la correcta identificación de las especies y/o poblaciones es crucial para lograr identificar aquellas que requieren un mayor esfuerzo en el manejo, para así aumentar la eficiencia en la eliminación de la transmisión de *T. cruzi* en humanos (Gourbière et al., 2012). La importancia de la transmisión por vectores genera una necesidad constante de desarrollar y optimizar estrategias de control de vectores para mantenerse al ritmo de los escenarios epidemiológicos en constante cambio. Es por eso que es tan importante profundizar en el conocimiento de la estructura poblacional y el flujo génico de los triatominos, junto con la detección de taxones crípticos (similares morfológicamente pero genéticamente diferentes) que podrían exhibir capacidades vectoriales diferentes (Stevens y Dorn, 2017). La importancia de este trabajo parte del objetivo de

identificar la variación genética de una especie muy escasamente estudiada como *T. sanguisuga*. Este nivel de diversidad genética y estructuración poblacional encontradas nunca habían sido reportadas para esta especie tan ampliamente distribuida en el continente norteamericano. El grado de divergencia detectada en una población del estado de Florida, con respecto al resto de los grupos caracterizados, nos permite pensar en la posibilidad de estar frente a una especie hermana de *T. sanguisuga*. Una nueva especie de triatomino puede ser capaz de presentar capacidades vectoriales propias que la diferencien de *T. sanguisuga*, obligando a diseñar nuevas, o rediseñar, estrategias de control vectorial en Estados Unidos.

Conclusiones

Nuestros resultados revelan una alta diversidad genética dentro de la especie *T. sanguisuga*, con distancias genéticas superiores al umbral para la designación de diferentes especies de triatomíneos.

T. sanguisuga presenta una fuerte estructuración poblacional, con cuatro grupos claramente diferenciados entre sí. La estructuración no se encuentra determinada por factores geográficos evidentes, por lo que deben considerarse factores ecológicos alternativos que expliquen la divergencia.

Los resultados de este trabajo indican que *T. sanguisuga* y *T. indictiva* presentan relaciones filogenéticas que las agrupa como una misma especie. A partir de esto, deberá evaluarse la precisión de la identificación morfológica de las secuencias de GenBank identificadas como *T. indictiva*.

Perspectivas

- Incorporar más individuos provenientes tanto de las mismas localidades utilizadas en este estudio, como de nuevos sitios de muestreo. Reducir el espacio entre las colectas puede ayudarnos a obtener un panorama más completo de la variabilidad de los linajes obtenidos.
- Realizar análisis filogenéticos adicionales con marcadores genéticos con distintas tasas evolutivas, ya sean mitocondriales como el *citocromo oxidasa I* (*coi*), o nucleares como el Espaciador Transcripto Interno (ITS), con el fin de aumentar la señal filogenética del análisis y permitir resoluciones no ambiguas. También realizar estudios de variabilidad genética a nivel genómico, mediante la determinación de SNPs, utilizando técnicas de “Next Generation Sequencing” como RAD-Seq que permitan identificar eventos de introgresión o hibridación interespecífica.
- Llevar a cabo estudios citogenéticos con marcadores tradicionalmente utilizados en triatominos, como la distribución de heterocromatina constitutiva o la posición del cistrón ribosomal 45S, para identificar variaciones cromosómicas específicas entre las poblaciones en estudio.
- Implementar análisis morfométricos de los ejemplares colectados en distintas localidades, acompañados de una minuciosa caracterización ecológica de los mismos, con énfasis en detectar preferencias de microhábitat y/o hospedero, para la realización de análisis multivariados de variables moleculares, citogenéticas, morfológicas y ecológicas.
- Generar cruzamientos experimentales entre adultos del Grupo 1 con adultos de los grupos restantes y entre adultos de *T. sanguisuga* y adultos de *T. indictiva*. En caso de obtener descendencia, ejecutar análisis citogenéticos de la meiosis en los híbridos resultantes, para determinar si existen mecanismos de aislamiento reproductivo.

Anexos

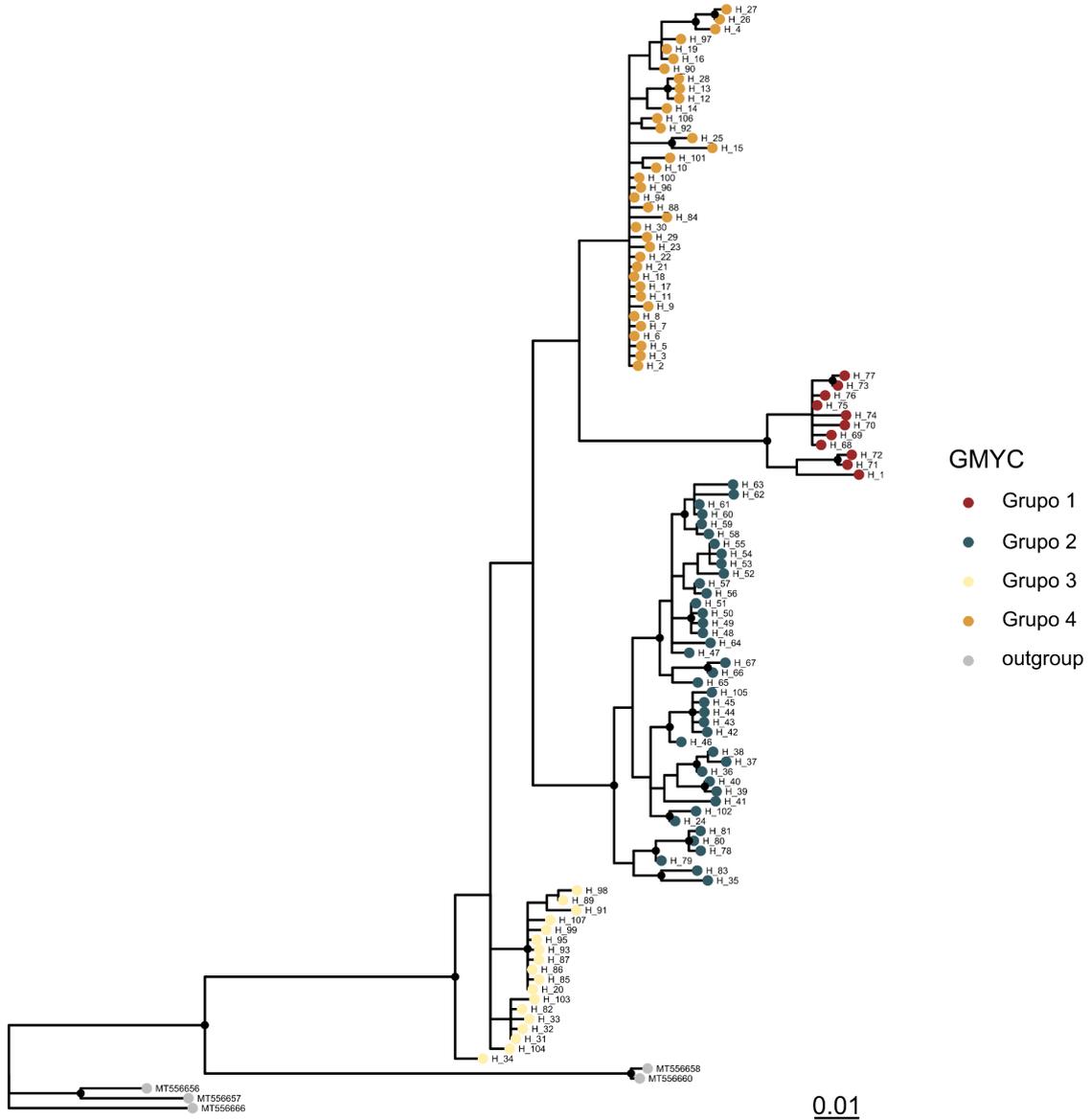


Figura 1, Anexo. Árbol filogenético bayesiano obtenido en el programa *MrBayes* a partir de un fragmento de *citocromo b* (*cytb*) de ejemplares de *T. sanguisuga*, *T. indictiva* y *T. sp.* Los círculos negros indican nodos con probabilidad posterior mayor a 0,95. Se indican los grupos delimitados por GMYC: Grupo 1 (rojo), Grupo 2 (verde oscuro), Grupo 3 (amarillo) y Grupo 4 (anaranjado).

Tabla 1, Anexo. Distribución geográfica de secuencias utilizadas. Se indica el estado de Estados Unidos. Condado dentro de cada estado. Identificación morfológica de la especie capturada. Número de identificación de la colecta; si fue tomado de GenBank, se indica el *accession number*. Haplotipo del *citocromo b (cytb)*. Grupo asignado por delimitación GMYC.

Estado	Condado	Identificación morfológica	Individuo	Haplotipo <i>cytb</i>	Grupo GMYC
Alabama	Blount	<i>T. sanguisuga</i>	9291	H_81	2
Florida	Alachua	<i>T. sanguisuga</i>	9301	H_77	1
Florida	Alachua	<i>T. sanguisuga</i>	9302	H_76	1
Florida	Alachua	<i>T. sanguisuga</i>	9309	H_69	1
Florida	Alachua	<i>T. sanguisuga</i>	9310	H_68	1
Florida	Highlands	<i>T. sanguisuga</i>	NC_050329	H_1	1
Florida	Lafayette	<i>T. sanguisuga</i>	9306	H_72	1
Florida	Lafayette	<i>T. sanguisuga</i>	9307	H_71	1
Florida	Levy	<i>T. sanguisuga</i>	9303	H_75	1
Florida	Levy	<i>T. sanguisuga</i>	9304	H_74	1
Florida	Putnam	<i>T. sanguisuga</i>	9305	H_73	1
Florida	Union	<i>T. sanguisuga</i>	9308	H_70	1
Louisiana	Iberville	<i>T. sanguisuga</i>	HQ141304	H_44	2
Louisiana	Orleans	<i>T. sanguisuga</i>	HQ141280	H_67	2
Louisiana	Orleans	<i>T. sanguisuga</i>	HQ141281	H_66	2
Louisiana	Orleans	<i>T. sanguisuga</i>	HQ141282	H_65	2
Louisiana	Orleans	<i>T. sanguisuga</i>	HQ141283	H_65	2
Louisiana	Orleans	<i>T. sanguisuga</i>	HQ141284	H_64	2
Louisiana	Orleans	<i>T. sanguisuga</i>	HQ141285	H_63	2
Louisiana	Orleans	<i>T. sanguisuga</i>	HQ141286	H_62	2
Louisiana	Orleans	<i>T. sanguisuga</i>	HQ141287	H_61	2
Louisiana	Orleans	<i>T. sanguisuga</i>	HQ141288	H_60	2
Louisiana	Orleans	<i>T. sanguisuga</i>	HQ141289	H_59	2
Louisiana	Orleans	<i>T. sanguisuga</i>	HQ141290	H_58	2
Louisiana	Orleans	<i>T. sanguisuga</i>	HQ141291	H_57	2
Louisiana	Orleans	<i>T. sanguisuga</i>	HQ141292	H_56	2
Louisiana	Orleans	<i>T. sanguisuga</i>	HQ141293	H_55	2
Louisiana	Orleans	<i>T. sanguisuga</i>	HQ141294	H_54	2
Louisiana	Orleans	<i>T. sanguisuga</i>	HQ141295	H_53	2
Louisiana	Orleans	<i>T. sanguisuga</i>	HQ141296	H_52	2
Louisiana	Orleans	<i>T. sanguisuga</i>	HQ141297	H_51	2
Louisiana	Orleans	<i>T. sanguisuga</i>	HQ141298	H_50	2

Louisiana	Orleans	<i>T. sanguisuga</i>	HQ141299	H_49	2
Louisiana	Orleans	<i>T. sanguisuga</i>	HQ141300	H_48	2
Louisiana	Orleans	<i>T. sanguisuga</i>	HQ141301	H_47	2
Louisiana	Orleans	<i>T. sanguisuga</i>	HQ141302	H_46	2
Louisiana	Orleans	<i>T. sanguisuga</i>	HQ141303	H_45	2
Louisiana	Orleans	<i>T. sanguisuga</i>	HQ141305	H_43	2
Louisiana	Orleans	<i>T. sanguisuga</i>	HQ141306	H_42	2
Louisiana	Orleans	<i>T. sanguisuga</i>	HQ141307	H_41	2
Louisiana	Orleans	<i>T. sanguisuga</i>	HQ141308	H_40	2
Louisiana	Orleans	<i>T. sanguisuga</i>	HQ141309	H_39	2
Louisiana	Orleans	<i>T. sanguisuga</i>	HQ141310	H_38	2
Louisiana	Orleans	<i>T. sanguisuga</i>	HQ141311	H_37	2
Louisiana	Orleans	<i>T. sanguisuga</i>	HQ141312	H_36	2
Louisiana	Orleans	<i>T. sanguisuga</i>	HQ141313	H_35	2
Louisiana	Orleans	<i>T. sanguisuga</i>	HQ141314	H_34	3
Louisiana	Orleans	<i>T. sanguisuga</i>	HQ141315	H_33	3
Louisiana	Orleans	<i>T. sanguisuga</i>	HQ141316	H_32	3
Louisiana	Orleans	<i>T. sanguisuga</i>	HQ141317	H_31	3
Mississippi	Jackson	<i>T. sanguisuga</i>	9289	H_83	2
Mississippi	Union	<i>T. sanguisuga</i>	9290	H_82	3
Tennessee	Hamilton	<i>T. sanguisuga</i>	9297	H_78	2
Tennessee	White	<i>T. sanguisuga</i>	9293	H_31	3
Texas	Grayson	<i>T. sanguisuga</i>	9264	H_102	2
Texas	Desconocido	<i>T. sanguisuga</i>	9009	H_105	2
Texas	Desconocido	<i>T. sanguisuga</i>	KY305702	H_24	2
Texas	Burleson	<i>T. sanguisuga</i>	9270	H_20	3
Texas	Collin	<i>T. sanguisuga</i>	9284	H_86	3
Texas	Fannin	<i>T. sanguisuga</i>	9263	H_103	3
Texas	Fort Bend	<i>T. sanguisuga</i>	9278	H_91	3
Texas	Grimes	<i>T. sanguisuga</i>	9262	H_20	3
Texas	Harris	<i>T. sanguisuga</i>	9273	H_95	3
Texas	McLennan	<i>T. sanguisuga</i>	9280	H_89	3
Texas	Montgomery	<i>T. sanguisuga</i>	9285	H_85	3
Texas	Robertson	<i>T. sanguisuga</i>	9267	H_99	3
Texas	San Saba	<i>T. sanguisuga</i>	9283	H_87	3
Texas	Somervell	<i>T. sanguisuga</i>	9268	H_98	3

Texas	Upshur	<i>T. sanguisuga</i>	9282	H_31	3
Texas	Waller	<i>T. sanguisuga</i>	9275	H_93	3
Texas	Desconocido	<i>T. sanguisuga</i>	9010	H_104	3
Texas	Desconocido	<i>T. sanguisuga</i>	9003	H_107	3
Texas	Desconocido	<i>T. sp.</i>	KY305719	H_20	3
Texas	Atascosa	<i>T. sanguisuga</i>	KY305708	H_22	4
Texas	Blanco	<i>T. sanguisuga</i>	KY305698	H_25	4
Texas	Caldwell	<i>T. sanguisuga</i>	MT702374	H_6	4
Texas	Caldwell	<i>T. sanguisuga</i>	MT702375	H_6	4
Texas	Caldwell	<i>T. sanguisuga</i>	MT702376	H_5	4
Texas	Comal	<i>T. sp.</i>	KF188643	H_30	4
Texas	Comal	<i>T. sp.</i>	KF188652	H_30	4
Texas	Comal	<i>T. sp.</i>	KF188654	H_30	4
Texas	Fayette	<i>T. sanguisuga</i>	9272	H_96	4
Texas	Guadalupe	<i>T. sanguisuga</i>	MT702367	H_2	4
Texas	Guadalupe	<i>T. sanguisuga</i>	MT702368	H_10	4
Texas	Guadalupe	<i>T. sanguisuga</i>	MT702371	H_7	4
Texas	Guadalupe	<i>T. sanguisuga</i>	MT702377	H_4	4
Texas	Guadalupe	<i>T. sanguisuga</i>	MT702380	H_3	4
Texas	Guadalupe	<i>T. sanguisuga</i>	MT702381	H_2	4
Texas	Hamilton	<i>T. sanguisuga</i>	KY305721	H_18	4
Texas	Hays	<i>T. sanguisuga</i>	KY305689	H_29	4
Texas	Hays	<i>T. sanguisuga</i>	MT702362	H_14	4
Texas	Hays	<i>T. sanguisuga</i>	MT702363	H_13	4
Texas	Hays	<i>T. sanguisuga</i>	MT702364	H_11	4
Texas	Hays	<i>T. sanguisuga</i>	MT702365	H_12	4
Texas	Hays	<i>T. sanguisuga</i>	MT702366	H_11	4
Texas	Hays	<i>T. sanguisuga</i>	MT702369	H_9	4
Texas	Hays	<i>T. sanguisuga</i>	MT702370	H_8	4
Texas	Kendall	<i>T. sanguisuga</i>	9274	H_94	4
Texas	Lampasas	<i>T. sanguisuga</i>	9279	H_90	4
Texas	Lavaca	<i>T. sanguisuga</i>	9265	H_101	4
Texas	Lee	<i>T. sanguisuga</i>	9288	H_84	4
Texas	Lubbock	<i>T. sanguisuga</i>	9266	H_100	4
Texas	Stephens	<i>T. sanguisuga</i>	9269	H_97	4
Texas	Travis	<i>T. sanguisuga</i>	9281	H_88	4

Texas	Uvalde	<i>T. sanguisuga</i>	KY305693	H_26	4
Texas	Uvalde	<i>T. sanguisuga</i>	KY305695	H_27	4
Texas	Uvalde	<i>T. sanguisuga</i>	KY305696	H_26	4
Texas	Williamson	<i>T. sanguisuga</i>	KY305717	H_21	4
Texas	Wilson	<i>T. sanguisuga</i>	9276	H_92	4
Texas	Desconocido	<i>T. sanguisuga</i>	9007	H_106	4
Texas	Desconocido	<i>T. sanguisuga</i>	9294	H_19	4
Texas	Desconocido	<i>T. indictiva</i>	KY305690	H_28	4
Texas	Desconocido	<i>T. indictiva</i>	KY305691	H_18	4
Texas	Desconocido	<i>T. sp.</i>	KY305706	H_23	4
Texas	Desconocido	<i>T. indictiva</i>	KY305720	H_19	4
Texas	Desconocido	<i>T. sp.</i>	KY305722	H_17	4
Texas	Desconocido	<i>T. indictiva</i>	KY305724	H_16	4
Texas	Desconocido	<i>T. indictiva</i>	KY305730	H_15	4
Texas	Desconocido	<i>T. indictiva</i>	KY305731	H_15	4
Texas	Desconocido	<i>T. indictiva</i>	KY305732	H_15	4
Texas	Desconocido	<i>T. indictiva</i>	KY305733	H_15	4
Virginia	Henrico	<i>T. sanguisuga</i>	9296	H_79	2
Virginia	Montgomery	<i>T. sanguisuga</i>	9292	H_80	2
Virginia Occidental	Monongalia	<i>T. sanguisuga</i>	9295	H_31	3

Tabla 2, Anexo. Distancia genética media (%), según el modelo K2-p, entre el Grupo 1 definido utilizando GMYC y el resto del conjunto de datos.

	1	R
Grupo 1	2,2±1,3	-
Resto	8,3±1,1	4,6±2,2

Bibliografía

AABB. Chagas Biovigilance Network [updated December 20, 2019. Available from: <http://www.aabb.org/research/hemovigilance/Pages/chagas.aspx>

Abad-Franch, F., & Monteiro, F. A. (2005). Molecular research and the control of Chagas disease vectors. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, *77*, 437-454.

Abad-Franch, F., Monteiro, F. A., Jaramillo, N., Gurgel-Gonçalves, R., Dias, F. B. S., & Diotaiuti, L. (2009). Ecology, evolution, and the long-term surveillance of vector-borne Chagas disease: a multi-scale appraisal of the tribe Rhodniini (Triatominae). *Acta Tropica*, *110*(2-3), 159-177.

Abad-Franch, F., Monteiro, F. A., Pavan, M. G., Patterson, J. S., Bargues, M. D., Zuriaga, M. Á., ... & Miles, M. A. (2021). Under pressure: phenotypic divergence and convergence associated with microhabitat adaptations in Triatominae. *Parasites & vectors*, *14*, 1-21.

Abad-Franch, F., & Gurgel-Gonçalves, R. (2021). The ecology and natural history of wild Triatominae in the Americas. In *Triatominae-The Biology of Chagas Disease Vectors* (pp. 387-445). Cham: Springer International Publishing.

Aguilera-Urbe, M., Meza-Lázaro, R. N., Kieran, T. J., Ibarra-Cerdeña, C. N., & Zaldívar-Riverón, A. (2020). Phylogeny of the North-Central American clade of blood-sucking reduviid bugs of the tribe Triatomini (Hemiptera: Triatominae) based on the mitochondrial genome. *Infection, Genetics and Evolution*, *84*, 104373.

Alevi, K.C.C., de Oliveira, J., Garcia, A.C.C., Cristal, D.C., Delgado, L.M.G., de Freitas Bittinelli, I. et al. (2020) *Triatoma rosai* sp. nov. (Hemiptera, Triatominae): a new species of Argentinian Chagas disease vector described based on integrative taxonomy. *Insects*, *11*, 830.

Almeida, C. E., Pacheco, R. S., Haag, K., Dupas, S., Dotson, E. M., & Costa, J. (2008). Inferring from the Cyt B gene the *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) genetic structure and domiciliary infestation in the state of Paraíba, Brazil.

Bargues, M. D., Klisiowicz, D. R., Gonzalez-Candelas, F., Ramsey, J. M., Monroy, C., Ponce, C., ... & Mas-Coma, S. (2008). Phylogeography and genetic variation of

Triatoma dimidiata, the main Chagas disease vector in Central America, and its position within the genus *Triatoma*. *PLoS neglected tropical diseases*, 2(5), e233.

Beatty, N. L., Bhosale, C. R., White, Z., Torhorst, C., Wilson, K., Dorleans, R., & Stenn, T. (2022, November). Florida kissing bugs (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) invade homes, feed on diverse hosts, and harbor *Trypanosoma cruzi*. In *American Society of Tropical Medicine and Hygiene 71st Annual Scientific Meeting*.

Beatty, N. L., Bhosale, C. R., Torhorst, C. W., Burkett-Cadena, N. D., Oi, F. M., Forsyth, C. J., & Wisely, S. M. (2023). Integrated pest management strategies targeting the Florida kissing bug, *Triatoma sanguisuga*: Preventing this vector of Chagas disease from invading your home. *Current Research in Parasitology & Vector-Borne Diseases*, 100144.

Bargues, M. D., Schofield, C. J., & Dujardin, J. P. (2010). Classification and phylogeny of the Triatominae. In *American Trypanosomiasis* (pp. 117-147). Elsevier.

Barrett, R. D., Rogers, S. M., & Schluter, D. (2008). Natural selection on a major armor gene in threespine stickleback. *Science*, 322(5899), 255-257.

Bern, C., Messenger, L. A., Whitman, J. D., & Maguire, J. H. (2019). Chagas disease in the United States: a public health approach. *Clinical microbiology reviews*, 33(1), 10-1128.

Bouckaert, R., Vaughan, T. G., Barido-Sottani, J., Duchêne, S., Fourment, M., Gavryushkina, A., ... & Drummond, A. J. (2019). BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS computational biology*, 15(4), e1006650.

Brooks, D. R., and D. A. McLennan. 2002. The nature of diversity. University of Chicago Press, Chicago. 668 p.

Brooks, D. R., Bilewitch, J., Condy, C., Evans, D. C., Folinsbee, K. E., Fröbisch, J., ... & Zanatta, D. (2007). Quantitative phylogenetic analysis in the 21st century. *Revista mexicana de biodiversidad*, 78(2), 225-252.

Campos-Soto, R., Díaz-Campusano, G., Rives-Blanchard, N., Cianferoni, F., & Torres-Pérez, F. (2020). Biogeographic origin and phylogenetic relationships of *Mepraia* (Hemiptera, Reduviidae) on islands of northern Chile. *PLoS One*, 15(6), e0234056.

Catalá, S. S., Noireau, F., & Dujardin, J. P. (2017). Biology of triatominae. In *American Trypanosomiasis Chagas Disease* (pp. 145-167). Elsevier.

Cesa, K., Caillouet, K. A., Dorn, P. L., & Wesson, D. M. (2011). High *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) prevalence in *Triatoma sanguisuga* (Hemiptera: Reduviidae) in southeastern Louisiana. *Journal of medical entomology*, 48(5), 1091-1094.

Chagas, C. (1909). Über eine neue Trypanosomiasis des Menschen.

Cheng, L., Connor, T. R., Sirén, J., Aanensen, D. M., & Corander, J. (2013). Hierarchical and spatially explicit clustering of DNA sequences with BAPS software. *Molecular biology and evolution*, 30(5), 1224-1228.

Cracraft, J. (1989). Speciation and its ontology: the empirical consequences of alternative species concepts for understanding patterns and processes of differentiation. *Speciation and its Consequences*, 28, 59.

Curtis-Robles, R., Hamer, S. A., Lane, S., Levy, M. Z., & Hamer, G. L. (2018). Bionomics and spatial distribution of triatomine vectors of *Trypanosoma cruzi* in Texas and other southern states, USA. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 98(1), 113.

Da Rosa, J. A., Rocha, C. S., Gardim, S., Pinto, M. C., Mendonca, V. J., Ferreira Filho, J. C. R., ... & Almeida, C. E. (2012). Description of *Rhodnius montenegrensis* n. sp. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the state of Rondônia, Brazil. *Zootaxa*, 3478(1), 62-76.

de Bona, S., Chi, H., Bustamante, R. O., & Botto-Mahan, C. (2023). *Trypanosoma cruzi* infection reduces the population fitness of *Mepraia spinolai*, a Chagas disease vector. *Medical and Veterinary Entomology*.

De la Rua, N., Stevens, L., & Dorn, P. L. (2011). High genetic diversity in a single population of *Triatoma sanguisuga* (LeConte, 1855) inferred from two mitochondrial markers: cytochrome b and 16S ribosomal DNA. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(3), 671-677.

Dias, F. B. S., Jaramillo-O, N., & Diotaiuti, L. (2014). Description and characterization of the melanic morphotype of *Rhodnius nasutus* Stål, 1859 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 47, 637-641.

Diaz, S., Panzera, F., Jaramillo-O, N., Perez, R., Fernandez, R., Vallejo, G., ... & Gomez-Palacio, A. (2014). Genetic, cytogenetic and morphological trends in the evolution of the *Rhodnius* (Triatominae: Rhodniini) trans-Andean group. *Plos one*, 9(2), e87493.

Dorn, P. L., Perniciaro, L., Yabsley, M. J., Roellig, D. M., Balsamo, G., Diaz, J., & Wesson, D. (2007). Autochthonous transmission of *Trypanosoma cruzi*, Louisiana. *Emerging infectious diseases*, 13(4), 605.

Dorn, P.L., Justi, S.A., Dale, C., Stevens, L., Galvão, C., Lima-Cordon, R. et al. (2018) Description of *Triatoma mopan* sp. n. from a cave in Belize (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *ZooKeys*, 775, 69–95.

Dujardin, J. P., Costa, J., Bustamante, D., Jaramillo, N., & Catalá, S. (2009). Deciphering morphology in Triatominae: the evolutionary signals. *Acta Tropica*, 110(2-3), 101-111.

Dumonteil, E., Pronovost, H., Bierman, E. F., Sanford, A., Majeau, A., Moore, R., & Herrera, C. (2020). Interactions among *Triatoma sanguisuga* blood feeding sources, gut microbiota and *Trypanosoma cruzi* diversity in southern Louisiana. *Molecular ecology*, 29(19), 3747-3761.

Ezard, T., Fujisawa, T., & Barraclough, T. G. (2009). Splits: species' limits by threshold statistics. *R package version*, 1(11), r29.

Fitzpatrick, S., Feliciangeli, M. D., Sanchez-Martin, M. J., Monteiro, F. A., & Miles, M. A. (2008). Molecular genetics reveal that silvatic *Rhodnius prolixus* do colonise rural houses. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2(4), e210.

Galvão, C., & Justi, S. A. (2015). An overview on the ecology of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). *Acta Tropica*, 151, 116-125.

Galvão, C. (2021). Taxonomy. In *Triatominae-The Biology of Chagas Disease Vectors* (pp. 15-38). Cham: Springer International Publishing.

Garcia, M. N., Burroughs, H., Gorchakov, R., Gunter, S. M., Dumonteil, E., Murray, K. O., & Herrera, C. P. (2017). Molecular identification and genotyping of *Trypanosoma cruzi* DNA in autochthonous Chagas disease patients from Texas, USA. *Infection, genetics and evolution*, 49, 151-156.

Gascon, J., Bern, C., & Pinazo, M. J. (2010). Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta tropica*, 115(1-2), 22-27.

Geospiza, I. (2009). FinchTV 1.4. 0. (<http://www.geospiza.com>).

Gil-Santana, H. R., Chavez, T., Pita, S., Panzera, F., & Galvão, C. (2022). *Panstrongylus noireau*, a remarkable new species of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) from Bolivia. *Zookeys* 1104: 203–225.

Giordano, R., Cortez, J. C. P., Paulk, S., & Stevens, L. (2005). Genetic diversity of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in Chuquisaca, Bolivia based on the mitochondrial cytochrome b gene. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100, 753-760.

Godfray, H. C. J. (2002). Challenges for taxonomy. *Nature*, 417(6884), 17-19.

Gómez-Palacio, A., Pita, S., Abad-Franch, F., Monsalve, Y., Cantillo-Barraza, O., Monteiro, F. A., ... & Panzera, F. (2023). Molecular and cytogenetic evidence for sibling species in the Chagas disease vector *Triatoma maculata*. *Medical and Veterinary Entomology*, 37(2), 316-329.

Gourbière, S., Dorn, P., Tripet, F., & Dumonteil, E. (2012). Genetics and evolution of triatomines: from phylogeny to vector control. *Heredity*, 108(3), 190-202.

Guarneri, A., & Lorenzo, M. (Eds.). (2021). *Triatominae-The biology of chagas disease vectors* (pp. 345-386). Cham: Springer.

Hamilton, P. B., & Stevens, J. R. (2017). Classification and phylogeny of *Trypanosoma cruzi*. In *American Trypanosomiasis Chagas Disease* (pp. 321-344). Elsevier.

Hernández, M. L., Abrahan, L. B., Dujardin, J. P., Gorla, D. E., & Catalá, S. S. (2011). Phenotypic variability and population structure of peridomestic *Triatoma infestans* in rural areas of the arid Chaco (western Argentina): spatial influence of macro-and microhabitats. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11(5), 503-513.

Hodo, C. L., & Hamer, S. A. (2017). Toward an ecological framework for assessing reservoirs of vector-borne pathogens: wildlife reservoirs of *Trypanosoma cruzi* across the southern United States. *ILAR journal*, 58(3), 379-392.

Jiggins, C. D. (2006). Sympatric speciation: why the controversy?. *Current Biology*, 16(9), R333-R334.

Justi, S. A., Russo, C. A., Mallet, J. R. D. S., Obara, M. T., & Galvão, C. (2014). Molecular phylogeny of Triatomini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Parasites & vectors*, 7, 1-12.

Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution*, 30(4), 772-780.

Kieran, T. J., Bayona-Vásquez, N. J., Varian, C. P., Saldaña, A., Samudio, F., Calzada, J. E., ... & Glenn, T. C. (2020). Population genetics of two chromatic

morphs of the Chagas disease vector *Rhodnius pallescens* Barber, 1932 in Panamá. *Infection, Genetics and Evolution*, 84, 104369.

Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution*, 16, 111-120.

Kjos, S. A., Marcet, P. L., Yabsley, M. J., Kitron, U., Snowden, K. F., Logan, K. S., ... & Dotson, E. M. (2013). Identification of bloodmeal sources and *Trypanosoma cruzi* infection in triatomine bugs (Hemiptera: Reduviidae) from residential settings in Texas, the United States. *Journal of medical entomology*, 50(5), 1126-1139.

Lanave, C., Preparata, G., Sacone, C., & Serio, G. (1984). A new method for calculating evolutionary substitution rates. *Journal of molecular evolution*, 20, 86-93.

Lee, B. Y., Bacon, K. M., Bottazzi, M. E., & Hotez, P. J. (2013). Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *The Lancet infectious diseases*, 13(4), 342-348.

Leigh, J. W., & Bryant, D. (2015). POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in ecology and evolution*, 6(9), 1110-1116.

Lent, H., & Wygodzinsky, P. (1979). Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bulletin of the American museum of Natural History*, 163(3), 123-520.

Lima-Cordon, R.A., Monroy, M.C., Stevens, L., Rodas, A., Rodas, G.A., Dorn, P.L. et al. (2019) Description of *Triatoma huehuetenanguensis* sp. n., a potential Chagas disease vector (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *ZooKeys*, 820, 51–70.

Manne-Goehler, J., Umeh, C. A., Montgomery, S. P., & Wirtz, V. J. (2016). Estimating the burden of Chagas disease in the United States. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(11), e0005033.

Mas-Coma, S., & Bargues, M. D. (2009). Populations, hybrids and the systematic concepts of species and subspecies in Chagas disease triatomine vectors inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA. *Acta Tropica*, 110(2-3), 112-136.

Mayr, E. (1963). *Animal species and evolution*. Harvard University Press.

Mayr, E. (1978). *Modes of speciation*.

Mead, F. W. (1965). The blood-sucking conenose (Hemiptera: Reduviidae). *Florida Dept. Agr. Ent. Cir*, (33), 2.

Moncayo, Á., & Silveira, A. C. (2009). Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*, 104: 17-30.

Monteiro, F. A., Barrett, T. V., Fitzpatrick, S., Cordon-Rosales, C., Feliciangeli, D., & Beard, C. B. (2003). Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. *Molecular ecology*, 12(4), 997-1006.

Monteiro, F. A., Donnelly, M. J., Beard, C. B., & Costa, J. (2004). Nested clade and phylogeographic analyses of the Chagas disease vector *Triatoma brasiliensis* in Northeast Brazil. *Molecular phylogenetics and evolution*, 32(1), 46-56.

Monteiro, F. A., Peretolchina, T., Lazoski, C., Harris, K., Dotson, E. M., Abad-Franch, F., ... & Marcet, P. L. (2013). Phylogeographic pattern and extensive mitochondrial DNA divergence disclose a species complex within the Chagas disease vector *Triatoma dimidiata*. *PloS one*, 8(8), e70974.

Monteiro, F. A., Weirauch, C., Felix, M., Lazoski, C., & Abad-Franch, F. (2018). Evolution, systematics, and biogeography of the Triatominae, vectors of Chagas disease. *Advances in parasitology*, 99, 265-344.

Murray, C. J., Vos, T., Lozano, R., Naghavi, M., Flaxman, A. D., Michaud, C., ... & Haring, D. (2012). Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The lancet*, 380(9859), 2197-2223.

Nattero, J., Malerba, R., Rodríguez, C. S., & Crocco, L. (2013). Phenotypic plasticity in response to food source in *Triatoma infestans* (Klug, 1834)(Hemiptera, Reduviidae: Triatominae). *Infection, Genetics and Evolution*, 19, 38-44.

Nattero, J., Pita, S., Calleros, L., Crocco, L., Panzera, Y., Rodriguez, C. S., & Panzera, F. (2016). Morphological and genetic differentiation within the southernmost vector of Chagas disease: *Triatoma patagonica* (Hemiptera–Reduviidae). *PLoS One*, 11(12), e0168853.

Nattero, J., Piccinali, R. V., Macedo Lopes, C., Hernández, M. L., Abrahan, L., Lobbia, P. A., ... & Carbajal de la Fuente, A. L. (2017). Morphometric variability among the species of the *Sordida* subcomplex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae): evidence for differentiation across the distribution range of *Triatoma sordida*. *Parasites & vectors*, 10, 1-14.

Neiva, A. (1912). Notas de entomología médica e descrição de duas novas espécies de *Triatomas* norte-americanas. *Brasil-Médico*, 26, 21-22.

Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., Von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular biology and evolution*, 32(1), 268-274.

Nielsen, D. H., Koch, K., Roachell, W., Delgado, B., & Bast, J. (2021). First record of an established population of *Triatoma sanguisuga* (Hemiptera: Reduviidae) in Richardson County, Nebraska. *Journal of Medical Entomology*, 58(6), 2519-2523.

Noireau, F., Flores, R., Gutierrez, T., & Dujardin, J. P. (1997). Detection of sylvatic dark morphs of *Triatoma infestans* in the Bolivian Chaco. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 92, 583-584.

Nosil, P., & Flaxman, S. M. (2011). Conditions for mutation-order speciation. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278(1704), 399-407.

Ochs, D. E., Hnilica, V. S., Moser, D. R., Smith, J. H., & Kirchhoff, L. V. (1996). Postmortem diagnosis of autochthonous acute chagasic myocarditis by polymerase chain reaction amplification of a species-specific DNA sequence of *Trypanosoma cruzi*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 54(5), 526-529.

Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., ... & Wagner, H. (2022). vegan: Community Ecology Package. R package version 2.5-7. 2020. *Preprint at*, 3-1.

Orr, H. A. (1995). The population genetics of speciation: the evolution of hybrid incompatibilities. *Genetics*, 139(4), 1805-1813.

Otálora-Luna, F., Pérez-Sánchez, A. J., Sandoval, C., & Aldana, E. (2015). Evolution of hematophagous habit in Triatominae (Heteroptera: Reduviidae). *Revista chilena de historia natural*, 88, 1-13.

Panzer, F., Hornos, S., Pereira, J., Cestau, R., Canale, D., Diotaiuti, L., Dujardin, J. P. & Perez, R. (1997). Genetic variability and geographic differentiation among three species of Triatomine bugs (Hemiptera-Reduviidae).

Panzer, F., Pita, S., Nattero, J., Panzer, Y., Galvão, C., Chavez, T., ... & Noireau, F. (2015). Cryptic speciation in the *Triatoma sordida* subcomplex (Hemiptera, Reduviidae) revealed by chromosomal markers. *Parasites & Vectors*, 8, 1-10.

Paradis, E. (2010). pegas: an R package for population genetics with an integrated-modular approach. *Bioinformatics*, 26(3), 419-420.

Paradis, E., & Schliep, K. (2019). ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. *Bioinformatics*, 35(3), 526-528.

Pavan, M. G., Lazoski, C., & Monteiro, F. A. (2021). Speciation processes in Triatominae. In *Triatominae-the biology of Chagas disease vectors* (pp. 39-64). Cham: Springer International Publishing.

Pavan, M. G., Rivas, G. B., Dias, F. B., & Gurgel-Gonçalves, R. (2015). Looks can be deceiving: cryptic species and phenotypic variation in *Rhodnius* spp., Chagas disease vectors. *Evolutionary biology: Biodiversification from genotype to phenotype*, 345-372.

Pérez-Molina, J. A., & Molina, I. (2018). Chagas disease. *The Lancet*, 391(10115), 82-94.

Pfeiler, E., Bitler, B. G., Ramsey, J. M., Palacios-Cardiel, C., & Markow, T. A. (2006). Genetic variation, population structure, and phylogenetic relationships of *Triatoma rubida* and *T. recurva* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the Sonoran Desert, insect vectors of the Chagas' disease parasite *Trypanosoma cruzi*. *Molecular phylogenetics and evolution*, 41(1), 209-221.

Pita, S., Gomez-Palacio, A., Lorite, P., Dujardin, J.P., Chavez, T., Villacís, A. G. et al. (2021) Multidisciplinary approach detects speciation within the kissing bug *Panstrongylus rufotuberculatus* populations (Hemiptera, Heteroptera, Reduviidae). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 116, e210259.

Pons, J., Barraclough, T. G., Gomez-Zurita, J., Cardoso, A., Duran, D. P., Hazell, S., ... & Vogler, A. P. (2006). Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Systematic biology*, 55(4), 595-609.

Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G., & Suchard, M. A. (2018). Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic biology*, 67(5), 901-904.

Ramos-Onsins, S. E., & Rozas, J. (2002). Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular biology and evolution*, 19(12), 2092-2100.

Rassi, A., & Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *The Lancet*, 375(9723), 1388-1402.

Reeves, W. K., & Miller, M. M. (2020). A new state record for *Triatoma sanguisuga* (Leconte)(Hemiptera: Reduviidae) from Wyoming, USA. *Comparative Parasitology*, 87(1), 118-120.

- Rivas, N., Sánchez-Cordero, V., Camacho, A. D., & Alexandre-Aguilar, R. (2021). Morphological and chromatic variation in four populations of *Triatoma mexicana* (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Medical Entomology*, 58(1), 274-285.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., ... & Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic biology*, 61(3), 539-542.
- Sandoval Ramirez, C. M., Nieves Blanco, E. E., Gutiérrez Marin, R., Jaimes Mendez, D. A., Rodríguez, N. O., Otálora-Luna, F., & José Aldana, E. (2015). Morphometric Analysis of the Host Effect on Phenotypical Variation of *Belminus ferroae* (Hemiptera: Triatominae). *Psyche: A Journal of Entomology*, 2015, 1-12.
- Schachter-Broide, J., Dujardin, J. P., Kitron, U., & Gürtler, R. E. (2004). Spatial structuring of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) populations from northwestern Argentina using wing geometric morphometry. *Journal of Medical Entomology*, 41(4), 643-649.
- Schofield, C. J. (2000). *Trypanosoma cruzi*--the vector-parasite paradox. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95, 535-544.
- Schwarz, G. (1978). Estimating the dimension of a model. *The annals of statistics*, 461-464.
- Smadja, C. M., & Butlin, R. K. (2011). A framework for comparing processes of speciation in the presence of gene flow. *Molecular ecology*, 20(24), 5123-5140.
- Souza, E.D., von Atzingen, N.C., Furtado, M.B., de Oliveira, J., Nascimento, J.D., Vendrami, D.P. et al. (2016) Description of *Rhodnius marabaensis* sp. n. (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) from Pará state, Brazil. *Zookeys*, 621, 45–62.
- Stevens, L., & Dorn, P. L. (2017). Population genetics of Triatominae. In *American Trypanosomiasis Chagas Disease* (pp. 169-196). Elsevier.
- Suchard, M. A., Lemey, P., Baele, G., Ayres, D. L., Drummond, A. J., & Rambaut, A. (2018). Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus evolution*, 4(1), vey016.
- Tajima, F. (1989). The effect of change in population size on DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3), 597-601.
- Tamura, K., & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular biology and evolution*, 10(3), 512-526.

- Tang, S., & Presgraves, D. C. (2009). Evolution of the *Drosophila* nuclear pore complex results in multiple hybrid incompatibilities. *Science*, 323(5915), 779-782.
- Tomasini, N., & Diosque, P. (2015). Evolution of *Trypanosoma cruzi*: clarifying hybridisations, mitochondrial introgressions and phylogenetic relationships between major lineages. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110, 403-413.
- Turelli, M., Barton, N. H., & Coyne, J. A. (2001). Theory and speciation. *Trends in ecology & evolution*, 16(7), 330-343.
- Usinger, R. L. (1944). *The Triatominae of North and Central America and the West Indies and their public health significance* (No. 288). US Government Printing Office.
- Waleckx, E., Suarez, J., Richards, B., & Dorn, P. L. (2014). *Triatoma sanguisuga* blood meals and potential for Chagas disease, Louisiana, USA. *Emerging infectious diseases*, 20(12), 2141.
- Wang, Y., Chen, J., Jiang, L. Y., & Qiao, G. X. (2015). Hemipteran mitochondrial genomes: features, structures and implications for phylogeny. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(6), 12382-12404.
- Wickham, H. (2011). ggplot2. *Wiley interdisciplinary reviews: computational statistics*, 3(2), 180-185.
- World Health Organization. (2002). *Control of Chagas disease: second report of the WHO expert committee* (Vol. 2). World Health Organization.
- World Health Organization. (2010). *Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: first WHO report on neglected tropical diseases* (No. WHO/HTM/NTD/2010.1). World Health Organization.
- World Health Organization. (2015). Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Weekly Epidemiological Record=Relevé épidémiologique hebdomadaire*, 90(06), 33-44.
- Yang, Z. (1996). Among-site rate variation and its impact on phylogenetic analyses. *Trends in ecology & evolution*, 11(9), 367-372.
- Yu, G., Smith, D. K., Zhu, H., Guan, Y., & Lam, T. T. Y. (2017). ggtree: an R package for visualization and annotation of phylogenetic trees with their covariates and other associated data. *Methods in Ecology and Evolution*, 8(1), 28-36.