



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

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

Isabella da Silva Masarin

Análise da relação evolutiva das espécies do subcomplexo *Triatoma pseudomaculata*, a partir de cruzamentos experimentais e sistemática filogenética

Botucatu

2023

Isabella da Silva Masarin

Análise da relação evolutiva das espécies do subcomplexo *Triatoma pseudomaculata*, a partir de cruzamentos experimentais e sistemática filogenética

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Zoologia), junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu.

Orientador: Prof. Dr. Kaio Cesar Chaboli Alevi

Agencia financiadora: CAPES

Botucatu

2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Masarin, Isabella da Silva.

Análise da relação evolutiva das espécies do subcomplexo *Triatoma pseudomaculata*, a partir de cruzamentos experimentais e sistemática filogenética / Isabella da Silva Masarin. - Botucatu, 2023

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Kaio Cesar Chaboli Alevi

Capes: 20400004

1. Cruzamento (Genética). 2. Chagas, Doença de.
3. Barbeiros (Inseto). 4. Análise cladística.

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

Isabella da Silva Masarin

Análise da relação evolutiva das espécies do subcomplexo *Triatoma pseudomaculata*, a partir de cruzamentos experimentais e sistemática filogenética

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Zoologia), junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu.

Comissão examinadora

Prof. Dr. Kaio Cesar Chaboli Alevi
IOC/FIOCRUZ
Orientador

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

Prof. Dr. Lilian Castiglioni
FAMERP

Botucatu

2023

Dedicatória

Dedico esta conquista aos meus avós, Idalina D'angelo Masarin e Otávio Masarin, que me ensinaram o valor da família e sempre estiveram ao meu lado.

As meus pais, Jucelaine Paula da Silva e Julio Ricardo Masarin, que sempre me apoiaram nas minhas escolhas e me mostraram o valor da verdade e da sabedoria.

Aos meus padrinhos, Tânia Masarin e Percival Teixeira, que nunca mediram esforços para me auxiliar e me lembraram da minha força em cada obstáculo.

Aos meus tios, primo e irmãos, Telma Masarin, Euclides José, Henrique Masarin, Gabriella Masarin e Pedro Augusto De Carvalho, que sempre estiveram ao meu lado, vibrando com as pequenas conquistas do dia a dia, me fazendo lembrar que a vida é leve.

Ao meu marido, João Vitor Joaquim Pires, que nunca duvidou da minha capacidade e esteve ao meu lado em momentos em que eu duvidaria de mim mesma.

Ao meu primo, Luis Otávio Masarin, que viveu momentos memoráveis comigo em meio a loucura da faculdade.

E por fim, e mais importante, à Deus, dedico toda minha gratidão por tantas bênçãos realizadas em minha vida.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por tantas bênçãos e realizações na minha vida, por seus planos serem muito maiores que os meus e por sempre me acalmar quando eu pedia seu acalento.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Kaio Cesar Chaboli Alevi, por toda oportunidade dada, pelo conhecimento compartilhado, por ser compreensível e paciente. Agradeço, principalmente, por me lembrar dos meus objetivos e onde eu poderia chegar, nas mil vezes que duvidei. Agradeço a sua humanidade e sabedoria, como disse várias vezes, você é uma enciclopédia humana. Minha eterna gratidão por sua presença em minha vida!

À Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira e ao Prof. Dr. João Aristeu da Rosa, pelas oportunidades, pelo apoio científico, financeiro e por disponibilizar o Laboratório de Biologia Celular do IBILCE/UNESP e o Insetário de Triatominae da FCFAR/UNESP para a realização do projeto.

Aos meus parceiros de laboratório, pela possibilidade de crescimento pessoal e profissional.

Espero poder contribuir mais para o nosso grupo em breve.

Aos meus avós paternos, Idalina D'angelo Masarin e Otávio Masarin, por todo apoio, por cada ensinamento passado e, principalmente, pela criação e todo amor que me proporcionaram. Sem vocês, essa conquista não teria vida. Nunca serei capaz de demonstrar toda minha gratidão e amor a vocês.

Aos meus pais, Jucelaine Paula da Silva e Julio Ricardo Masarin, que nunca duvidaram de mim. Agradeço por vocês terem me mostrado o valor das coisas que ninguém enxergava, a vida real, a vida que tem erros, obstáculos, choro, inveja, imprevistos e maldade, e mesmo assim, sempre me lembraram que apesar disso, a vida é radiante, feita para ser vivida ao lado das pessoas que amamos, que estão ao nosso lado mesmo nos dias mais sombrios. Obrigada por vocês serem essas pessoas. Meu amor a vocês é incondicional!

Aos meus padrinhos, Tânia Masarin e Percival Teixeira, e aos meus tios, Telma Masarin e Euclides José, agradeço todo esforço feito para me ajudar durante os anos da minha vida, principalmente nos anos da minha graduação, por cada roupa lavada, por cada carona, por cada feijão

cozido, por cada lanche nas vésperas da viagem de retorno. Vocês sempre tornaram essa jornada mais fácil e mais leve. Serei eternamente grata com o que cada um de vocês contribuiu para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao meu primo, Luis Otávio Masarin, por ter dividido seu espaço comigo por um tempo, pelas comidas deliciosas que fez para nós comermos e por ter feito companhia nesse momento novo da minha vida.

Às minhas amigas, Maisa Ravazi e Ludimila Marchozi, que mesmo com a distância, sempre estiveram a disposição para me ajudar e me motivar. Ambas são exemplos na minha vida. Vocês são excelentes profissionais e quero compartilhar mais momentos com vocês.

Ao meu marido, João Vitor Joaquim Pires, que esteve comigo nos melhores e piores momentos dessa jornada, que me motiva a ser melhor a cada dia, que proporciona segurança e um amor leve e feliz. Sua presença na minha vida me tornou mais forte e confiante.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

Agradeço a todos que fizeram parte dessa conquista, mesmo que indiretamente, saibam que cada contribuição fez com que esse título fosse conquistado!

"Quando os dias forem bons, aproveite-os bem; mas, quando forem ruins, considere: Deus fez tanto um quanto o outro, para evitar que o homem descubra alguma coisa sobre o seu futuro."

(Eclesiastes 7:14)

Sumário

Resumo.....	10
Abstract.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivos gerais.....	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
3. RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	18
3.1 Artigo científico.....	18
4. CONCLUSÕES GERAIS.....	32
5. REFERÊNCIAS.....	32

Resumo

Os triatomíneos são insetos hematófagos considerados como a principal forma de transmissão do protozoário *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas. O gênero *Triatoma* é o mais representativo em número de espécies e um dos mais importantes do ponto de vista epidemiológico. O subcomplexo *T. pseudomaculata* foi recentemente proposto, a partir de dados cromossômicos. Esse subcomplexo é composto pelas espécies *T. arthurneivai*, *T. pseudomaculata* e *T. wygodzinskyi* (provenientes do antigo subcomplexo *T. maculata*) e *T. baratai*, *T. costalimai*, *T. deaneorum*, *T. guazu*, *T. jatai* e *T. williami* (provenientes do subcomplexo *T. matogrossensis*). Híbridos foram produzidos quando *T. pseudomaculata* e *T. wygodzinskyi* foram cruzados, demonstrando compatibilidade genômica interespecífica entre essas espécies do subcomplexo *T. pseudomaculata*. Considerando que a realização de cruzamentos e análise da compatibilidade reprodutiva interespecíficos em subcomplexos não monofiléticos mostram-se de grande importância sistemática, cruzamentos entre *T. pseudomaculata* e *T. costalimai* foram realizados, com o objetivo de avaliar se essas espécies apresentam compatibilidade genômica/reprodutiva. Ainda, com base nos dados moleculares disponíveis no GenBank, foi realizado um estudo filogenético para avaliar a relação evolutiva das espécies desse subcomplexo. Cruzamentos experimentais não resultaram em híbridos, demonstrando que existe barreira pré-zigótica estabelecida entre essas espécies. Além disso, a filogenia demonstrou que *T. costalimai* e *T. jatai* não apresentam relação filogenética com as espécies do subcomplexo *T. pseudomaculata*. Sendo assim, o *status* específico de *T. pseudomaculata* e *T. costalimai* foi confirmado, com base no conceito biológico de espécie. Além disso, a incompatibilidade reprodutiva, associada às análises sistemáticas filogenéticas, demonstrou que *T. costalimai* não pertence ao subcomplexo *T. pseudomaculata*. Dessa forma, sugerimos que as espécies irmãs *T. costalimai* e *T. jatai* devam ser agrupadas em um novo subcomplexo denominado *T. costalimai*.

Palavras-chave: Triatomíneos; Híbridos; Cruzamentos experimentais; doença de Chagas

Abstract

Triatomines are hematophagous insects considered as the main form of transmission of the protozoan *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. The genus *Triatoma* is the most representative in number of species and one of the most important from an epidemiological point of view. The *T. pseudomaculata* subcomplex was recently proposed, based on chromosomal data. This subcomplex is composed by the species *T. arthurneivai*, *T. pseudomaculata* and *T. wygodzinskyi* (from the old subcomplex *T. maculata*) and *T. baratai*, *T. costalimai*, *T. deaneorum*, *T. guazu*, *T. jatai* and *T. williami* (from the *T. matogrossensis* subcomplex). Hybrids were produced when *T. pseudomaculata* and *T. wygodzinskyi* were crossed, demonstrating interspecific genomic compatibility between these species of the *T. pseudomaculata* subcomplex. Considering that performing crosses and analyzing interspecific reproductive compatibility in non-monophyletic subcomplexes are of great systematic importance, crosses between *T. pseudomaculata* and *T. costalimai* were performed, with the objective of evaluating whether these species present genomic/reproductive compatibility. Also, based on the molecular data available in GenBank, a phylogenetic study was carried out to evaluate the evolutionary relationship of the species of this subcomplex. Experimental crossings did not result in hybrids, demonstrating that there is a pre-zygotic barrier established between these species. Furthermore, phylogeny demonstrated that *T. costalimai* and *T. jatai* do not have a phylogenetic relationship with the species of the *T. pseudomaculata* subcomplex. Therefore, the specific status of *T. pseudomaculata* and *T. costalimai* was confirmed, based on the biological species concept. Furthermore, reproductive incompatibility, associated with systematic phylogenetic analyses, demonstrated that *T. costalimai* does not belong to the *T. pseudomaculata* subcomplex. Thus, we suggest that the sister species *T. costalimai* and *T. jatai* should be grouped into a new subcomplex called *T. costalimai*.

Keywords: Triatomines; Hybrids; Experimental crosses; Chagas disease

1. INTRODUÇÃO

Os triatomíneos são insetos hematófagos que apresentam importância entomoepidemiológica para a saúde pública, pois são considerados como a principal forma de transmissão do protozoário *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), agente etiológico da doença de Chagas – doença negligenciada que atinge cerca de sete milhões de pessoas em todo o mundo, ocasionando, aproximadamente, 10 mil mortes por ano (WHO, 2023). Entre as estratégias de controle da doença de Chagas, a Organização Mundial de Saúde enfatiza o controle de vetores na América Latina (WHO, 2023).

Atualmente, são conhecidas 160 espécies de triatomíneos (157 vivas e três fósseis), agrupadas em 18 gêneros e cinco tribos (ALEVI et al., 2021; OLIVEIRA-CORREIA et al., 2022; GIL-SANTANA et al., 2022; TÉLLEZ-RENDÓN et al., 2023; ZHAO et al., 2023). O gênero *Triatoma* Laporte, 1832 (Hemiptera, Triatominae), com mais de 80 espécies descritas (ALEVI et al., 2021; TÉLLEZ-RENDÓN et al., 2023; ZHAO et al., 2023), é o mais representativo em número de espécies e um dos mais importantes do ponto de vista epidemiológico (JUSTI et al., 2014). Com base, principalmente, na parafilia de *Triatoma* (JUSTI et al., 2014, 2016), as espécies da tribo Triatomini foram agrupadas em oito complexos e nove subcomplexos (Tabela 1) (SCHOFIELD; GALVÃO, 2009; PITA et al., 2016; ALEVI et al., 2017).

O subcomplexo *T. pseudomaculata* foi recentemente proposto, a partir de dados cromossômicos (PITA et al., 2016). Esse subcomplexo é composto pelas espécies *T. arthurneivai* Lent & Martins, 1940 (Figura 1A), *T. pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964 (Figura 1B) e *T. wygodzinskyi* Lent 1951 (Figura 1C) (provenientes do antigo subcomplexo *T. maculata*) e *T. baratai* Carcavallo & Jurberg, 2000 (Figura 1D), *T. costalimai* Verano & Galvão, 1958 (Figura 1E), *T. deaneorum* Galvão, Souza & Lima, 1967 (Figura 1F), *T. guazu* Lent & Wygodzinsky, 1979 [recentemente sinonimizada com *T. williami* (OLIVEIRA-CORREIA et al. 2021)], *T. williami* Galvão, Souza & Lima, 1965 (Figura 1G) e *T. jatai* Gonçalves et al. (2013) (Figura 1H)

(provenientes do subcomplexo *T. matogrossensis*).

Tabela 1. Complexos e subcomplexos de Triatomini.

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

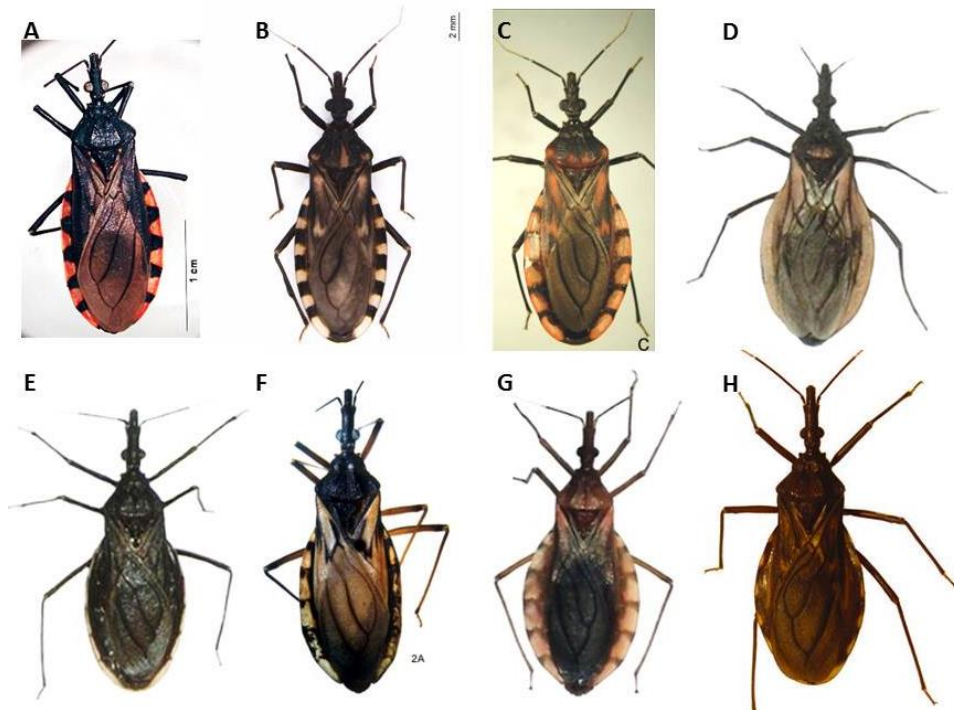


Figura 1. Triatomíneos agrupados no subcomplexo *T. pseudomaculata*. A: *T. arthurneivai*, B: *T. pseudomaculata*, C: *T. wygodzinskyi*, D: *T. baratai*, E: *T. costalimai*, F: *T. deaneorum*, G: *T. williamsi* e H: *T. jatai*. Adaptado de Galvão et al. (2001), De La Fuente et al. (2011), Dias et al. (2011), Gardim et al. (2013), Gonçalves et al. (2013) e Coleção de Triatominae (2023).

Embora os autores tenham se fundamentado em marcações cromossômicas de DNA ribossômico (DNAr) 45S para propor o reagrupamento das espécies [sondas de DNAr 45S presentes em um par de autossomos (Figura 2)] e, sobretudo, a criação do subcomplexo *T. pseudomaculata* (PITA et al., 2016), estudos filogenéticos já haviam evidenciado a relação entre algumas dessas espécies (Figuras 3 e 4) (JUSTI et al., 2014, 2016).

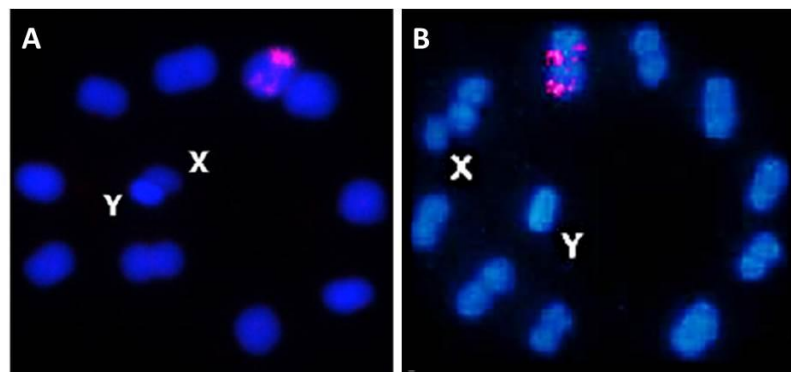


Figura 2. DNAr 45 presente em um par de autossomos. A: *T. costalimai*; B: *T. pseudomaculata*.

Adaptado de Pita et al. (2016) e Panzera et al. (2012), respectivamente.

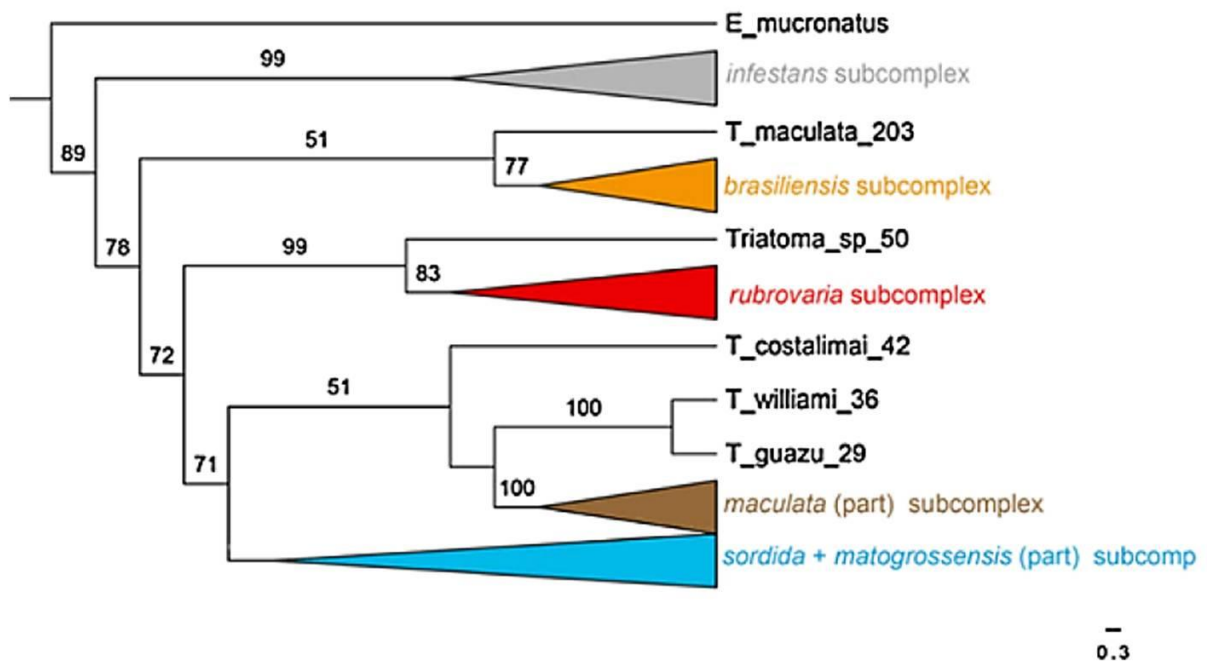


Figura 3. Filogenia apresentada por Justi et al. (2014). Notar a relação de *T. costalimai*, *T. williami* e as espécies dos subcomplexos *T. maculata* e *T. matogrossensis*.

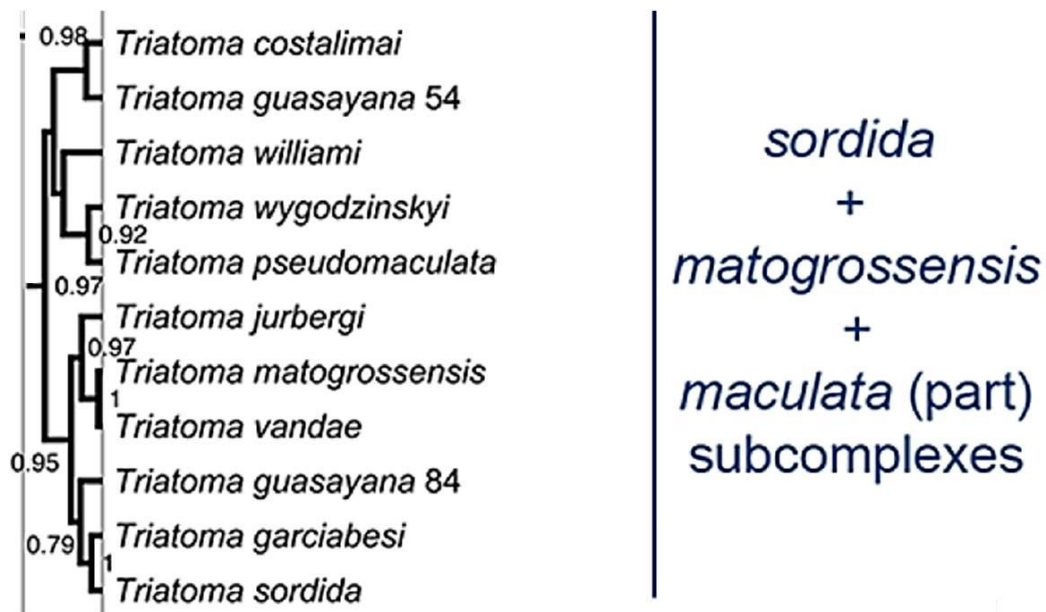


Figura 4. Filogenia apresentada por Justi et al. (2016). Notar a relação de *T. costalimai*, *T. williami* e as espécies dos subcomplexos *T. maculata* e *T. matogrossensis*.

Por muito tempo, *T. maculata* (Erichson, 1848) foi agrupado com as espécies *T. arthurneivai*, *T. pseudomaculata* e *T. wygodzinskyi* no subcomplexo *T. maculata* (SCHOFIELD; GALVÃO, 2009). Atualmente, sabe-se que esse subcomplexo é composto apenas por uma espécie (*T. maculata*) (PITA et al., 2016) [embora divergências morfológicas e moleculares sinalizaram que *T. maculata* pode representar mais de um táxon críptico (MONSALVE et al., 2016; GÓMEZ-PALACIO et al., 2023)]. Justi et al. (2016), por meio de estudos filogenéticos e datações geológicas, sugeriram que o soerguimento do norte Andino (23-10 Ma) tenha sido o evento responsável por separar a espécie *T. maculata* (restrita a Amazônia) dos outros subcomplexos do complexo *T. infestans* (Tabela 1). Além disso, os autores também sugeriram que a população ancestral de *T. maculata* tenha ficado restrita ao planalto da Guiana, enquanto a população ancestral que originou os outros subcomplexos tenha sido isolada no escudo brasileiro, sendo as mudanças climáticas provenientes da rápida elevação dos Andes (14 Ma) responsáveis pela diversificação dos subcomplexos *T. brasiliensis* na Caatinga, *T. rubrovaria* na província dos

Pampas, *T. infestans* na província do Chaco e *T. sordida*, *T. matogrossensis* e *T. pseudomaculata* na província do Cerrado.

Híbridos foram produzidos quando *T. pseudomaculata* e *T. wygodzinskyi* foram cruzados (BELISSÁRIO, 2006), demonstrando compatibilidade genômica interespecífica entre essas espécies do subcomplexo *T. pseudomaculata*. A realização de cruzamentos e análise da compatibilidade reprodutiva interespecíficos em subcomplexos não monofiléticos mostram-se de grande importância sistemática: Neves et al. (2020), por exemplo, realizaram cruzamentos entre espécies do subcomplexo *T. brasiliensis* [que foram agrupadas por caracteres morfológicos e pela distribuição geográfica (SCHOFIELD; GALVÃO, 2009)] e observaram que os cruzamentos entre *T. melanocephala*, *T. vitticeps* e *T. tibiamaculata* com as outras espécies desse subcomplexo não formavam híbridos (presença de barreiras pré-zigóticas). Por outro lado, com exceção dessas três espécies, todos os outros táxons desse subcomplexo produziam híbridos (PINOTTI et al., 2021), ou seja, apresentavam compatibilidade genômica e reprodutiva (o que confirma a exclusão das três espécies do subcomplexo *T. brasiliensis*).

Assim, levando em consideração que os cruzamentos experimentais auxiliaram em questões sistemáticas dos triatomíneos (NEVES et al., 2020), consideramos importante realizar cruzamentos entre *T. pseudomaculata* e *T. costalimai* [espécie recentemente agrupadas no subcomplexo *T. pseudomaculata* por estudos cromossômicos (PITA et al., 2016)], com o objetivo de avaliar se essas espécies apresentam compatibilidade genômica e reprodutiva.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar se as espécies *T. pseudomaculata* e *T. costalimai* apresentam compatibilidade genômica interespecífica, por meio de cruzamentos experimentais e avaliar a relação filogenética das espécies do subcomplexo *T. pseudomaculata*.

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a dinâmica dos cruzamentos experimentais, por meio da análise da cópula interespecífica, da oviposição, da taxa de eclosão dos ovos e da viabilidade dos híbridos;
- b) Avaliar a relação filogenética das espécies do subcomplexo *T. pseudomaculata*, a partir de marcadores mitocondriais e nucleares depositados no GenBank.

3. RESULTADOS e DISCUSSÃO (apresentados na forma de artigo científico)

3.1 Artigo científico aceito para publicação na revista internacional *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*

Analysis of the evolutionary relationship between species of the new *Triatoma pseudomaculata* subcomplex (Hemiptera, Triatominae) and proposal for the creation of the *T. costali* subcomplex

Isabella da Silva Masarin¹, Jader de Oliveira², Yago Visinho dos Reis¹, Amanda Ravazi¹, Fernanda Fernandez Madeira³, Samanta Cristina Antoniassi Fernandes Tadini¹, Cleber Galvão^{4*}, Maria Tercília Vilela de Azeredo-Oliveira³, João Aristeu da Rosa⁵, and Kaio Cesar Chaboli Alevi^{1,4}

¹ Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Instituto de Biociências Rua Dr. Antônio Celso Wagner Zanin, 250, Distrito de Rubião Júnior, 18618-689, Botucatu, SP, Brasil.

² Laboratório de Entomologia em Saúde Pública, Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, Av. Dr. Arnaldo 715, São Paulo, SP, Brasil.

³ Laboratório de Biologia Celular, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Rua Cristóvão Colombo 2265, 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

⁴ Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos, Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Av. Brasil 4365, Pavilhão Rocha Lima, sala 505, 21040-360 Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

⁵ Laboratório de Parasitologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Rodovia Araraquara/Jaú, Km.01, 14801-902 Araraquara, SP, Brasil.

Abstract

Triatomines are insects of great importance for public health, as they are vectors of protozoan *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. The genus *Triatoma* is the most representative in number of species and one of the most important from an epidemiological point of view. The *T. pseudomaculata* subcomplex [composed by the species *T. arthurneivai*, *T. pseudomaculata* and *T. wygodzinskyi* (from the old subcomplex *T. maculata*) and *T. baratai*, *T. costalimai*, *T. deaneorum*, *T. jatai* and *T. williami* (from the old *T. matogrossensis* subcomplex)] was recently proposed, based on chromosomal data. Thus, considering that the experimental crossings helped with systematic questions about triatomines, we performed crosses between the species of the *T. pseudomaculata* subcomplex. Thus, we crossed *T. pseudomaculata* and *T. costalimai* to assess the possible presence of interspecific genomic and reproductive compatibility. In addition, based on the molecular data available on GenBank, we performed a phylogenetic systematics study to assess the evolutionary relationship of the species of the *T. pseudomaculata* subcomplex. Experimental crosses did not result in hybrids, demonstrating that there is prezygotic barrier established between these species. Based on the above, we confirm the specific status of *T. pseudomaculata* and *T. costalimai*, based on the biological species concept. Furthermore, the reproductive incompatibility, associated with the phylogenetic systematic analyzes demonstrate that *T. costalimai* doesn't belong to the *T. pseudomaculata* subcomplex. Thus, we suggest that the sister species *T. costalimai* and *T. jatai* should be grouped into a new subcomplex called *T. costalimai*.

Keywords: Chagas disease vector, Phylogenetic systematics, Experimental crosses

INTRODUCTION

Triatomines are hematophagous insects of great importance for public health, as they are considered the main form of transmission of the protozoan *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), the etiological agent of Chagas disease.¹ This neglected disease affects about seven million people worldwide, causing approximately 10,000 deaths per year¹, being vector control is one of the main ways to mitigate the incidence of new cases in Latin America.¹

Currently, 160 species of triatomines are known (157 living and three fossils), grouped into 18 genera and five tribes.²⁻⁶ The genus *Triatoma* (Hemiptera, Triatominae), with more than 80 described species,^{2,3,5,6} is the most representative in number of species and one of the most important from an epidemiological point of view.⁷ Based on the paraphyly of *Triatoma*,^{7,8} the species of this genus were grouped into eight complexes and nine subcomplexes.⁹⁻¹¹

The *T. pseudomaculata* subcomplex was recently proposed, based on chromosomal data.¹⁰ This subcomplex is composed by the species *T. arthurneivai*, *T. pseudomaculata* and *T. wygodzinskyi* (from the old subcomplex *T. maculata*)⁹ and *T. baratai*, *T. costalimai*, *T. deaneorum*, *T. jatai* and *T. williami* (from the old *T. matogrossensis* subcomplex)⁹. *Triatoma guazu* was also considered by Pita et al.¹⁰ as a member of this subcomplex, however recently Oliveira Correia et al.³ synonymized this species with *T. williami*. Although Pita et al.¹⁰ used 45S rDNA chromosomal markings to propose the regrouping of species and, above all, the creation of the *T. pseudomaculata* subcomplex, phylogenetic studies had already shown the relationship between some of these species.^{7,8}

For a long time, *T. maculata* was grouped with the species *T. arthurneivai*, *T. pseudomaculata* and *T. wygodzinskyi* in the *T. maculata* subcomplex.⁹ *Triatoma arthurneivai* and *T. wygodzinskyi* were misidentified for a long time as demonstrated through morphometric¹² and cytogenetic¹³ studies. Currently, it is known that this subcomplex is composed of only one species (*T. maculata*), although morphological, cytogenetic and molecular divergences signaled that *T. maculata* may represent more than one cryptic taxon.^{10,14,15} Justi et al.⁸, through phylogenetic

studies and geological dating, suggested that the northern Andean uplift (23-10 Ma) was the event responsible for separating the species *T. maculata* (restricted to the Amazon) from the other subcomplexes of the *T. infestans* group (including the *T. pseudomaculata* subcomplex).

Hybrids were produced when *T. pseudomaculata* and *T. wygodzinskyi* were crossed in laboratory conditions (in both directions),¹⁶ demonstrating interspecific genomic compatibility between these species of the *T. pseudomaculata* subcomplex. The performance of crosses and the analysis of interspecific reproductive compatibility in non-monophyletic subcomplexes are of great systematic importance: Neves et al.¹⁷, for example, crossed species of the *T. brasiliensis* subcomplex (which were initially grouped by morphological characters and geographical distribution)⁹ and observed that crosses between *T. melanocephala*, *T. vitticeps* and *Panstrongylus tibiamaculatus* with *T. b. brasiliensis* did not form hybrids (presence of prezygotic barriers). On the other hand, except for these three species, all other taxa of this subcomplex produce hybrids,¹⁸ that is, they present genomic and reproductive compatibility (which confirms the exclusion of the three species of the *T. brasiliensis* subcomplex).

Thus, taking into account that the experimental crossings helped with systematic questions about triatomines,¹⁷ we consider it important to perform crosses between the species of the *T. pseudomaculata* subcomplex, targeting the taxa grouped in the subcomplex by chromosomal studies.¹⁰ Thus, we crossed *T. pseudomaculata* (from the old subcomplex *T. maculata*)⁹ and *T. costalimai* (from the old *T. matogrossensis* subcomplex)⁹ to assess the possible presence of interspecific genomic and reproductive compatibility. In addition, based on the molecular data available on GenBank, we performed a phylogenetic systematics study to assess the evolutionary relationship of the species of the *T. pseudomaculata* subcomplex.

MATERIALS AND METHODS

Origin of the specimens

The specimens of *T. pseudomaculata* were collected on May 15, 2008 in the municipality of

Oeiras, Piauí, Brazil, and kept in the Triatominae Insectarium of the School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University (FCFAR/UNESP), Araraquara, São Paulo, Brazil, under the registration CTA 201. The specimens of *T. costalimai* were collected in Mabai, state of Goiás, Brazil, in the neighborhood of "Olho D'água", on July 19, 2011, and registered with CTA 237.

Experimental Crosses

Reciprocal crossing experiments were conducted among *T. pseudomaculata* and *T. costalimai* (both directions) from specimens came from colonics kept in the Triatominae Insectarium of the FCFAR/UNESP. Five experimental crosses were performed for each direction (*T. pseudomaculata* ♀ x *T. costalimai* ♂ and *T. costalimai* ♀ x *T. pseudomaculata* ♂). The insects were sexed as fifth instar nymphs and, posteriorly, males and females were kept separately until they reached the adult stage (to guarantee the virginity of the parents). The crosses were maintained for four months, being each couple was kept separately in a plastic jars (5 cm diameter × 10 cm height) and kept at room temperature (average of 24 °C)¹⁹ and an average relative humidity of 63%.¹⁹ Weekly, the insects were fed on duck blood and the eggs were collected. Matings between species were observed only occasionally during the period of feeding and maintenance of crosses. The eggs were checked for two months after the end of the crosses to assess the hatching rate.

Phylogenetic studies

A phylogenetic analysis with sequences of seven molecular markers obtained from GenBank for 32 triatomine species (Table 1) was performed. Molecular markers of *Eratyrus mucronatus* were included as outgroup.

Table 1. GenBank accession code for each species.

Species	Molecular markers						
	<i>Cytb</i>	<i>16S</i>	<i>18S</i>	<i>28S</i>	<i>COI</i>	<i>COII</i>	<i>ITS2</i>
<i>E. mucronatus</i>		JQ897794	JQ897555	JQ897635	AF449140		EF550126
<i>T. arthurneivai</i>		AY035460					AM286736
<i>T. bahiensis</i>	KT347298						
<i>T. baratai</i>	KC249238	KC571991		KC249143		KC249411	
<i>T. brasiliensis</i>	KC249239	KC248985	AJ421957	KC249145	KC249318	KC249413	AJ293591
<i>T. carcavalloii</i>	KC249244	KC248990	KC249097		KC249322	KC249419	
<i>T. circummaculata</i>	KC249245	KC248992	KC249099	KC249148	KC249325	KC249422	
<i>T. costalimai</i>	KC249246	KC248997	KC249101	KC249149	KC249327	KC249425	
<i>T. delpontei</i>	KC249248	KC249000		KC249150	KC249330	KC249427	AJ576060
<i>T. garciabesi</i>	KC249249	KC249006	KC249102	KC249158	KC249338	KC249434	
<i>T. guasayana</i>	KC249252	KC249012	KC249103	KC249162	KC249343	KC249438	
<i>T. guazu</i>	KC608976	KC249013	KC249105	KC249164	KC608984	KC249440	
<i>T. infestans</i>	KC249256	KC249016	KC249109	KC249168	KC249349	KC249442	AJ289876
<i>T. jatai</i>		KT601153			KT601164		
<i>T. juazeirensis</i>	KC249263	KC249026		KC249173	KF826892		
<i>T. jurbergi</i>	KC249264	KC249027	KC249110	KC249174		KC249448	
<i>T. klugi</i>	KC249265	KC249028			KC249356	KC249449	
<i>T. lenti</i>	KY576789	KY576788			KY576792		
<i>T. matogrossensis</i>	KC249269	KC249036	KC249114	KC249179	KC249359	KC249456	
<i>T. melanica</i>		KC249041		KC249183	KJ580495	KC249461	
<i>T. patagonica</i>	MG241451	AY035464			KR139999		
<i>T. petrocchiaie</i>	KY654075	KY654073			KY654074		
<i>T. pintodiasi</i>		MG264738			MZ345607		
<i>T. platensis</i>	KC249274	KC249047		KC249186	KC249363	KC249462	AJ576062
<i>T. pseudomaculata</i>	KC249275	KC249051		KC249189	KC249366	KC249464	
<i>T. rosai</i>	KC249295	KC249078		KC249213	MH029697		
<i>T. rubrovaria</i>	KC249281	KC249067	KC249117	KC249198	KC249370	KC249471	AJ557261
<i>T. sherlocki</i>	KC249288	KC249068		KC249205	KC249377	KC249478	
<i>T. sordida</i>	MH054940			KC249210	MH029692		
<i>T. vandae</i>	KC249298	KC249083	KC249128	KC249216	KC249391	KC249487	
<i>T. williami</i>	KC608981	KC249089			KC608990	KC249493	
<i>T. wygodzinskyi</i>		KC249090	KC249133	KC249222	KC249398	KC249494	

The sequences were aligned in the Mega11 program,²⁰ using the Muscle method²¹ and concatenated in Seaview4.²² The phylogenetic tree of Bayesian inference was reconstructed in the program BEAST 1.8.4,²³ under the substitution model GTR +I +G and Yule Process prior^{24,25} in a total of 100 million generations. The burn-in was adjusted to 25% of the samples, and convergence (ESS > 200) was evaluated in Tracer 1.8.²⁶ The generated phylogenetic tree was visualized and

edited in the FigTree v.1.4.4 program.²⁷

RESULTS AND DISCUSSION

Experimental crosses between *T. pseudomaculata* and *T. costalimai* did not result in hybrids (Table 2), demonstrating that there is prezygotic barrier established between these species. However, Belisário¹⁶ when crossing other species of the *T. pseudomaculata* subcomplex (*T. pseudomaculata* and *T. wygodzinskyi*), observed the formation of hybrids (demonstrating that prezygotic reproductive barriers do not exist under laboratory conditions).

Table 2. Experimental crosses performed between *T. pseudomaculata* and *T. costalimai*.

Crossing experiments	Number of eggs	Egg fertility	References
<i>T. pseudomaculata</i> subcomplex			
<i>T. pseudomaculata</i> ♀ x <i>T. costalimai</i> ♂	139	00%	This paper
<i>T. costalimai</i> ♀ x <i>T. pseudomaculata</i> ♂	124	00%	This paper
Control experiments			
<i>T. pseudomaculata</i> ♀ x <i>T. pseudomaculata</i> ♂	213	79%	This paper
<i>T. costalimai</i> ♀ x <i>T. costalimai</i> ♂	186	82%	This paper

The phylogenetic analysis of the *T. pseudomaculata* subcomplex species demonstrated that the subcomplex proposed by Pita et al.¹⁰ represents a non-monophyletic grouping, since *T. costalimai* and *T. jatai* did not share common ancestry with the other species grouped in the *T. pseudomaculata* subcomplex (Figure 1).

Neves et al.¹⁷ highlight that evolutionarily more distant species have prezygotic barriers that prevent the formation of hybrids, while evolutionarily closer species can produce hybrids that will be later declined (hybrid breakdown) by postzygotic barriers. Based on the above, the absence of production of hybrids between *T. pseudomaculata* and *T. costalimai* (Table 2) demonstrates that *T. costalimai* does not belong to the *T. pseudomaculata* subcomplex [data confirmed by phylogenetic

analyzes (Figure 1)].

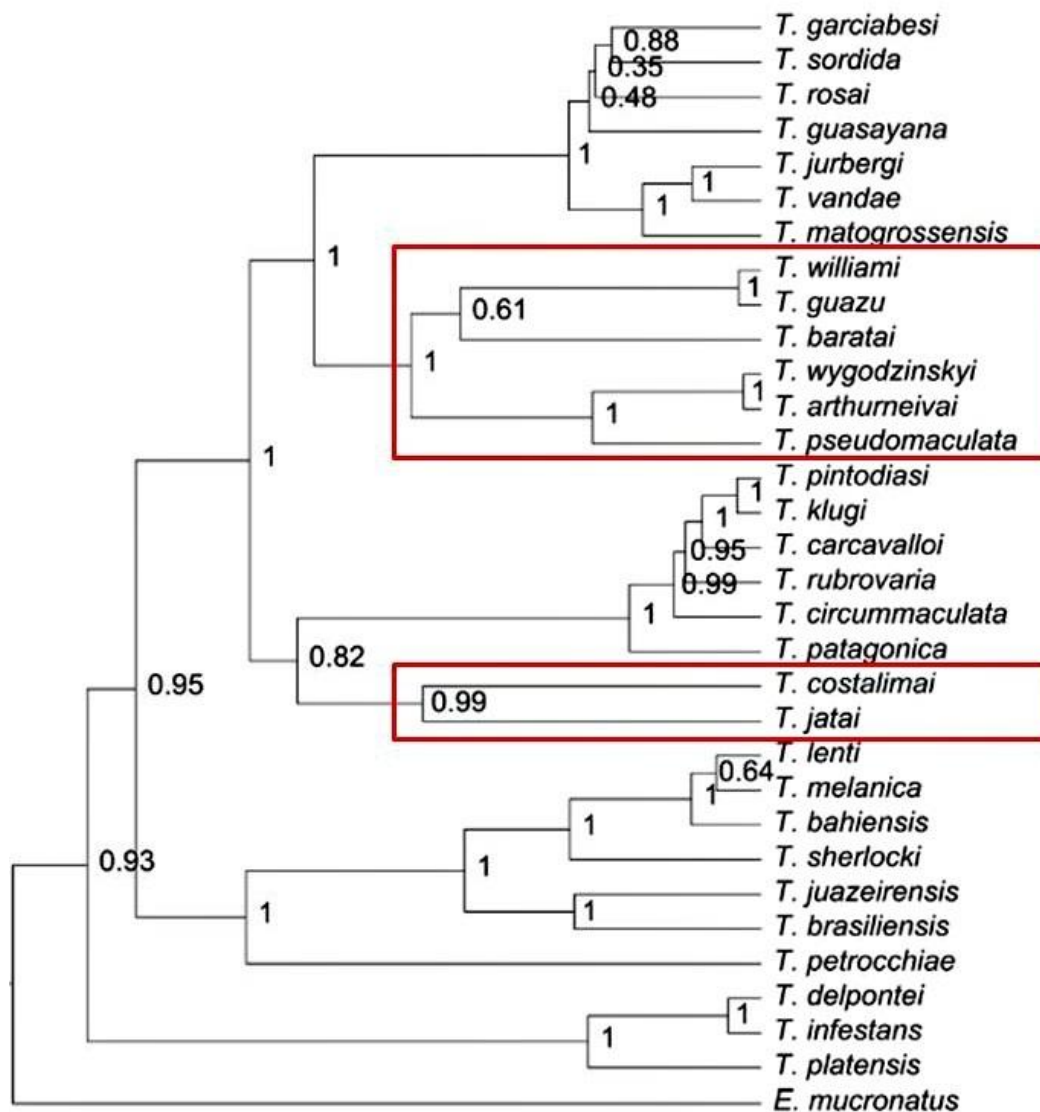


Figure 1. Phylogeny of *Triatoma* spp. from South America. Note that *E. mucronatus* was used as outgroup and that *T. guazu* is a synonym of *T. williami*.

Triatoma jatai is a species that is restricted to the states of Tocantins²⁸ and Ceará²⁹. This taxon is related to *T. costalimai*²⁸, being found in sympatry³⁰. Molecular^{31,32} and morphological^{30,32,33} data allowed us to confirm the specific status of both species. Monteiro et al.³⁴ carried out phylogenetic studies in the *Triatoma* groupings and observed that *T. costalimai* and *T. jatai* could possibly form a clade separate from the species grouped here in the *T. pseudomaculata* subcomplex. The non-grouping of these species in the *T. pseudomaculata* subcomplex, associated

with the absence of hybrid production (interspecific genomic incompatibility) highlights the need to create a new subcomplex, since *T. costalimai* and *T. jatai* form a clade closer to the *T. rubrovaria* subcomplex than *T. pseudomaculata*.

The last *Triatoma* subcomplex proposed was *T. vitticeps*¹¹. This subcomplex is a monophyletic grouping formed by *T. melanocephala* and *T. vitticeps* species. These species were initially grouped in the *T. brasiliensis* subcomplex⁹ and, through phylogenetic systematics³⁵ and experimental crossings¹⁷, were excluded and regrouped in a new subcomplex. Based on Justi et al.⁷ a subcomplex must form a natural group, that is, a monophyletic group. Thus, we propose the creation of the *T. costalimai* subcomplex (Table 3).

Table 3. Updated classification of the complexes and subcomplexes of Triatomini tribe.

Complexes	Subcomplexes
<i>Triatoma phyllosoma</i>	<i>Triatoma dimidiata</i> <i>Triatoma phyllosoma</i>
<i>Nesotriatoma flavida</i>	
<i>Triatoma rubrofasciata</i>	
<i>Triatoma protracta</i>	
<i>Paratriatoma lecticularia</i>	
<i>Triatoma dispar</i>	
<i>Triatoma infestans</i>	<i>Triatoma brasiliensis</i> <i>Triatoma costalimai</i> <i>Triatoma infestans</i> <i>Triatoma maculata</i> <i>Triatoma pseudomaculata</i> <i>Triatoma rubrovaria</i> <i>Triatoma sordida</i> <i>Triatoma vitticeps</i>
<i>Mepraia spinolai</i>	

Based on the above, we confirm the specific status of *T. pseudomaculata* and *T. costalimai*, based on the biological species concept. Furthermore, the reproductive incompatibility, associated with the phylogenetic systematic analyzes demonstrate that *T. costalimai* does not belong to the *T. pseudomaculata* subcomplex. Thus, we suggest that the sister species *T. costalimai* and *T. jatai*

should be grouped into a new subcomplex called *T. costalimai*.

Acknowledgements

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

Ethical standards

Not applicable.

Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interests.

References

1. WHO (World Health Organization), 2023. World Chagas Disease Day. Available at: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Accessed June 06, 2023.
2. Alevi KCC, Oliveira J, Rocha DS, Galvão C, 2021. Trends in taxonomy of Chagas disease vectors (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae): from Linnaean to integrative taxonomy. *Pathogens* 10: 1627.
3. Oliveira Correia JPSO, Gil-Santana HR, Dale C, Galvão C, 2022. *Triatoma guazu* Lent and Wygodzinsky is a junior synonym of *Triatoma williami* Galvão, Souza and Lima. *Insects* 13: 591.

4. Gil-Santana HR, Chavez T, Pita S, Panzera F, Galvão C, 2022. *Panstrongylus noireaui*, a remarkable new species of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) from Bolivia. *ZooKeys* 1104: 203–225.
5. Téllez-Rendón J, Esteban L, Rengifo-Correa L, Díaz-Albiter H, Huerta H, Dale C, 2023. *Triatoma yelapensis* sp. nov. (Hemiptera: Reduviidae) from Mexico, with a Key of *Triatoma* Species Recorded in Mexico. *Insects* 14: 331.
6. Zhao Y, Fan M, Li H, Cai W, 2023. Review of Kissing Bugs (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from China with Descriptions of Two New Species. *Insects* 14: 450.
7. Justi SA, Russo CAM, Mallet JRDS, Obara MT, Galvão C, 2014. Molecular phylogeny of Triatomini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Paras Vect* 7: 149.
8. Justi SA, Galvão C, Schrago CG, 2016. Geological changes of the Americas and their influence on the diversification of the Neotropical kissing bugs (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *PLoS Negl Trop Dis* 10: e0004527.
9. Schofield CJ, Galvão C, 2009. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Trop* 110: 88–100.
10. Pita S, Lorite P, Nattero J, Galvão C, Alevi KCC, Teves SC, Azeredo-Oliveira, MTV, Panzera F, 2016. New arrangements on several species subcomplexes of *Triatoma* genus based on the chromosomal position of ribosomal genes (Hemiptera - Triatominae). *Infect Genet Evol* 43: 225–231.
11. Alevi KCC, Oliveira J, Azeredo-Oliveira MTV, Rosa JA, 2017. *Triatoma vitticeps* subcomplex (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae): A new grouping of Chagas disease vectors from South America. *Paras Vect* 10: 180.
12. De La Fuente AL, Jaramillo N, Barata JM, Noireau F, Diotaiuti , 2011. Misidentification of two Brazilian triatomines, *Triatoma arthurneivai* and *Triatoma wygodzinskyi*, revealed by geometric morphometrics. *Med Vet Entomol* 25: 178-183.

13. Alevi KCC, Imperador CHL, Moreira FFF, Jurberg J, Azeredo-Oliveira MTV, 2016. Differentiation between *Triatoma arthurneivai* and *Triatoma wygodzinskyi* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) using cytotaxonomy. *Gen Mol Res* 15: gmr7869.
14. Monsalve Y, Panzera F, Herrera L, Triana-Chávez O, Gómez-Palacio A, 2016. Population differentiation of the Chagas disease vector *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) from Colombia and Venezuela. *J. Vector Ecol* 41: 72-79.
15. Gómez-Palacio A, Pita D, Abad-Franch F, Monsalve Y, Cantilho-Barraza O, Monteiro FA, Pavan MG, Santos WS, Panzera A, Burgueño-Rodríguez G, Panzera F, 2022. Molecular and cytogenetic evidence for sibling species in the Chagas disease vector *Triatoma maculata*. *Med Vet Entomol* 37: 316-329.
16. Belisário CJ, 2006. Morphological and molecular characterization of hybrids from the cross between *Triatoma macula* (Erichson, 1848) and *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964 (Hemiptera: Reduviidae). Available at: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/9093>. Accessed June 06, 2023.
17. Neves JMS, Sousa PS, Oliveira J, Ravazi A, Madeira FF, Reis YV, Oliveira ABB, Pinotti H, Azeredo-Oliveira MTV, Rosa JA, Alevi KCC, 2020. Prezygotic isolation confirms the exclusion of *Triatoma melanocephala*, *T. vitticeps* and *T. tibiamaculata* of the *T. brasiliensis* subcomplex (Hemiptera, Triatominae). *Infect Genet Evol* 79: 104149.
18. Pinotti H, Oliveira J, Ravazi A, Madeira FF, Reis YV, Oliveira ABB, Azeredo-Oliveira MTV, Rosa JA, Alevi KCC, 2021. Revisiting the hybridization processes in the *Triatoma brasiliensis* complex (Hemiptera, Triatominae): Interspecific genomic compatibility point to a possible recent diversification of the species grouped in this monophyletic complex. *PLoS ONE* 16: e0257992.
19. Olaia N, Alevi KCC, Oliveira J, Cacini GL, Souza EDS, Pinotti H, Silva LA, Rosa JA, 2021. Biology of Chagas disease vectors: Biological cycle and emergence rates of *Rhodnius*

- marabaensis* Souza et al., 2016 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) under laboratory conditions. *Parasitol Res* 120: 2939–2945.
20. Tamura K, Stecher G, Kumar S, 2021. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Mol Biol Evol* 38: 3022–3027.
 21. Edgar RC, 2004. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32: 1792–1797.
 22. Gouy M, Guindon S, Gascuel O, 2010. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol* 27: 221–224.
 23. Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, 2012. Rambaut, A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol Biol Evol* 29: 1969–1973.
 24. Yule GU, 1925. II. A mathematical theory of evolution, based on the conclusions of Dr. J. C. Willis, F.R.S. *Phil Trans R Soc Lond B* 213: 21–87.
 25. Gernhard T, 2008. The conditioned reconstructed process. *J Theor Biol* 253: 769–778.
 26. Rambaut A, Drummond AJ, Xie D, Baele G, Suchard MA, 2018. Posterior summarisation in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Syst Biol* 67: 901–904.
 27. FigTree - Molecular Evolution, Phylogenetics and Epidemiology. Available online: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>. Accessed April 20, 2023.
 28. Gonçalves TCM, Teves-Neves SC, Santos-Mallet JR, Carbajal-de-la-Fuente AL, Lopes CM, 2013. *Triatoma jatai* sp. nov. in the state of Tocantins, Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem. Inst Oswaldo Cruz* 108: 429–437.
 29. Florêncio WG, Meneguetti DUO, Ceretti-Junior W, Marrelli MT, Rosa JA, Oliveira J, 2023. *Triatoma jatai* Gonçalves et al, 2013 (Hemiptera: Heteroptera: Reduviidae: Triatominae): new occurrence for the state of Ceará, Brazil. *Rev Chil Entomol* 49: 227–230.
 30. Müller JN, Freitas SPC, Teves SC, Santos-Mallet JR, Lopes CM, Gonçalves TCM, 2023. Species-specific differences in the egg exochorium of the sympatric taxa *Triatoma*

- costalimai* and *Triatoma jatai* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). J Med Entomol X: 1–10.
31. Teves SC, Gardim S, Carbajal-de-la-Fuente AL, Lopes CM, Gonçalves TC, Santos-Mallet JR, Rosa JA, Almeida CE, 2016. Mitochondrial Genes Reveal *Triatoma jatai* as a Sister Species to *Triatoma costalimai* (Reduviidae: Triatominae). Am J Trop Med Hyg 94: 686–688.
32. Vendrami DP, Ceretti-Junior W, Obara MT, Mendonça VJ, Fonseca EOL, Medeiros-Sousa AR, Marrelli MT, Gurgel-Gonçalves R, 2020. Phenotypic and genetic variation of *Triatoma costalimai* (Hemiptera: Reduviidae). Rev Soc Bras Med Trop 54: 54: e00282020.
33. Teves SC, Gonçalves TCM, Freitas SPC, Lopes CM, Carbajal-de-la-Fuente AL, Santos-Mallet JR, 2020. External female genitalia of *Triatoma jatai*, *Triatoma costalimai* and *Triatoma williamsi* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Paras Vect 13: 538.
34. Monteiro FA, Weirauch C, Felix M, Lazoski C, Abad-Franch F, 2018. Evolution, systematics, and biogeography of the Triatominae, vectors of Chagas disease. Adv. Parasitol 99: 265–344.
35. Gardim S, Almeida CE, Takiya DM, Oliveira J, Araújo RF, Cicarelli RMB, Rosa JA, 2014. Multiple mitochondrial genes of some sylvatic Brazilian *Triatoma*: Non-monophyly of the *T. brasiliensis* subcomplex and the need for a generic revision in the Triatomini. Inf Gen Evol 23: 74–79.

5. CONCLUSÕES GERAIS

Com base na presença de barreira reprodutiva pré-zigótica instalada entre de *T. pseudomaculata* e *T. costalimai* (que inviabilizaram a formação de híbridos), confirmamos o *status* específico das espécies. Além disso, as análises filogenéticas demonstraram que *T. costalimai* e *T. jatai* formam um clado separado das espécies do subcomplexo *T. pseudomaculata*. Dessa forma, a incompatibilidade genômica/reprodutiva observada, associada às análises de sistemáticas filogenéticas, demonstrou que *T. costalimai* não pertence ao subcomplexo *T. pseudomaculata*. Assim, sugerimos que as espécies irmãs *T. costalimai* e *T. jatai* sejam agrupadas em um novo subcomplexo denominado *T. costalimai*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEVI, K.C.C., et al. *Triatoma vitticeps* subcomplex (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae): A new grouping of Chagas disease vectors from South America. **Parasites & Vectors**, v. 10, p. 180, 2017.

ALEVI, K.C.C.; et al. Trends in Taxonomy of Chagas Disease Vectors (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae): From Linnaean to Integrative Taxonomy. **Pathogens**, v. 10, p. 1627, 2021.

BELISÁRIO, C.J., 2006. **Morphological and molecular characterization of hybrids from the cross between *Triatoma macula* (Erichson, 1848) and *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964 (Hemiptera: Reduviidae).** Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/9093>. Acesso em 06 de Junho de 2023.

Coleção de Triatominae - Unesp Araraquara. Disponível em: <https://www2.fcfar.unesp.br/#!/triatominae/subfamilia-triatominae/triatoma/triatoma-platensis/>. Acesso em 06 de Junho de 2023.

DE LA FUENTE, A.L., et al. Misidentification of two Brazilian triatomines, *Triatoma arthurneivai* and *Triatoma wygodzinskyi*, revealed by geometric morphometrics. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 25, p. 178-183, 2011.

DIAS, J.V., et al. Capture of *Triatoma arthurneivai* (Hemiptera: Reduviidae) using a new luminous trap in Southeast Brazil. **Revista da Sociedade Brasileiro de Medicina Tropical**, v. 44, p. 774-776, 2011.

GALVÃO, C., et al. New geographical distribution of *Triatoma deaneorum* Galvão, Souza & Lima 1967, new designation for *Triatoma deanei* (Hemiptera, Reduviidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, p. 587-589, 2001.

GARDIM, S., et al. Evolutionary relationships of the *Triatoma matogrossensis* subcomplex, the endemic triatoma in Central-Western Brazil, based on mitochondrial DNA sequences. **American Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, v. 89, p. 766-774, 2013.

GIL-SANTANA, H.R.; et al. *Panstrongylus noireau*, a remarkable new species of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) from Bolivia. **ZooKeys**, v. 1104, p. 203-225, 2022.

GÓMEZ-PALACIO, A., et al. Molecular and cytogenetic evidence for sibling species in the Chagas disease vector *Triatoma maculata*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 37, p. 316-329, 2023.

GONÇALVES, T.C.M.; et al. *Triatoma jatai* sp. nov. in the state of Tocantins, Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 429-437, 2013.

JUSTI SA, et al. Geological changes of the Americas and their influence on the diversification of the Neotropical kissing bugs (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **PLoS Neglected Tropical Disiases**, v. 10, p. 4, 2016.

JUSTI, AS, et al. Molecular phylogeny of Triatomini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 149, 2014.

MONSALVE, Y., et al. Population differentiation of the Chagas disease vector *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) from Colombia and Venezuela. **Journal of Vector Ecology**, v. 41, p. 72-79, 2016.

NEVES, et al. Prezygotic isolation confirms the exclusion of *Triatoma melanocephala*, *T. vitticeps* and *T. tibiamaculata* of the *T. brasiliensis* subcomplex (Hemiptera, Triatominae). **Infection Genetics and Evolution**, v. 79, p. 104149, 2020.

OLIVEIRA-CORREIA, J.P.S.; et al. *Triatoma guazu* Lent and Wygodzinsky Is a Junior Synonym of *Triatoma williami* Galvão, Souza and Lima. **Insects**, v. 13, p. 591, 2022.

PANZERA, Y, et al. High dynamics of rDNA cluster location in kissing bug holocentric chromosomes (Triatominae, Heteroptera). **Cytogenetics and Genome Research**, v. 138, p. 56–67, 2012.

PINOTTI, H. et al. Revisiting the hybridization processes in the *Triatoma brasiliensis* complex (Hemiptera, Triatominae): interspecific genomic compatibility point to a possible recent diversification of the species grouped in this monophyletic complex. **PLoS One**, v. 16, p. e0257992, 2021.

PITA, S.; et al. New arrangements on several species subcomplexes of *Triatoma* genus based on the chromosomal position of ribosomal genes (Hemiptera - Triatominae). **Infection Genetics and Evolution**, v. 43, p. 225-231, 2016.

SCHOFIELD, C.J.; GALVÃO, C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. **Acta Tropica**, v. 110, p. 88-100, 2009.

TÉLLEZ-RENDÓN, J.; et al. *Triatoma yelapensis* sp. nov. (Hemiptera: Reduviidae) from Mexico, with a Key of *Triatoma* Species Recorded in Mexico. **Insects**, v. 14, p. 331, 2023.

WHO- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. 2023. Disponível em: [http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Acesso em 05 de junho de 2023.

ZHAO, Y., et al. Review of Kissing Bugs (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from China with Descriptions of Two New Species. **Insects**. v. 14, p. 450, 2023.