



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

**MÁRCIA MARIA URBANIN CASTANHOLE**

**Relacionamento filogenético entre espécies pertencentes às  
famílias Belostomatidae, Gelastocoridae, Gerridae, Notonectidae,  
Veliidae (Hemiptera: Heteroptera) e Cercopidae  
(Hemiptera: Auchenorrhyncha)**

**São José do Rio Preto-SP**  
**2013**



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

**MÁRCIA MARIA URBANIN CASTANHOLE**

**Relacionamento filogenético entre espécies pertencentes às  
famílias Belostomatidae, Gelastocoridae, Gerridae, Notonectidae,  
Veliidae (Hemiptera: Heteroptera) e Cercopidae  
(Hemiptera: Auchenorrhyncha)**

Tese apresentada para obtenção do Título de Doutor em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Profa. Dra. Mary Massumi Itoyama

São José do Rio Preto-SP  
2013

Castanhole, Márcia Maria Urbanin.

Relacionamento filogenético entre espécies pertencentes às famílias Belostomatidae, Gelastocoridae, Gerridae, Notonectidae, Veliidae (Hemiptera:Heteroptera) e Cercopidae (Hemiptera:Auchenorrhyncha)/ Márcia Maria Urbanin Castanhole. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2013. 106 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Mary Massumi Itoyama  
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de  
Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Filogenias. 2. Regiões gênicas. 3. Insetos aquáticos e terrestres.  
4. Auchenorrhyncha. 5. Heteroptera. I. Itoyama, Mary Massumi. II.  
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e  
Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 575.86

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE  
Campus de São José do Rio Preto - UNESP



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

**MÁRCIA MARIA URBANIN CASTANHOLE**

**Relacionamento filogenético entre espécies pertencentes às  
famílias Belostomatidae, Gelastocoridae, Gerridae, Notonectidae,  
Veliidae (Hemiptera: Heteroptera) e Cercopidae  
(Hemiptera:Auchenorrhyncha)**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

**BANCA EXAMINADORA**

Profª. Dra. Mary Massumi Itoyama  
UNESP – São José do Rio Preto  
Orientadora

Profª. Dra. Maria Aparecida Marin-Morales  
UNESP- Rio Claro

Profª. Dra. Nathalia de Setta  
Universidade Federal do ABC

Prof. Dr. Francisco Langeani Neto  
UNESP – São José do Rio Preto

Profª. Dra. Lilian Castiglioni  
UNESP- São José do Rio Preto

São José do Rio Preto  
04 de março de 2013

## RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo principal contribuir com informações relevantes a cerca de espécies pertencentes a percevejos aquáticos e cigarrinha-das-pastagens neotropicais brasileiras. As relações filogenéticas entre espécies das famílias Belostomatidae, Gelastocoridae, Gerridae, Notonectidae e Veliidae (Heteroptera) e Cercopidae (Auchenorrhyncha) vêm sendo bastante discutidas, devido ao grande número de espécies pertencentes a esses dois grupos, quanto a sua monofilia e proximidade entre os táxons. Neste trabalho, foram realizadas análises de variabilidade genética, composição nucleotídica e relacionamentos filogenéticos baseada em aspectos citogenéticos (número de autossomos, sistema cromossômico do sexo, presença ou ausência de m-cromossomos e cromossomos Y), ecológicos (habitat e hábito alimentar), moleculares (marcadores *COI*, *16S* e *28S*) e morfológicos (morfologia dos testículos) combinados e separadamente. Por meio das análises foi possível verificar que os táxons estudados de Cercopidae (Cicadomorpha, Auchenorrhyncha) e das infraordens Gerromorpha e Nepomorpha de Heteroptera apresentaram-se monofiléticos. Diante dos relacionamentos observados, foi possível propor também, que o estado ancestral para o sistema cromossômico do sexo foi o X0, enquanto que para o número de autossomos não foi possível estabelecer quais eventos estão ocorrendo, se de fissão ou fusão. Os resultados apresentados são de grande importância em virtude da escassez de dados de percevejos aquáticos e cigarrinha-das-pastagens, principalmente em análises combinadas, contendo dados moleculares, citogenéticos, ecológicos e morfológicos. Porém, ainda é necessária a análise de um maior número de táxons e de regiões gênicas para corroborar tais achados.

Palavras-Chave: Percevejos aquáticos. Cigarrinhas. Região gênica. Citogenética. Morfologia.

## **ABSTRACT**

*The present study aimed at contributing with relevant information about the species of aquatic bugs and spittlebugs in Brazilian neotropical pastures. Phylogenetic relationships among species of the families Belostomatidae, Gelastocoridae, Gerridae, Notonectidae and Veliidae (Heteroptera) and Cercopidae (Auchenorrhyncha) have been widely discussed, due to the large number of species belonging to these two groups, as their monophyly and closeness among taxa. In this study, we performed analyzes of genetic variability, nucleotide composition and phylogenetic relationships based on cytogenetic aspects (number of autosomes, sex chromosome system, presence or absence of m-chromosomes and Y chromosomes), ecological (habitat and feeding habits), molecular (COI, 16S and 28S markers) and morphological (morphology of the testes) combined and separately. Through the analysis we found that the taxa studied to Cercopidae (Cicadomorpha, Auchenorrhyncha) and infraorders Gerromorpha and Nepomorpha of Heteroptera showed up monophyletic. Given the observed relationships, it was also possible to propose that the ancestral state for the sex chromosome system was the X0, while the number of autosomes was not possible to establish which events are occurring fission or fusion. The results presented are of great importance due to the scarcity of data from aquatic bugs and spittlebugs, mainly in combined analyzes, data containing molecular, cytogenetic, morphological and ecological. However, it is still necessary to analyze a greater number of taxa and gene regions to corroborate these findings.*

*Keywords: Aquatic bugs. Spittlebugs. Genic regions. Cytogenetic. Morphologic.*

*“Dedico esse trabalho aos meus pais, Idevaldo e Márcia, que nunca mediram esforços, para fazer dos meus sonhos realidade”. Obrigada!*

## **AGRADECIMENTOS**

*À Deus, por ser o caminho, a verdade e a luz que nos conduz;*

*Aos meus pais, Ivaldo Castanhole e Márcia Regina Urbanin Castanhole, por guiarem meu caminho com muito amor e perseverança, e fazerem de mim motivo de orgulho;*

*À minha orientadora, Profa. Dra. Mary Massmi Itoyama, que da sua maneira sempre nos ensinou a trabalhar e fazer pesquisa. Dedicada e presente, nas horas boas e ruins, formando-nos como pessoa e como profissionais;*

*Ao meu irmão, Ivaldo Castanhole Júnior, um grande incentivador para as minhas conquistas;*

*Ao Cleiton Geraldo Nunes, meu companheiro, amigo e dedicado amor de todas as horas, que com seu sorriso consegue alegrar o meu dia;*

*Às minhas queridas avós, Aparecida Barreto Urbanin e Josephina Fernandes Castagnoli, que com a fé e muito amor conseguem mover montanhas;*

*À minha madrinha, Vera Lúcia Castanholi, pelo estímulo ao aprender;*

*Aos meus padrinhos, Fernando Luis Akasaki e Marisa Barreto Urbanin Akasaki, que sempre acreditaram no meu potencial e me incentivaram a continuar;*

*À Sandra Regina de Carvalho Marchesin, que me auxiliou com muita dedicação no desenvolvimento e aperfeiçoamento do meu trabalho;*

*À todos os meus familiares, tios (Carlos Sérgio Urbanin, Fernando Aulet Gandour, Nilson Urbanin Barreto e Noemio Barreto Urbanin), tias (Elza Aparecida Castagnoli Gandour, Isabel Cristina de Souza Urbanin, Maria José Rosa do Nascimento e Marta Salviano Urbanin), primos e primas (Carina, Carlinhos, Cléber, Clebiana, Isabela, Kelen, Marcela, Micheli, Nilsinho), que me acompanham desde sempre, com conselhos e palavras essenciais;*

*Aos meus amigos, que sempre fizeram parte da minha vida e torceram por mim, em especial à Aline Thais de Souza, Aline Sumitani Murakami, Maria Clara Segóvia do Carmo Lisboa e Silvio César Martins;*

*À Mariana Oliveira Gomes, amiga de todas as horas, de longas conversas sobre a vida e de como iremos formular o conhecimento;*



*Ao meu amigo Luís Lénin Vicente Pereira, com quem tenho muita afinidade e que considero um grande companheiro de pesquisa, de experiências e para a vida;*

*À Hederson Vinicius de Souza, Leiza Penariol Viola, Adriana Granzotto, Elias Alberto Gutierrez Carnelossi e todos os amigos da Pós Graduação, pelas longas conversas, estímulos e companheirismo ao longo dos anos;*

*Aos amigos do laboratório e co-orientados, Tatiani Seni de Souza Firmino (sem esquecer do Pedro Henrique), Cecília Artico Banho, Ana Luiza Rauber e Juliana de Moura, que às vezes nos tiram do sério, mas continuam sendo muito importantes;*

*Ao Prof. Dr. José Raul Valério, pela atenção e disposição em ajudar com as cigarrinhas;*

*Aos docentes e funcionários da UNESP, pelo profissionalismo, ensinamentos e amizade;*

*À FAPESP, Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio financeiro;*

*Aos membros da banca de Qualificação (Profa. Dra. Eliana Morielle Versute e Prof. Dr. Fernando Barbosa Noll) e Defesa (Profa. Dra. Maria Aparecida Marin Morales, Profa. Dra. Nathalia de Setta, Profa. Dra. Lilian Castiglioni e Prof. Dr. Francisco Langeani Neto), por lerem meu trabalho e contribuírem com suas considerações;*

*Construir um trabalho, uma pesquisa, não é fácil, mas é ainda mais difícil construir laços! Os meus são fortes, Graças a Deus e a todos vocês, que fazem ou fizeram parte de minha vida. A todos o meu, **Muito Obrigada!***

*"Mestre não é quem sempre ensina, mas quem de repente aprende."*

*Guimarães Rosa*

*"Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre."*

*Paulo Freire*

## SUMÁRIO

<b>I. INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	21
<b>III. CAPÍTULOS</b> .....	23
<b>Artigo 1:</b> The first assess of the haplotypes from <i>COI</i> gene sequences in species of spittlebugs (Cicadomorpha: Hemiptera) and aquatic true bugs (Gerromorpha and Nepomorpha: Hemiptera) in Brazil.....	24
<b>Artigo 2:</b> Inferências filogenéticas de insetos aquáticos pertencentes às infraordens Gerromorpha e Nepomorpha e terrestres de Cicadomorpha, utilizando genes mitocondrial e nuclear.....	42
<b>Artigo 3:</b> Determinação da relação filogenética de percevejos aquáticos e semiaquáticos neotropicais a partir de dados combinados .....	65
<b>IV. DISCUSSÃO GERAL</b> .....	85
<b>V. CONCLUSÃO</b> .....	92
<b>VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	95

## **I. INTRODUÇÃO**

---

## I. INTRODUÇÃO

A ordem Hemiptera com, aproximadamente, 82.000 espécies representa o quinto maior grupo de insetos, superados por Coleoptera, Diptera, Hymenoptera e Lepidoptera (SCHUH; SLATER, 1995; GRIMALDI; ENGEL, 2005; CAMERON et al., 2006; CRYAN; URBAN, 2012). Atualmente, está subdividida em quatro subordens: Auchenorrhyncha, Coleorrhyncha, Heteroptera e Sternorrhyncha (BOURGOIN; CAMPBELL, 2002; FORERO, 2008).

A monofilia da Ordem Hemiptera tem sido reconhecida a partir da morfologia de estruturas bucais específicas da mandíbula e maxila (KRISTENSEN, 1981, 1991; YOSHIZAWA; SAIGUSA, 2001; FORERO, 2008).

Das subordens que compõem a ordem Hemiptera, Sternorrhyncha (psilídeos, moscas brancas, pulgões e escalas) apresenta-se monofilética e como grupo irmão de Auchenorrhyncha e Coleorrhyncha + Heteroptera (SCHLEE, 1969; ZRZAVY, 1990; WHEELER et al., 1993; CAMPBELL et al., 1994; VON DOHLEN; MORAN, 1995; CAMPBELL et al., 1995, FORERO, 2008), como apresentado por Maddison (1995), baseado em Zrazavy (1990) e Wheeler et al. (1993) (Figura 1).

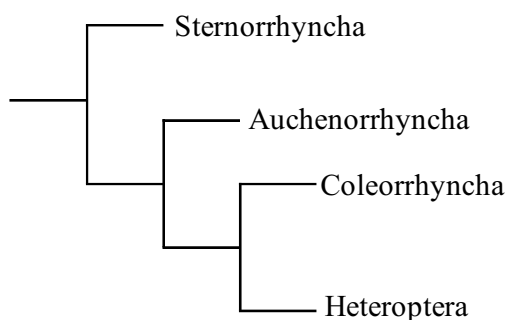


Figura 1. Filogenia de Hemiptera baseada em Zrazavy (1990) e Wheeler et al. (1993) e apresentada por Maddison (1995).

A subordem Auchenorrhyncha apresenta mais de 25.000 espécies distribuídas em duas grandes infraordens, Cicadomorpha (superfamílias Cicadoidea, Cercopoidea e Membracoidea) e Fulgoromorpha (Fulgoroidea)

(GRIMALDI; ENGEL, 2005; CRYAN; URBAN, 2012). A superfamília Cercopoidea (Cicadomorpha) apresenta 3.000 espécies descritas e, aproximadamente, 340 gêneros representados em cinco famílias (Cercopidae, Aphrophoridae, Clastopteridae, Machaerotidae e Epiptygidae). Os Cercopoidea, também denominados cigarrinhas, são sugadores exclusivos do xilema das plantas (CRYAN; SVENSON, 2010). Trata-se de um grupo de insetos cuja alimentação, tanto pelas ninfas como pelos adultos, pode determinar a morte da porção aérea das plantas. As ninfas desses insetos permanecem envoltas por uma massa de espuma, produzida pelas mesmas, até a emergência do inseto adulto. A ocorrência de cigarrinhas coincide com a estação chuvosa, justamente quando as plantas forrageiras estão em franco crescimento e os animais, recuperando-se da seca anterior, quando ganham peso e adquirem condições para a reprodução e o abate. Esses insetos são capazes de reduzir drasticamente a produção e a qualidade das pastagens. O comprometimento das pastagens, anualmente atacadas por estes insetos, tem se constituído em um problema anual para a bovinocultura de corte nacional (VALÉRIO et al., 2001).

Na família Cercopidae (Cercopoidea) encontram-se as cigarrinhas que causam danos econômicos às plantações no mundo inteiro (HEINRICH; BARRION, 2004), incluindo o arroz (PACHECO et al., 1984; WILSON; CLARIDGE, 1991), a cana-de-açúcar (RODMAN; MILLER, 1992), o milho (PECK et al., 2001) e as pastagens, tais como *Brachiaria* sp. e *Axonopus* sp. (CLARK et al., 1980; PIRES et al., 2000; HOLMANN; PECK, 2002). Como exemplo, podemos destacar as cigarrinhas dos gêneros *Mahanarva*, *Zulia*, *Deois*, *Notozulia* e *Prosapia*, que são consideradas sérias pragas para as culturas da América Central e do Sul, causando uma redução de até 70% na produtividade agrícola nas áreas infestadas (SANZ, 1997; THOMPSON, 2004; LEITE et al., 2005; THOMPSON; LEON GONZALEZ, 2005; CRYAN; SVENSON, 2010).

A monofilia da subordem Auchenorrhyncha é constantemente questionada, gerando intensos debates. Goodchild (1996), com base em dados morfológicos e histológicos do trato digestório de diferentes representantes, apresentou Auchenorrhyncha como parafilética, enquanto Fulgoromorpha

relacionou-se a Heteroptera. Os dados de Hamilton (1981) reforçam a parafilia obtida, colocando Fulgoromorpha como grupo-irmão de Cicadomorpha + Aphidiformes. Entretanto, Grimaldi e Engel (2005) baseados em aspectos morfológicos das antenas, sugerem que Auchenorrhyncha seja de fato monofilético. Urban e Cryan (2007) apresentam a partir da análise de quatro genes e 83 espécies de Fulgoromorpha, a monofilia da subordem, colocando Auchenorrhyncha como grupo-irmão de Heteroptera. Cryan e Urban (2012) confirmam a monofilia da subordem utilizando em suas análises um maior número de genes (sete regiões gênicas), entretanto essas relações ainda são questionadas (LETSCHE et al., 2012).

A subordem Heteroptera (ordem Hemiptera) representa o mais diversificado grupo de insetos endopterigotos e não holometábolos, apresentando mais de 40.000 espécies (WEIRAUCH; SCHUH, 2011). Os Heteroptera, de maneira geral, podem viver como parasitas de pássaros e mamíferos, alimentarem-se de todas as partes das plantas e de fungos, capturar outros artrópodes, viver nas teias de aranhas, na água ou na sua superfície, com poucas espécies ocupando os oceanos. Podem ser fitófagos, predadores ou hematófagos (SCHUH; SLATER, 1995). Eles são classificados em sete infraordens, sendo Enicocephalomorpha, Dipsocoromorpha, Gerromorpha, Nepomorpha, Leptopodomorpha, Cimicomorpha e Pentatomomorpha (LI et al., 2012). As infraordens Gerromorpha e Nepomorpha compreendem, aproximadamente, 92% da diversidade dos insetos aquáticos, sendo que algumas espécies apresentam importância econômica por serem predadores intermediários da cadeia alimentar, alimentando-se de larvas de mosquitos e servindo de alimento para os peixes (JENKINS, 1964; MENKE, 1979).

A infraordem Gerromorpha compreende oito famílias e a maioria está distribuída nos trópicos. Esse grupo representa os insetos que vivem na superfície da água, como predadores e carniceiros. Gerridae e Veliidae são as famílias mais numerosas e estão dispersas por todo o mundo (DITRICH; KOSTAL, 2011). Os insetos pertencentes à família Gerridae, são conhecidos como animais de passadas largas, pois se movimentam sobre a água usando

simultaneamente as pernas medianas e posteriores. Vivem na superfície das lagoas, de córregos lentos, de pântanos, e de outras águas paradas. Podem mover-se muito rapidamente, até 1,5 m/s, na superfície da água. O comprimento dos insetos é bastante variável, de 1,6 a 36 mm, possuindo pernas compridas e o corpo muito próximo do arredondado. Eles apresentam dieta insetívora, alimentando-se de pequenos insetos que, eventualmente, caem sobre a água e seus ovos são depositados sobre objetos flutuantes (BORROR; DELONG, 1988). As espécies da família Veliidae, são pequenos, gregários e predadores, também, vivem na superfície de águas calmas, como os indivíduos da família Gerridae (UESHIMA, 1979).

A infraordem Nepomorpha compreende cerca de 2.000 espécies, distribuídas em onze famílias, seguindo a classificação de Stys e Jansson (1988). Destas onze famílias, nove apresentam o desenvolvimento totalmente aquático (jovens e adultos), como por exemplo, os insetos das famílias Belostomatidae e Notonectidae. Os representantes das famílias Ochteridae e Gelastocoridae vivem às margens dos habitats de água doce (HEBSGAARD et al., 2004). Os insetos da família Notonectidae, são comumente conhecidos como nadadores de costas, por nadarem ou saírem em disparada sobre suas costas. Além disso, eles são caracterizados por possuírem pernas posteriores adaptadas para a natação. Já os pertencentes à família Belostomatidae, muitas vezes referidos como insetos gigantes d'água, estão distribuídos por todo mundo, embora sua maior diversidade esteja nos trópicos, normalmente associados com a vegetação encontrada em águas estagnadas ou de baixo fluxo. São conhecidos pelo comportamento do macho, pois este cuida dos ovos fecundados sem a cooperação da fêmea (INADA et al., 2011; PAPERESCHI; BRESSA, 2006; PEREIRA et al., 1993; SMITH, 1997; TALLAMY, 2000). Os insetos pertencentes ao gênero *Gelastocoris* (Gelastocoridae) possuem hábito de vida semi-aquático, e são encontrados nas margens dos corpos d'água doce onde o solo é constantemente encharcado (BORROR et al., 1979; PEREIRA et al., 2007). As espécies deste gênero possuem hábito alimentar predador generalista, capturando pequenas presas que



se encontram nas margens dos corpos d'água. Como não são adaptados à vida aquática, os gelastocorídeos evitam a submersão (MERRITT; CUMMINS, 1984).

A monofilia de Heteroptera é normalmente assumida com base em evidências morfológicas e moleculares, em que três hipóteses alternativas são propostas para os táxons pertencentes às infraordens de Heteroptera, conforme a Figura 2 (WHEELER et al., 1993; MAHNER, 1993; SHCHERBAKOV; POPOV, 2002; XIE et al., 2008; WEIRAUCH; SCHUH, 2011). A partir dessas análises é possível verificar que as relações entre as infraordens de Heteroptera ainda não estão bem definidas (WEIRAUCH; SCHUH, 2011; LI et al., 2012).

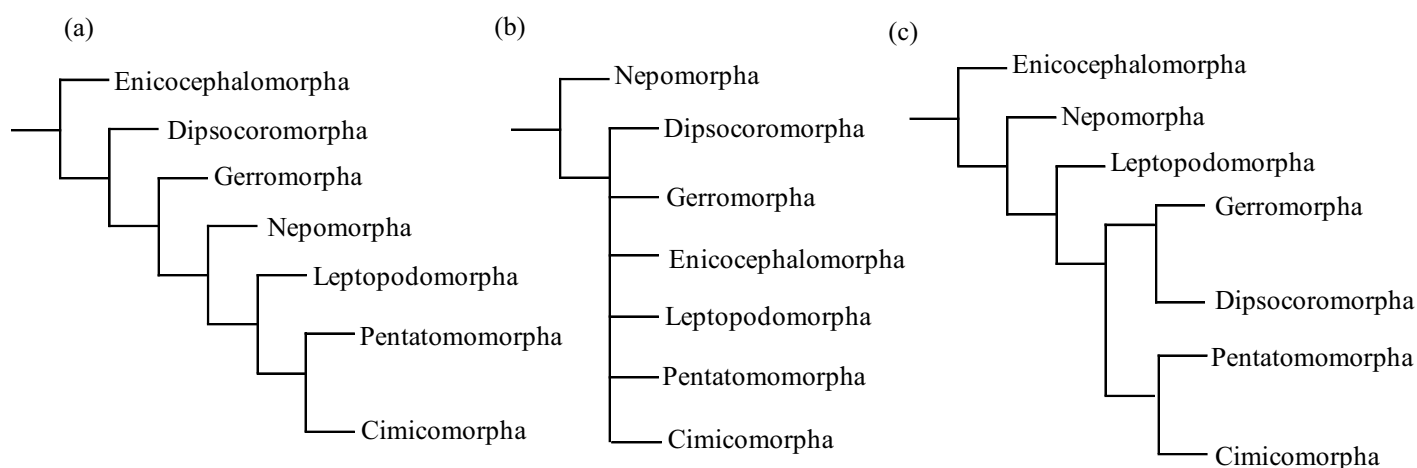


Figura 2. Filogenias de Heteroptera, baseadas em a) Wheeler et al. (1993); b) Mahner (1993), Shcherbakov e Popov (2002); c) Xie et al. (2008).

A utilização de dados moleculares em diversos estudos vem sendo feita com maior frequência nos mais diferentes grupos taxonômicos, contribuindo para avanços consideráveis para a biologia das espécies, ecologia, comportamento, genética e evolução (SUNNUCKS, 2000; AVISE, 2004). Isto porque as análises moleculares revelam, não somente detalhes do DNA, mas também condições de estados variáveis, cuja base genética particular e modos de transmissão podem ser precisamente especificados (AVISE, 2004).

Várias metodologias são utilizadas para revelar marcadores genéticos (polimorfismos) e numerosas abordagens baseadas em PCR

(*Polymerase Chain Reaction*), têm sido desenvolvidas para identificar esses marcadores (AFLPs, RAPDs, SSCPs, SINES, SNPs, STRs), além de outras características polimórficas do genoma (AVISE, 2004; YAMADA, 2010). Esses vários marcadores apresentam taxas de substituição/evolução diferentes. Assim sua utilização poderá auxiliar nos estudos que abordam problemas que vão desde a identificação de indivíduos e espécies crípticas, até mesmo a formulação de hipóteses filogenéticas em grupos supra-específicos (SOLÉ-CAVA, 2001). Em termos de evolução molecular, as classes de marcadores moleculares aliadas às técnicas de clonagem e sequenciamento de DNA tem possibilitado um rápido acúmulo de informações sobre a estrutura de genomas de eucariontes (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Marcadores moleculares obtidos a partir do DNA mitocondrial (mtDNA) têm sido especialmente utilizados na obtenção de haplótipos de diferentes espécies. O mtDNA é uma molécula circular, que em animal apresenta conteúdo gênico extremamente conservado, sendo que cerca de 90% do genoma consiste de regiões codificantes. Apresenta dois genes para subunidades ribossômicas (12S e 16S), 22 para os RNA transportadores (tRNA), três para as subunidades da enzima citocromo oxidase (*COI*, *II* e *III*), um para o citocromo b, dois para as subunidades da ATP sintase (6 e 8) e sete para as subunidades da NADH desidrogenase. Existe, também, uma região não codificadora, responsável pela origem da replicação e transcrição da molécula, e rica em A+T nos invertebrados (MORITZ et al., 1987; NAHUM, 2001).

Esse DNA apresenta diversas características que o torna atraente para a taxonomia molecular, ou seja, as taxas de substituição geralmente são elevadas quando comparadas às do DNA nuclear, a herança é exclusivamente materna, e há falta de recombinação (HEBERT et al., 2003a,b).

Neste contexto, a utilização de sequências de DNA, principalmente o mtDNA, representa um instrumento promissor na identificação de espécies. Dos genes mitocondriais, o citocromo c oxidase I (*COI*) é o maior e mais conservado (BEARD et al., 1993). Um fragmento de 650 pares de bases da extremidade 5' deste gene foi proposto como padrão global, a chamada "região de código de

barras" de animais (HEBERT et al., 2003a,b). Esta abordagem de código de barras tem sido aplicada com sucesso em vários vertebrados e invertebrados para a delimitação e identificação de espécies (SMITH et al., 2005; ZHOU et al., 2009).

Subconjuntos do código de barras padrão do *COI* têm se mostrado eficazes para a identificação, no nível de espécie, em amostras cujo DNA está degradado (HAJIBABAEI et al., 2006; MEUSNIER et al., 2008).

O gene *16S* codifica a subunidade menor do ribossomo e corresponde a uma região altamente conservada do genoma (WILMOTTE, 1994). Esse gene apresenta um tamanho aproximado de 1237 a 1513 pares de bases e tem sido utilizado para relações filogenéticas em diversos níveis taxonômicos em invertebrados, mas devido à baixa divergência ele pode apresentar erros taxonômicos no nível de gênero, podendo ser útil na determinação das relações filogenéticas de táxons superiores, como família (SIMON et al., 1994; MURAJI et al., 2000).

Estudos com genes nucleares mostram que eles, geralmente, são mais conservados do que os genes mitocondriais, com isso são mais indicados para análises de diversidade e relacionamentos acima da categoria de espécie. Springer et al. (2001) observaram em mamíferos que os éxons nucleares são mais eficientes e alcançam consistentemente maior poder de resolução, comparando bases residuais de tamanhos equivalentes tanto para os genes codificantes de proteínas mitocondriais ou genes ribossomais RNA mitocondriais.

Genes codificadores (rDNA) do RNA ribossômico (rRNA) e respectivos elementos genéticos vem sendo estudados por mais de seis décadas (NOLLER, 2005), com interesses nas investigações farmacêuticas e bioquímicas para estudos comparativos biológicos garantindo uma riqueza de informações sobre as características estruturais, funcionais e evolutivas dessas moléculas.

O gene *28S* (regiões D1, D2 e D3) contém variações no comprimento e composição de bases. Tais informações são informativas nos níveis de família, gênero e espécie (SCHULMEISTER, 2003; GILLESPIE et al., 2006).

Em estudos sistemáticos e filogenéticos de insetos, além da

utilização de dados originados de marcadores moleculares (genes mitocondriais e nucleares), dados citogenéticos também são de extrema importância para o entendimento desse grupo. As primeiras informações citogenéticas relatadas para a subordem Auchenorrhyncha foram obtidas por Boring (1907) em 22 espécies. Halkka (1959) descreveu o número cromossômico de  $n= 5$  a 19 e  $2n= 10$  a 39, para o mesmo grupo. As espécies de Cercopidae *Aphrophora forneri*, *A. alni*, *Neophilaenus lineatus* e *N. exclamationis*, analisadas por Halkka (1964), apresentaram complemento cromossômico de  $14A + XY$ ,  $14A + X0$ ,  $14A + X0$ ,  $9A + XY$ , respectivamente. Dey (1991) analisando citogeneticamente espécies de Cercopidae do gênero *Cosmoscarta* (*C. dimidiata*, *C. septempunctata*, *C. decisa*, *C. elegans* e *C. fluviceps*), verificou que todas apresentam 28 cromossomos, e sistema cromossômico do sexo XY, exceto *C. elegans* que apresentou Neo-XY. Marin-Morales et al. (2002) analisaram duas espécies de Cercopidae que ocorrem no Brasil, *Mahanarva fimbriolata* e *M. posticata* concluindo, para estas espécies,  $2n= 19$  ( $18A + X0$ ) cromossomos.

Com relação às espécies da subordem Heteroptera, elas possuem cromossomos holocêntricos, ausência de estrutura cinetocórica nas células meióticas (BUCK, 1967; COMINGS; OKADA, 1972; MOTZKO; RUTHMAN, 1984; RUFAS; GIMÉNEZ-MARTÍN, 1986; WOLF, 1996); atividade cinética restrita às regiões teloméricas (SCHRADER, 1935, 1940; HUGHES-SCHRADER; SCHRADER, 1961; MOTZKO; RUTHMAN, 1984; GONZALEZ-GARCIA et al., 1996); primeira divisão meiótica reducional para os autossomos e equacional para os sexuais e diversos sistemas cromossômicos do sexo ( $X0$ , XY e múltiplos cromossomos sexuais). Algumas espécies podem possuir também os m-cromossomos, os univalentes e os cromossomos B. O comportamento meiótico desses cromossomos não autossômicos é diferente (UESHIMA, 1979; MANNA, 1984; PAPESCHI; MOLA, 1990; GONZÁLEZ-GARCIA et al., 1996; SUJA et al., 2000).

Na infraordem Gerromorpha, a família Gerridae é caracterizada por possuir sistema cromossômico do sexo  $X0$ , com poucas espécies XY. Apresentam disposição cromossômica em anel na metáfase em visão polar e ausência de m-

cromossomos. O número cromossômico modal é 21 ( $20A + X0$ ) ou 23 ( $22A + X0$ ) (UESHIMA, 1979). Já as espécies da família Veliidae, *Hebrovelia* sp. e *Microvelia reticulata*, apresentam  $2n = 21$  ( $20A + X0$ ) cromossomos (COBBEN, 1968), e as espécies *Velia currens* (POISSON, 1936) e *V.* sp. (UESHIMA, 1979) apresentam  $2n = 25$  ( $24A + X0$ ) cromossomos. Enquanto todas as espécies têm sistema cromossômico do sexo  $X0$ , Takenouchi e Muramoto (1971) relataram também, o sistema cromossômico do sexo  $XY$  para *Microvelia douglasi*.

De acordo com as informações para a infraordem Nepomorpha, Ueshima (1979) verificou que somente 12 espécies e dois gêneros pertencentes à família Notonectidae foram analisados citogeneticamente. O gênero *Anisops* (Anisopinae) é caracterizado por apresentar sistema cromossômico do sexo  $X_1X_20$ , um par de m-cromossomos e número diplóide de cromossomos de 26 para o macho e 28 para a fêmea. Espécies do gênero *Notonecta* (Notonectidae) analisadas possuem sistema cromossômico do sexo  $X0$  ou  $XY$  e  $2n = 24$  ( $20A + 2m + XY$ ) ou 26 ( $22A + 2m + XY$ ) cromossomos. Espécies da família Belostomatidae não possuem o par de m-cromossomos e o sistema cromossômico do sexo pode ser  $XY$ ,  $X_nY$  ou o neo- $XY$ . O número modal de cromossomos para esta família é de  $2n = 26$  (PAPESCHI; BRESSA, 2006). Com relação à família Gelastocoridae somente uma espécie foi analisada citogeneticamente, *Gelastocoris oculatus*, com  $2n = 30A + X_1X_2X_3X_4Y$ , não possuindo, portanto, m-cromossomos (UESHIMA, 1979).

Uma das mais importantes questões relacionadas à evolução do cariótipo em Heteroptera é o problema dos diferentes sistemas cromossômicos do sexo. O problema básico relacionado à evolução desses sistemas em Heteroptera é a questão de qual sistema é o ancestral,  $X0$  ou  $XY$ . O sistema mais comum em Heteroptera é o  $XY$ , mas os táxons apontados como ancestrais em Heteroptera apresentam, principalmente, o sistema  $X0$  (UESHIMA, 1979). O sistema  $X0$  é o mais comum em insetos das ordens basais Odonata, Orthoptera e Psocoptera (WHITE, 1973). Este sistema prevalece, também, na subordem Auchenorrhyncha juntamente com Heteroptera (HALKKA, 1959; KIRILLOVA, 1986, 1987). Ueshima (1979) acredita que o sistema  $XY$  evoluiu a partir do sistema  $X0$ , em

Heteroptera, mas ele reconhece que a informação disponível é rica nas espécies derivadas e muito pobre nos táxons basais (GROZEVA; NOKKALA, 1996).

De acordo com as características das subordens Auchenorrhyncha e Heteroptera e de sua proximidade, o uso de marcadores moleculares e informações citogenéticas podem ser essenciais na caracterização genética desses indivíduos e, assim, contribuir com informações relevantes para melhor compreensão dos grupos.

Diante de todas as informações apresentadas anteriormente, espera-se verificar as relações filogenéticas entre os táxons propostos, contribuindo para o esclarecimento da proximidade entre eles e tentar propor relações de ancestralidade baseadas em características citogenéticas, ecológicas, moleculares e morfológicas.

## **II. OBJETIVOS**

---

## II. OBJETIVOS

Caracterizar a diversidade genética entre os táxons pertencentes às famílias Belostomatidae, Gelastocoridae, Gerridae, Notonectidae e Veliidae (Heteroptera) e Cercopidae (Auchenorrhyncha) e propor as relações filogenéticas.

Os nossos objetivos específicos foram:

- a) Analisar a diversidade genética entre espécies neotropicais de cigarrinhas-das-pastagens e percevejos aquáticos, a partir das sequências do gene mitocondrial *COI*;
- b) Propor as relações filogenéticas entre espécies pertencentes às infraordens Gerromorpha e Nepomorpha (Heteroptera) e Cicadomorpha (Auchenorrhyncha) baseada nas regiões gênicas *COI*, *16S* rDNA e *28S* rDNA;
- c) Propor as relações entre os táxons das infraordens Gerromorpha e Nepomorpha (Heteroptera) a partir de dados moleculares (*COI*, *16S* rDNA e *28S* rDNA), ecológicos, morfológicos e citogenéticos.



### **III. CAPÍTULOS**

---

**ARTIGO I**

---

**Artigo 1 - The first assess of the haplotypes from *COI* gene sequences in species of spittlebugs (Cicadomorpha: Hemiptera) and aquatic true bugs (Gerromorpha and Nepomorpha: Hemiptera) in Brazil**

**Haplotypes from *COI* in spittlebugs and true bugs**

Castanhole MMU<sup>†</sup>, Marchesin SRC<sup>2</sup>, Pereira LLV<sup>1</sup>, Moreira FFF<sup>3</sup>, Barbosa JF<sup>3</sup>, Valério JR<sup>4</sup> and Itoyama MM<sup>1</sup>.

<sup>†</sup> corresponding author: [marcinha.uc@gmail.com](mailto:marcinha.uc@gmail.com)

<sup>1</sup> Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP - Univ Estadual Paulista, Departamento de Biologia, Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth, São José do Rio Preto, SP, Brasil, +55 (17) 3221 2385.

<sup>2</sup>UNIP- Universidade Paulista, São José do Rio Preto, SP.

<sup>3</sup>UFRJ- Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

<sup>4</sup> EMBRAPA/GADO DE CORTE – Campo Grande, MS.

**Article submitted to Genetics and Molecular Research**

**Keywords:** Heteroptera; Auchenorrhyncha; Cicadomorpha; Gerromorpha; Nepomorpha; mtDNA.

**Abstract:** The objective of this study was to present the first analysis of the *COI* gene sequences in 22 species of spittlebugs and aquatic true bugs sampled from São Paulo state (Brazil) and to use this information to determine the variability within this group. Considering the potential information for each codon position, we observed that the third base was the most variable, and the first base was conservative. The analysis of distance revealed that the species *Mahanarva fimbriolata* and *Deois flavopicta* had the greatest genetic distance (0.181), and the species *Notozulia entreriana* and *Mahanarva* sp. had the smallest distance (0.055), with an average variation of 0.119. In Gerromorpha, the greatest distance occurred between *Halobatopsis platensis* and *Rhagovelia zela* (0.401), while *Cylindrostethus palmaris* and *Brachymetra albinervis albinervis*\*\*<sup>2</sup>, presented

0.187, and the average value observed for the Gerromorpha was 0.265. In the Nepomorpha, the species *Buenoa antigone antigone* and *Belostoma micantulum* had the highest genetic distance (0.337), while *Martarega brasiliensis* and *B. a. antigone* (0.154) had the lowest. The average value observed for Nepomorpha was 0.203. For species Cicadomorpha (Auchenorrhyncha) and Nepomorpha (Heteroptera), the results indicate that the *COI* gene has been conserved, yet it is useful for characterization of the different taxa analyzed contributing with important issues. *COI* analysis was unable to resolve some of the groups for Gerromorpha. Additional studies with different markers should be conducted to confirm the observations in this study.

### **Introduction**

The order Hemiptera is currently classified into four suborders: Auchenorrhyncha, Coleorrhyncha, Sternorrhyncha, and Heteroptera (Carver et al., 1991; Forero, 2008). The suborder Auchenorrhyncha (part of the paraphyletic clade Homoptera on former classifications) includes, among others, the spittlebugs, a group of hemipterans belonging to the superfamily Cercopoidea, which are important components of grass entomofauna. The family Cercopidae, an important member of this superfamily, is one of the largest groups of sucking insects, with representatives being phytophagous and feeding predominantly on xylem. Approximately 1500 species in 150 genera have so far been described in this family (Liang and Webb, 2002), being distributed mainly in tropical and subtropical regions. Of these, approximately 400 species are present in South America, with several important pests of forage grasses and sugar cane (Costes and Webb, 2004; Castanhole et al., 2010). In Brazil, these sharpshooters are also pests of sugar cane and pastures, with great importance for biological control studies and systematics (Milanez et al., 1983; Zanol, 1996).

Heteroptera, or true bugs, is the largest and most diverse group of insects with incomplete metamorphosis. This suborder has seven infraorders, including Gerromorpha and Nepomorpha, and approximately 80 families, which can be found on all continents except Antarctica and on some islands (Schuh and

Slater, 1995). In the region of São José do Rio Preto (Brazil), Heteroptera families that are commonly found include Belostomatidae, Coreidae, Gelastocoridae, Gerridae, Lygaeidae, Notonectidae, Pentatomidae, Phyrrocoridae, Reduviidae, Rhopalidae and Veliidae. They can be either phytophagous, predators or hematophagous. Specifically, these insects can live as parasites of birds and mammals, feed on plants and fungi or capture other arthropods in spider webs or water. Also, a few Heteroptera species reside in the ocean (Schuh and Slater, 1995).

Insects are extremely complex groups due to its great diversity of mitochondrial genomes may present rearrangements and recombinations, related to substitution rates and nucleotide composition, suggesting the need for additional studies, such as molecular (Hua et al., 2008).

Molecular analysis not only reveals the DNA sequence, but also polymorphisms whose genetic basis and particular modes of genetic transmission can be precisely determined (Avice, 2004). Thus, the molecular data in several studies collected for different taxonomic groups has contributed to considerable advances in understanding the species' biology, ecology, behavior, genetics and evolution (Sunnucks, 2000; Avice, 2004). Given the diverse characteristics of these suborders (Auchenorrhyncha and Heteroptera) and the evolutionary proximity of the groups, the use of molecular markers may be necessary for genetic characterization of these individuals. Such analyses could provide a better understanding of the group.

The objective of this study was to characterize the first assess to different haplotypes for 22 species belonging to spittlebugs and aquatic true bugs (Hemiptera) sampled in Brazil, using the mitochondrial *COI* gene sequences and to use this information to determine the variability within this group of insects.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Taxon sampling**

A total of 22 species were used in this study, including four species belonging to the suborder Auchenorrhyncha (Cicadomorpha, Cercopidae) and 18

species of the aquatic and semiaquatic infraorders (Gerromorpha and Nepomorpha) of the suborder Heteroptera (Table 1).

Auchenorrhyncha species were collected in Campo Grande, MS, Brazil (20° 26' 34" S, 54° 38' 47" W). Heteroptera species were collected in the cities of Américo de Campos (20° 18' S, 49° 44' W), Guaraci (20° 30' S, 48° 56' W), Jales (20° 16' 17" S, 50° 32' 54" W), Mirassol (20° 49' 01" S, 49° 30' 47" W), Sales (21° 20' 28" S, 49° 29' 07" W) and São José do Rio Preto (20° 47' 32" S, 49° 21' 37" W) in São Paulo state, Brazil. Two populations of *Brachymetra albinervis albinervis*, population 1 (\*) and population 2 (\*\*), were collected in São José do Rio Preto and Jales, respectively. All samples were stored at -20° C in absolute ethanol at Laboratory of Cytogenetic and Molecular of Insects (LACIMI), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP- Univ Estadual Paulista, Campus São José do Rio Preto, SP, Brazil.

### **Molecular Data**

The mtDNA was extracted using the protocol described by Tartarotti (2002) and the Genomic DNA Extraction Kit protocol from Machery Nagel Tissue. To obtain the sequence of the *COI* gene, we used two primers (1 and 2, Table 2) to first amplify the gene. The gene was amplified by PCR with the following conditions: denaturation at 94°C for 1 min; 35 cycles of denaturation (94°C for 30 s), annealing (temperature gradient 48 - 55°C for 1 min), extension (72°C for 1 min); and extension at 72°C for 7 min. The reaction consisted of 0.3 µL of nucleotides (ATCG), 11.6 µL ddH<sub>2</sub>O, 0.44 µL MgCl<sub>2</sub>, 1.5 µL PCR buffer, 0.06 µL DNA Platinum Taq polymerase, 0.3 µL primers (10 mM) and 0.5 µL of DNA sampled (100 ng/ µL).

After the amplification reactions the sequencing were performed, a total of 22 sequences were used for the species of the suborders Auchenorrhyncha (infraorder Cicadomorpha) and Heteroptera (infraorders Gerromorpha and Nepomorpha). The primers used for sequencing annealed to the 5' portion of the *COI* gene (primer 1) and the middle of the gene (primer 2) (Table 2). Sequencing using primers 1 and 2 generated fragments of 650 pb and 350 pb, respectively.

This fragment was used to construct the distance matrices, dendograms and analysis of nucleotide composition.

The samples were purified using a purification kit from GE Healthcare. BigDye sequencing was performed by the Center for Human Genome Studies at the University of São Paulo-USP, Brazil, according to a standard protocol (<http://genoma.ib.usp.br>).

The analysis of sequence alignments and determination of nucleotide composition and distance matrix learning were performed using BioEdit (Hall, 1999) and MEGA 5 (Tamura et al., 2011). For the distance matrix analysis and in order to obtain the dendograms using the neighbor-joining method (NJ), nucleotide substitution model with Kimura-2-Parameter (K2P) and the support branches estimated from 1000 bootstrap replicates, using the program MEGA 5.

*Neomaskellia andropogonis* Corbett 1926 (Aleyrodidae), which belongs to the order Hemiptera, suborder Sternorrhyncha, was used as an outgroup. The complete sequence of the *N. andropogonis* mitochondrial genome can be found in the NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). The choice of this species was based on the work of Maddison (1995), who reported that the suborders Auchenorrhyncha and Heteroptera are derived from Sternorrhyncha.

The sequences were submitted to NCBI with the following GenBank accession numbers: JN202451- JN202471; JN681122-JN681148; JN689483- JN689505.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Variability analysis

The greatest genetic diversity for the *COI* sequences among the Cicadomorpha (Auchenorrhyncha) species were found between *Mahanarva fimbriolata* and *Deois flavopicta* (0.181), whereas the least variation occurs between *Notozulia entreriana* and *Mahanarva* sp. (0.055). Overall, the mean variation for the infraorder Cicadomorpha was 0.119.

For the infraorder Gerromorpha (Heteroptera), the longest distance was observed between *H. platensis* and *R. zela* (0.401), while the lowest was observed between *C. palmaris* and *B. a. albinervis*\*\* (0.187). Overall, the mean distance value was 0.265 for Gerromorpha. For the infraorder Nepomorpha (Heteroptera), the average value observed was 0.203, and the greatest variation was observed between *B. a. antigone* and *B. micantulum* (0.337). *M. brasiliensis* and *B. a. antigone* showed the lowest variation (0.154) (Table 3). These results indicate that, based on the *COI* marker, the species of Cicadomorpha (Auchenorrhyncha) have greater genetic similarity than those of the infraorders Gerromorpha and Nepomorpha.

Taking into account intrageneric variation, the genus *Rhagovelia* had an average distance value of 0.291, indicating that this genus has a diverse genetic corresponding a twice higher when compared to species of *Mahanarva* (Cicadomorpha, 0.1), *Buenoa* (Nepomorpha, 0.122) and *Martarega* (Nepomorpha, 0.119) (Table 3).

Specimens of *B. a. albinervis*\* and *B. a. albinervis*\*\* had an intraspecific value of 0.087, whereas for species of the genus *Notozulia* and *Mahanarva* of Cicadomorpha were 0.055, showing the variation that exists within these groups (Appendix 1, 2 e 3).

Overall, despite the variation observed, the distance values are low in the three groups studied. Sosa-Gómez et al. (2005) used the RAPD genetic marker and found that for other Heteroptera neotropical species (*Nezara viridula* Linnaeus 1758, Pentatomidae), this type of genetic similarity was associated with a high gene flow in the populations evaluated.

Park et al. (2011) and Jung et al. (2011) conducted a large study of insects of the suborder Heteroptera and observed different patterns of intraspecific and interspecific divergence using *COI* as a marker gene. In these studies, intraspecific variations were not uncommon within the suborder. The authors conclude that the intraspecific divergence may be due to ancestral polymorphisms or introgression, but does not rule out the possibility of a cryptic species divergence. This observation may explain why the observed genetic distance



values for the species *B. a. albinervis* were above the lower values observed for different species of the family Cercopidae.

Figure 1a-c depict the dendrograms formed from the genetic distance measurements. For Cicadomorpha (Auchenorrhyncha), the species *M. fimbriolata* and *Mahanarva* sp. are sister groups with a bootstrap value of 94%, and the species *N. entreriana* was more external with a 100% bootstrap value. The species *D. flavopicta* was external to the other groups (Figure 1a). In Nepomorpha, the species of the genus *Buenoa* and *Martarega* belonging to the same family (Notonectidae) were grouped together with bootstrap values of 89 and 80%, respectively. In addition, the species *B. micantulum* (Belostomatidae) and *G. f. flavus* (Gelastocoridae) were more external to the family Notonectidae (Figure 1b). Some of the Gerromorpha species belonging to the same family had unresolved clusters. For example, *M. longipes* (Veliidae) and *R. c. crassifemur* (Gerridae) are grouped together as sisters, and the between-group in relation to species of the same genus, with *R. zela* grouped outside the genus *Rhagovelia* and all other species studied. However, the grouping *B. a. albinervis*<sup>\*</sup> and *B. a. albinervis*<sup>\*\*</sup> (Gerridae) showed a bootstrap value of 98% (Figure 1c).

Thus, we find that the clusters generated for Cicadomorpha were satisfactory because they formed congeneric groups (*Mahanarva*). The same result was obtained for the infraorder Nepomorpha genera *Buenoa* and *Martarega* that constitute a group within the family Notonectidae and differ slightly more from the families Belostomatidae (*B. micantulum*) and Gelastocoridae (*G. flavus flavus*). Unlike the results that were previously reported for Cicadomorpha (Auchenorrhyncha) and Nepomorpha (Heteroptera), the close relationships between specimens belonging to the infraorder Gerromorpha were presented as an unresolved mixture of terminal taxa. Two of the taxa belonging to the genus *Rhagovelia* (*R. robusta* + *R. tenuipes*) were closely related, yet *R. zela* was paraphyletic. Damgaard (2008) showed that your studies differs most significantly by rejecting the family Veliidae and the superfamilies “Gerroidea” (comprising Gerridae + Veliidae + Hermatobatidae) and “Hydrometroidea” (comprising Hydrometridae + Macroveliidae + Paraphrynoveliidae) as paraphyletic entities,

compared to earlier studies of global gerromorphan diversity (Andersen, 1982; Andersen and Weir, 2004). In addition, species traditionally grouped in different families resulted as sister-groups. Such is the case of *M. longipes* (Veliidae), which resulted as sister-group of *R. c. crassifemur* (Gerridae). This result corroborates the paraphyletic condition of the family Veliidae presented by Damgaard (2008), in which *Microvelia* and other Microveliinae genera are more closely related to the Gerridae than to other Veliidae. The confidence values generated by the bootstrap in this analysis were ranging from 72% to 98%.

The diversification observed for *R. zela* could be a natural characteristic of this species. Alternatively, this diversity could be due to variation at the collection site (Américo de Campos, SP, Brazil), which was different from other similar groups of *Rhagovelia* (Mirassol, SP, Brazil) and was therefore liable to undergo differential selective pressure. Garcia et al. (2003) noted that the differences observed in *Triatoma infestans* (Reduviidae, Heteroptera) are not necessarily related to gene flow of these populations, but they could be eventually attributed to local selection pressure or genetic drift. However, additional studies are needed, including population analysis of *R. zela* collected in different regions to determine if this kind of diversification is natural or if the population is subject to different selective forces.

For Cicadomorpha (Auchenorrhyncha) and Nepomorpha (Heteroptera), the dendograms and distance matrices suggest that the *COI* gene has been conserved, yet it is efficient for the characterization of the different taxa analyzed. *COI* analysis was unable to resolve the groups for Gerromorpha. However, this diversification may be a natural characteristic of some species analyzed, or it may be related to the environment.

### **Nucleotide composition**

The nucleotide composition, or percentage of AT (AT%), for the studied species of the infraorder Cicadomorpha (Auchenorrhyncha, Group 1) ranging of 60.41-72.10% with an average of 68.15%. The species of Heteroptera of the infraorder Gerromorpha (Group 2) had an AT% ranging of 64.34-70.51%

and an average value of 67.56%. Overall, the species of the infraorder Nepomorpha (Group 3) had an average AT% of 67.77% and the individual species ranging of 63.62-69.71%.

The AT% was high for all three groups, but the highest value was observed in Group 1 (68.15%), and the lowest value was found in Group 2 (67.56%) (Table 4). These results revealed that among the different haplotypes of the *COI* gene, the nucleotide composition was above average, with an increased frequency of adenines and thymines. Similar to these results, Hua et al. (2008) analyzed the mitochondrial genome of Pentatomomorpha (Heteroptera) and noted that the nucleotide composition was between 68.86 to 77.8%. This study also found that gene rearrangements were not correlated with rates of nucleotide substitution and that different evolutionary patterns between genes were due to variation in GC content.

The total number of sites analyzed for Groups 1, 2 and 3 were 1010, 1015 and 1013, respectively. Of these, Group 2 showed the highest number of polymorphic sites (264), followed by Group 3 with 191 sites. The total number of these polymorphic sites that caused an amino acids change was relatively small. For Group 1 only DNA polymorphism resulted in an amino acid change. This result was different from what was observed for Gerromorpha and Nepomorpha infraorders, which had 88 and 27 polymorphic amino acids, respectively (Table 4).

Analysis of the ratio between the number of transitions (Ti) and transversions (Tv) showed that Ti occur more often, which was indicated by a shorter genetic distance. In regards to this, the shortest distance was observed for Group 3 (0.818), and the largest distance was found for Group 1 (1.271) (Table 4).

When considering the potential information for each codon position, we observed that for all of the groups, the third base in a codon was the most variable, and the first base was the most conserved. The third base position for the infraorder Nepomorpha was the most variable (229 polymorphisms) and it was the least variable (126) in Auchenorrhyncha. The infraorder Gerromorpha presented the third base with more nucleotide information (142) (Table 5). This is

a characteristic that has been described by Hebert et al. (2003), who found that for the *COI* gene, there is great variation in the base in the third position of its codons, although changes in the *COI* amino acid sequence occur more slowly than for other mitochondrial genes. The *COI* gene, when compared with other genes, has a slower rate of protein evolution.

These analyzes provide important information in studies such as strand asymmetry, which help in understanding the variations of selection on amino acids sequences and mutation during replication and transcription of mitochondrial DNA for evolution studies (Wei et al., 2010).

Studies analyzing the diversity of Hemiptera are rare but are extremely important for understanding the genetic characteristics of this group, including the nucleotide composition and the variation of genes within and between species and related groups. In this study, we observed that the mitochondrial *COI* gene region (1 Kb) appears to be a good marker. These findings are consistent with what had been described for other species of Hemiptera.

Additional studies and analyses with different markers should be conducted to confirm the observations of this study, meanwhile these results contributing for the entomologic community in studies taxonomic, systematic and genetic variability of the population.

### **Acknowledgments**

The identification of aquatic insects was performed by the research group of Prof. Dr. Jorge Luiz Nessimian (Contributor, UFRJ, RJ). FAPESP and FUNDUNESP provided financial support.

### **References**

Andersen NM (1982). The semiaquatic bugs (Hemiptera, Gerromorpha). Phylogeny, adaptations, biogeography, and classification. Entomonograph 3, Klampenborg, Denmark, 455 p.

Andersen NM and Weir TA (2004). Mesoveliidae, Hebridae, and Hydrometridae of Australia (Hemiptera: Heteroptera: Gerromorpha), with a reanalysis of the phylogeny of semiaquatic bugs. *Invertebrate Systematics*. 18: 467-522.

Avise JC (2004). Molecular markers, natural history and evolution. 2nd edn. Sinauer Massachusetts: Associates, Inc. Publishers, 684p.

Carver M, Gross GF, Woodward TE (1991). Hemiptera, IN: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (CSIRO), *The Insects of Australia, a Textbook for Students and Research Workers*. Melbourne University Press & Cornell University Press, 744p.

Castanhole MMU, Pereira LLV, Souza HV, Valerio JR, Barbosa LR, Itoyama MM (2010). Meiotic chromosomes and nucleolar behavior in testicular cells of the grassland spittlebugs *Deois flavopicta*, *Mahanarva fimbriolata* and *Notozulia entreriana* (Hemiptera, Auchenorrhyncha). *Genetics and Molecular Biology*. 33 (2): 244-252.

Costes DH and Webb MD (2004). Four new species of Neotropical spittlebugs (Hemiptera, Cercopidae, Tomaspidinae). *Revista Brasileira de Entomologia*. 48: 391-393.

Damgaard J (2008). Phylogeny of the semiaquatic bugs (Hemiptera-Heteroptera, Gerromorpha). *Insect Systematics & Evolution*. 39: 431-460. Copenhagen, November. ISSN1399-560X.

Damgaard J and Sperling FAH (2001). Phylogeny of the water strider genus *Gerris* Fabricius (Heteroptera: Gerridae) based on *COI* mtDNA, *EF-1 $\alpha$*  nuclear DNA and morphology. *Systematic Entomology*. 26: 241-254.

Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R; Vrijenhoek R (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology & Biotechnology*. 3: 294-299.

Forero D (2008). The systematics of the Hemiptera. *Revista Colombiana de Entomología*. 34: 1-21.

García BA, Manfredi C, Fichera L, Segura EL (2003). Short report: Variation in mitochondrial 12s and 16s ribosomal Dna sequences in natural populations of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 68 (6): 692-694.

Hall TA (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41: 95-98.

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, De Waard JR (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings the Royal Society B (London) Biological Sciences*. 270: 313-321.

Hua J, Li M, Dong P, Cui Y; Xie Q, Bu W (2008). Comparative and phylogenomic studies on the mitochondrial genomes of Pentatomomorpha (Insecta: Hemiptera: Heteroptera). *BMC Genomics*. 9: 610.

Jung S, Duwal RK, Lee S (2011). COI barcoding of true bugs (Insecta, Heteroptera). *Molecular Ecology Resources*. 11: 266–270.

Liang AP, Webb MD (2002). New taxa and revisionary notes in Rhinaulacini spittlebugs from southern Asia (Homoptera: Cercopidae). *Journal of Natural History*. 36: 729–756.

Maddison DR (1995). *Hemiptera. True bugs, cicadas, leafhoppers, aphids, etc.* Version 01 January 1995 (temporary). <http://tolweb.org/Hemiptera/8239/1995.01.01> in The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>.

Milanez JM, Milde LCE, Parra JRP (1983). Estimativa da constante térmica das cigarrinhas das pastagens *Zulia* (Notozulia) entreriana (Berg, 1879) e *Deois* (Acanthodeois) flavopicta (Stal, 1854) (Homoptera: Cercopidae) em condições de campo. *An. Soc. Entomol. Brasil*. 12:151-163.

Park DS, Foottit R, Maw E, Hebert PDN (2011). Barcoding Bugs: DNA-Based Identification of the True Bugs (Insecta: Hemiptera: Heteroptera). *Plos One*. 6 (4): e18749, DOI: 10.1371/journal.pone.0018749.

Schuh RT and Slater JA (1995). *True Bugs of the World (Hemiptera; Heteroptera: Classification and Natural History)*. Ithaca, London: Cornell University Press.

Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P (1994). Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*. 87: 651-701.

Sosa-Gómez DR, Silva JJ, Costa F, Binneck E, Marin SRR, Nepomuceno AL (2005). Population structure of the Brazilian southern green stink bug, *Nezara viridula*. *Journal of Insect Science*. 5: 23.

Sunnucks P (2000). Efficient genetic markers for population biology. *Tree*. 15: 199-203.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood,

Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28 (10), 2731-2739.

Tartarotti E (2002). Variabilidade genética e filogenia em triatomíneos (Triatominae, Heteroptera). Doctoral thesis, Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, 96f.

Wei SJ, Shi M, Chen XX, Sharkey MJ, Achterbeg CV, Ye GY, He JH (2010). New views on strand asymmetry in insect mitochondrial genomes. *Plos One*. 5 (9): e12708. doi: 10.1371/journal.pone.0012708.

Zanol KMR (1996). Descrição de cinco espécies novas de Bahita Oman (Homoptera, Cicadellidae, Deltocephalinae) *Rev. Bras. Zool.* 13: 727-735.

Table 1. Species used in this study, broken down by family, suborder and infraorder.

Suborder	Infraorder	Family	Species	
Auchenorrhyncha	Cicadomorpha	Cercopidae	<i>Deois flavopicta</i> (Stål, 1854)	
			<i>Mahanarva fimbriolata</i> (Stål, 1854)	
			<i>Mahanarva</i> sp.	
			<i>Notozulia entreriana</i> (Berg, 1879)	
Heteroptera	Gerromorpha	Gerridae	<i>Brachymetra albinervis albinervis</i> * (Amyot & Serville, 1843)	
			<i>Brachymetra albinervis albinervis</i> ** (Amyot & Serville, 1843)	
			<i>Cylindrostethus palmaris</i> (Drake & Harris, 1934)	
			<i>Halobatopsis platensis</i> (Berg, 1879)	
			<i>Limnogonus aduncus</i> (Drake & Harris, 1933)	
			<i>Rheumatobates crassifemur crassifemur</i> (Esaki, 1926)	
			Veliidae	<i>Microvelia longipes</i> (Uhler, 1894)
				<i>Rhagovelia robusta</i> (Gould, 1931)
				<i>Rhagovelia tenuipes</i> (Champion, 1898)
				<i>Rhagovelia zela</i> (Drake, 1959)
	Nepomorpha	Belostomatidae	<i>Belostoma micantulum</i> (Stal, 1858)	
			Gelastocoridae	<i>Gelastocoris flavus flavus</i> (Guérin-Méneville, 1835)
		Notonectidae		<i>Buenoa amnigenus</i> (White, 1879)
			<i>Buenoa antigone antigone</i> (Kirkaldy, 1899)	
		<i>Buenoa unguis</i> (Truxal, 1953)		
		<i>Martarega brasiliensis</i> (Truxal, 1949)		
		<i>Martarega membranacea</i> (White, 1879)		
		<i>Martarega uruguayensis</i> (Berg, 1883)		

Note: \* Population 1- collected in São José do Rio Preto city; \*\* Population 2- collected in Jales city.

Table 2. Primers used for the amplification and sequencing of the *COI* gene.

Primers	Foward	Reverse	Amplicon Length	Reference
1	TTTCAACAAATCATAAAGATATTGG	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	700 pb	Folmer et al. (1994)
2	CAACATTTATTTGATTTTTGG	GAATACTGCTCCTATGGATA	500 pb	Simon et al. (1994); Damgaard; Sperling (2001)



Table 3. Highest and lowest values of interspecific and intraspecific distance and mean values for the three groups analyzed using the K2P model of nucleotide substitution.

Group	Distance			
	Intergeneric			Intragenetic
	Highest	Lowest	Mean	Mean
Cicadomorpha	0.181 ( <i>M. fimbriolata</i> / <i>D. flavopicta</i> )	0.055 ( <i>N. entreriana</i> / <i>M. sp.</i> )	0.119	0.100 - <i>Mahanarva</i>
Gerromorpha	0.401 ( <i>R. zela</i> / <i>H. platensis</i> )	0.187 ( <i>C. palmaris</i> / <i>B. a. albinervis</i> **)	0.265	0.291 - <i>Rhagovelia</i>
Nepomorpha	0.337 ( <i>B. micantulum</i> / <i>B. a. antigone</i> )	0.154 ( <i>M. brasiliensis</i> / <i>B. a. antigone</i> )	0.203	0.122 - <i>Buenoa</i> 0.119 - <i>Martarega</i>

Table 4. Total amino acid and DNA sites analyzed, total amino acids and polymorphic sites, the ratio of transition and transversions (Ti/Tv) and the average frequency of A + T of the three groups: Cicadomorpha of the suborder Auchenorrhyncha (1) and the infraorders Gerromorpha (2) and Nepomorpha (3) of the suborder Heteroptera.

Groups	Sites		Aminoacids		Ti/Tv	%AT
	Total	Polymorphics	Total	Polymorphics		
1	1010	42	336	1	1.271	68.15
2	1015	264	338	88	0.983	67.56
3	1013	191	337	27	0.818	67.77

Table 5. Number of variable and informative sites based in the three codon positions.

Suborder	Infraorder	Sites					
		Variables			Informatives		
		1st	2nd	3rd	1st	2nd	3rd
Auchenorrhyncha	Cicadomorpha	36.00	6.00	126.00	6.00	1.00	35.00
Heteroptera	Gerromorpha	139.02	62.60	198.00	85.00	36.60	142.00
	Nepomorpha	80.75	22.00	229.00	48.00	9.00	134.00

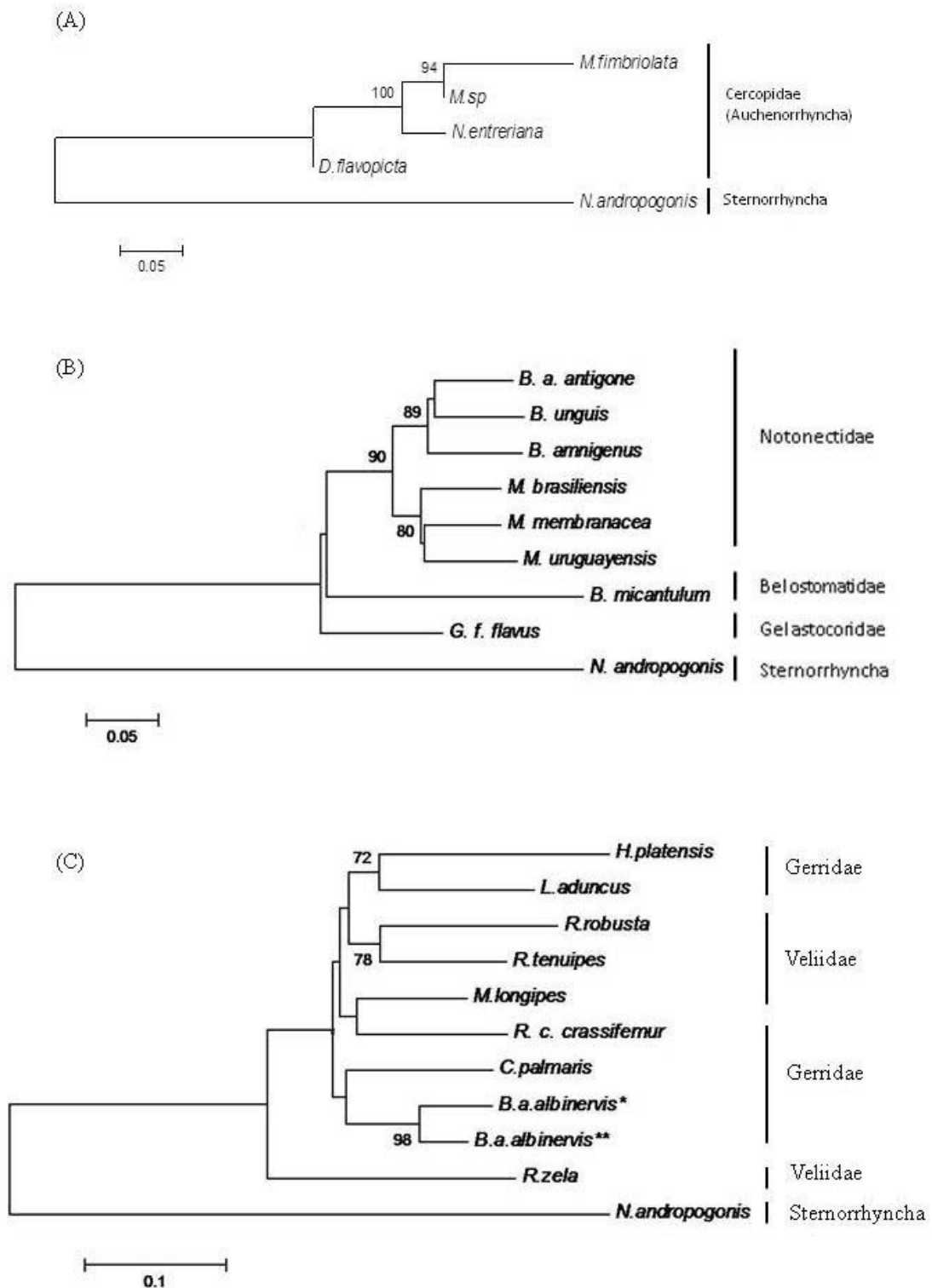


Figure 1. Dendrograms based on the NJ method and the K2P model for the taxa of A) Cicadomorpha (Auchenorrhyncha); B) Nepomorpha; C) Gerromorpha (Heteroptera). The numbers at the nodes of the branches refer to the bootstrap values.

### APPENDIX 1

Distance matrices utilizing K2P for the infraorder Cicadomorpha (Auchenorrhyncha). In bold the highest and lowest values.

Espécies	1	2	3	4
1 <i>Neomaskellia andropogonis</i>				
2 <i>Deois flavopicta</i>	0.629			
3 <i>Mahanarva fimbriolata</i>	0.897	<b>0.181</b>		
4 <i>Mahanarva</i> sp.	0.768	0.105	0.100	
5 <i>Notozulia entreriana</i>	0.756	0.098	0.179	<b>0.055</b>

### APPENDIX 2

Distance matrices utilizing K2P for the infraorder Gerromorpha (Heteroptera). In bold the highest and lowest values.

Espécies	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 <i>Neomaskellia andropogonis</i>										
2 <i>Brachymetra albinervis albinervis*</i>	0.801									
3 <i>Brachymetra albinervis albinervis**</i>	0.726	0.087								
4 <i>Cylindrostethus palmaris</i>	0.778	0.214	<b>0.187</b>							
5 <i>Halobatopsis platensis</i>	0.918	0.306	0.299	0.303						
6 <i>Limnogonus aduncus</i>	0.804	0.260	0.262	0.245	0.279					
7 <i>Microvelia longipes</i>	0.757	0.210	0.196	0.206	0.273	0.211				
8 <i>Rheumatobates crassifemur</i>	0.772	0.217	0.204	0.264	0.296	0.280	0.189			
9 <i>Rhagovelia robusta</i>	0.848	0.293	0.245	0.259	0.334	0.264	0.247	0.258		
10 <i>Rhagovelia tenuipes</i>	0.802	0.224	0.224	0.228	0.297	0.244	0.208	0.243	0.216	
11 <i>Rhagovelia zela</i>	0.777	0.353	0.342	0.336	<b>0.401</b>	0.377	0.317	0.349	0.357	0.302

### APPENDIX 3

Distance matrices utilizing K2P for the infraorder Nepomorpha (Heteroptera). In bold the highest and lowest values.

Espécies	1	2	3	4	5	6	7	8
1 <i>Neomaskellia andropogonis</i>								
2 <i>Buenoa amnigenus</i>	0.814							
3 <i>Buenoa antigone antigone</i>	0.730	0.122						
4 <i>Belostoma micantulum</i>	0.813	0.294	<b>0.337</b>					
5 <i>Buenoa unguis</i>	0.786	0.131	0.115	0.286				
6 <i>Gelastocoris flavus</i>	0.707	0.242	0.214	0.271	0.218			
7 <i>Martarega brasiliensis</i>	0.720	0.176	<b>0.154</b>	0.310	0.178	0.200		
8 <i>Martarega membranacea</i>	0.736	0.157	0.171	0.307	0.174	0.216	0.111	
9 <i>Martarega uruguayensis</i>	0.774	0.166	0.160	0.323	0.177	0.225	0.127	0.120

## **ARTIGO II**

---

**Artigo 2 - Inferências filogenéticas de insetos aquáticos pertencentes às infraordens Gerromorpha e Nepomorpha e terrestres de Cicadomorpha, utilizando genes mitocondrial e nuclear**

**Filogenias em Gerromorpha, Nepomorpha e Cicadomorpha**

Márcia Maria Urbanin Castanhole<sup>1</sup>, Sandra Regina de Carvalho Marchesin<sup>2</sup> e Mary Massumi Itoyama<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>UNESP/IBILCE- Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

<sup>2</sup>UNIP- Universidade Paulista, São José do Rio Preto, SP.

Palavras-chave: *COI*; *16S* rDNA; *28S* rDNA; Auchenorrhyncha; Heteroptera

Resumo: Os insetos vêm sendo estudados por vários pesquisadores na tentativa de se compreender as relações de proximidade entre as espécies e, para isso, utiliza-se, também, dados moleculares, como os gerados por genes mitocondriais e nucleares. Para ampliar essas informações, espécies pertencentes a dois grandes grupos de insetos (Auchenorrhyncha e Heteroptera) foram avaliadas para três regiões gênicas, sendo duas mitocondriais (*COI* e *16S* rDNA) e uma nuclear (*28S* rDNA), com o intuito de estabelecer as relações filogenéticas entre os táxons estudados. As análises filogenéticas foram realizadas a partir das regiões gênicas separadamente ou concatenadas através dos métodos de Parcimônia e Máxima Verossimilhança com o melhor modelo de substituição nucleotídica para cada grupo de dados nessa análise. Nas análises individuais algumas inconsistências foram observadas para as infraordens Gerromorpha e Nepomorpha, principalmente com os dados originados da região gênica *COI*. Quando analisados os dados concatenados (*COI* + *16S* rDNA + *28S* rDNA), foi possível verificar que grande parte das inconsistências observadas nas análises, separadamente, foram

resolvidas nas filogenias de Parcimônia e Máxima Verossimilhança, isto é, as espécies pertencentes aos dois grandes grupos, Auchenorrhyncha e Heteroptera foram separadas, assim como as infraordens Gerromorpha e Nepomorpha (Heteroptera), e as famílias Gerridae, Veliidae e Notonectidae permaneceram agrupadas, exceto pelas espécies *Rheumatobates crassifemur crassifemur* (Gerridae) e *Microvelia longipes* (Veliidae) que apresentaram maior similaridade com espécies das famílias Veliidae e Gerridae, respectivamente. Dessa maneira foi possível verificar que quanto maior o número de genes, mais robusta é a análise, portanto, a ampliação do número de genes e de táxons para estudos posteriores aumentará a confiabilidade das relações propostas.

## INTRODUÇÃO

A ordem Hemiptera está atualmente subdividida nas subordens Auchenorrhyncha, Coleorrhyncha, Heteroptera e Sternorrhyncha e contém, aproximadamente, 82.000 espécies (BOURGOIN; CAMPBELL, 2002; FORERO, 2008; CRYAN; URBAN, 2012). A monofilia desse grupo tem sido reconhecida a partir de morfologia de estruturas bucais específicas da mandíbula e maxila (KRISTENSEN, 1981, 1991; YOSHIZAWA; SAIGUSA, 2001; FORERO, 2008). Das subordens, Sternorrhyncha apresenta-se monofilética e como grupo irmão de Auchenorrhyncha e Heteroptera (SCHLEE, 1969; VON DOHLEN; MORAN, 1995; CAMPBELL, 1995; FORERO, 2008).

A subordem Auchenorrhyncha apresenta mais de 25.000 espécies distribuídas nas infraordens Cicadomorpha e Fulgoromorpha (GRIMALDI; ENGEL, 2005; CRYAN; URBAN, 2012). A superfamília Cercopoidea (Cicadomorpha) apresenta 3.000 espécies descritas e, aproximadamente, 340 gêneros distribuídos entre as cinco famílias (Cercopidae, Aphrophoridae, Clastopteridae, Machaerotidae e Epipygidae). Nos Cercopidae encontramos as cigarrinhas que causam danos econômicos às plantações, no mundo inteiro (HEINRICHS; BARRION, 2004), podendo destacar as cigarrinhas dos gêneros *Mahanarva*, *Zulia*, *Deois*, *Notozulia* e *Prosapia*, que são consideradas sérias

pragas para as culturas das Américas Central e do Sul, causando uma redução de até 70% na produtividade agrícola (CRYAN; SVENSON, 2010; LEITE et al., 2005; SANZ, 1997; THOMPSON, 2004; THOMPSON; LEON GONZALEZ, 2005). A monofilia desta subordem é constantemente questionada gerando intensos debates. Autores como Goodchild (1996) e Hamilton (1981) reforçam a parafilia observada para essa subordem, baseados em características morfológicas e histológicas, colocando, por exemplo, Fulgoromorpha como grupo-irmão de Cicadomorpha + Aphidiformes. Entretanto, baseados em aspectos morfológicos das antenas (GRIMALDI; ENGEL, 2005) e de características moleculares (URBAN; CRYAN, 2007; CRYAN; URBAN, 2012), sugerem que Auchenorrhyncha seja de fato monofilético, colocando Auchenorrhyncha como grupo-irmão de Heteroptera. Segundo Letsch et al. (2012) essas relações ainda são questionadas e devem ser melhor esclarecidas.

A subordem Heteroptera representa o mais diversificado grupo de insetos apresentando mais de 40.000 espécies sendo, normalmente, assumida como um grupo monofilético (WEIRAUCH; SCHUH, 2011). Eles são classificados em sete infraordens (Enicocephalomorpha, Dipsocoromorpha, Gerromorpha, Nepomorpha, Leptopodomorpha, Cimicomorpha e Pentatomomorpha) (LI et al., 2012). As infraordens Gerromorpha e Nepomorpha compreendem, aproximadamente, 92% da diversidade dos insetos aquáticos, sendo que algumas espécies apresentam importância econômica por serem predadores intermediários da cadeia alimentar, alimentando-se de larvas de mosquitos e servindo de alimento para peixes (JENKINS, 1964; MENKE, 1979). O posicionamento dessas infraordens vem sendo amplamente discutido, buscando informações do relacionamento filogenético desses grupos, em que ora Gerromorpha encontra-se mais externamente a Nepomorpha, ora encontra-se mais internamente (WEIRAUCH; SCHUH, 2011; LI et al., 2012).

Dessa maneira, no presente trabalho foram utilizadas três regiões gênicas (*COI*, *16S* rDNA e *28S* rDNA), objetivando estabelecer as relações filogenéticas entre as espécies neotropicais estudadas pertencentes a esses táxons.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras

Para a obtenção das amostras de DNA foram utilizadas espécies de Auchenorrhyncha coletadas em Campo Grande, MS (20° 26' S, 54° 38' O), e de Heteroptera coletadas em Américo de Campos (20°18' S, 49°44' O), Guaraci (20°30' S, 48°56' O), Jales (20° 16' S, 50° 32' O), Mirassol (20° 49' S, 49° 30' O), Sales (21° 20' S, 49° 29' O) e São José do Rio Preto (20° 47' S, 49° 21' W), situadas no Estado de São Paulo, Brasil. Como grupo externo, foi coletada na região de Riolândia (19° 58' S, 49° 40' O), a espécie *Aphis gossypii*, pertencente à subordem Sternorrhyncha que é um grupo considerado basal aos Heteroptera e Auchenorrhyncha (CRYAN; URBAN, 2012).

As amostras foram armazenadas e conservadas a -20°C em etanol absoluto e depositadas no Laboratório de Citogenética e Molecular de Insetos (LACIMI), IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto, SP, totalizando 21 espécies, sendo quatro pertencentes à subordem Auchenorrhyncha (família Cercopidae) e 17 aos Heteroptera aquáticas (infraordens Gerromorpha e Nepomorpha) conforme apresentadas na Tabela 1.

### Obtenção das sequências (Extração, Amplificação e Sequenciamento)

O DNA genômico foi extraído conforme protocolo descrito por Tartarotti (2002) e utilizado nas amplificações de três regiões gênicas sendo, aproximadamente, de 1200 pb para o gene *COI*, de 400 pb para o *16S* (mitocondriais) e de 550 pb para o *28S* (nuclear). Os oligonucleotídeos iniciadores estão listados na Tabela 2.

Para garantir a acurácia dos sequenciamentos, estes foram realizados para as fitas *Foward* e *Reverse* e para todas as espécies foram realizadas réplicas, sendo no mínimo dois espécimes para cada espécie, que, posteriormente, foram utilizados para a obtenção das sequências consenso, utilizando o programa *MEGA* versão 5 (TAMURA et al., 2011).



As reações foram realizadas num volume final de 15  $\mu$ L, contendo 0,3  $\mu$ L de dNTPs (ATCG), 11,6  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O, 0,44  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub>, 1,5  $\mu$ L do tampão PCR, 0,06  $\mu$ L Taq DNA Platinum, 0,3  $\mu$ L primer (10 M) (Tabela 2) e 0,5  $\mu$ L da amostra de DNA (100ng/ $\mu$ L). As amplificações seguiram as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 1 min, 35 ciclos de desnaturação (30s, 94°C), anelamento com gradiente de temperatura de 45 a 55°C por 1 min, extensão 72°C, 1 min e extensão final a 72°C por 7 min.

As amostras foram purificadas com kit da GE Healthcare e as reações de sequenciamento foram realizadas pelo Centro de Estudos do Genoma Humano, na Universidade de São Paulo-USP, Brasil, com protocolo próprio (<http://genoma.ib.usp.br>).

### **Análises Filogenéticas**

Para a obtenção de informações preliminares a respeito do padrão de variação nas diferentes regiões gênicas estudadas, tais como, composição nucleotídica, sítios variáveis e parcimoniosos, utilizou-se o programa *MEGA 5*.

Após o alinhamento das sequências estas foram submetidas à análise de Parcimônia (P) pelo software TNT v.1.1, com 500 repetições, método *TBR max* e não ordenação dos dados (GOLOBOFF et al., 2003) e com *bootstrap* de 1000 réplicas e árvore consenso estrito. As análises de Máxima Verossimilhança (MV) foram obtidas através do programa *garli 2.0*, com *bootstrap* de 100 réplicas.

Para a obtenção do melhor modelo de substituição nucleotídica para cada conjunto de dados foi utilizado o programa JModeltest (*AIC information*), sendo que para os genes *COI1*, *COI2*, *16S* e *28S* os melhores modelos sugeridos foram GTR+I+G, TIM3+G, GTR+I+G e GTR+G, respectivamente. Para o conjunto de dados com todos os genes e sequências combinadas, o melhor modelo foi o GTR+G (Tabela 3).

## **RESULTADOS**

### **Qualidade dos dados**

Foram obtidos um total de 1952 pares de bases, sendo para as regiões gênicas mitocondrial *COI1*, aproximadamente, 613 pb e *COI2* 393 pb, *16S* 387 pb e para a região gênica nuclear *28S* foram amplificados 559 pb (Tabela 3).

As regiões gênicas foram avaliadas preliminarmente, quanto a sua qualidade e presença de sinal filogenético, sendo que a região *COI1* apresentou os menores índices de consistência e retenção, 0,40 e 0,43, respectivamente, e a região *28S* apresentou os maiores valores 0,74 e 0,69. Foi observado, também, que a região *COI1* apresentou o maior número de sítios informativos (254) e a região gênica *28S* com o menor (138) (Tabela 3).

Após a concatenação das regiões gênicas *COI+16S+28S*, foi observado 736 sítios informativos. Contudo, o índice de consistência apresentou-se baixo e a topologia de consenso estrito na análise de Parcimônia apresentou 3145 passos (Tabela 3).

### **Análises Filogenéticas**

A partir das análises de Parcimônia (Figuras 1 e 3) e Máxima Verossimilhança (Figuras 2 e 4), foram obtidas filogenias para os genes *COI* (1 e 2), *16S* e *28S* separados e concatenados.

Foi possível observar na maioria das topologias obtidas, que as espécies pertencentes às duas subordens (Auchenorrhyncha e Heteroptera) estudadas apresentaram-se claramente separadas em grupos distintos (Figuras 1a,c,d e 2a,c,d), sendo que as espécies de Auchenorrhyncha aparecem basais às espécies de Heteroptera, exceto na análise de Parcimônia (P) (Figura 1b), quando considerados os dados obtidos para a região *COI2*, onde as espécies pertencentes à Auchenorrhyncha apresentaram-se entre espécies da infraordem Nepomorpha (Heteroptera), ficando como grupo irmão destes.

Considerando ainda os táxons pertencentes à subordem Auchenorrhyncha foi possível observar que o gênero *Mahanarva* apresentou-se agrupado em sete das dez topologias geradas (Figuras 1b-d, 2b,c, 3 e 4), apenas nas análises de MV para a região gênica *28S* ocorreu parafilia para esse gênero

(Figura 2d) e para a região gênica *16S* ocorreu o agrupamento dos gêneros *Deois* e *Notozulia* (Figuras 1c e 2c).

Na maioria das topologias obtidas para a subordem Heteroptera, os táxons pertencentes às infraordens Gerromorpha e Nepomorpha permaneceram agrupados. Nos agrupamentos formados, uma inconsistência foi observada entre as famílias Gerridae e Veliidae (Gerromorpha), envolvendo as espécies *Rheumatobates crassifemur crassifemur* (Gerridae), que se apresentou mais relacionado às espécies de Veliidae (Figuras 1c, 2d, 3 e 4) e a espécie *Microvelia longipes* (Veliidae) mais relacionado com espécies de Gerridae (Figuras 1c, 2b, 3 e 4). Em três topologias ocorreu o agrupamento destas duas espécies no mesmo ramo *R. c. crassifemur* e *M. longipes* (Figuras 1b e 2a,c).

Diferentemente do observado na maioria dos agrupamentos gerados para o gênero *Rhagovelia*, a espécie *R. zela* (Veliidae) encontrou-se externamente às duas subordens na análise de P, quando considerado os dados obtidos para a região gênica *COI1* e entre as espécies pertencentes à família Notonectidae na análise de MV para esta mesma região gênica (Figuras 1a e 2a).

A espécie *Halobatopsis platensis* (Gerridae) agrupou-se com espécies da mesma família em quatro de oito topologias (Figuras 1a,b, 2b e 3), sendo que nas outras agrupou-se ora com a família Veliidae (Figura 2c) e ora externamente às duas famílias, Gerridae e Veliidae (Figuras 1c, 2a e 4). Para *H. platensis* foram analisadas apenas oito topologias, pois não foi possível realizar o sequenciamento dessa espécie para a região gênica *28S* (Figuras 1d e 2d).

Ao analisarmos os grupos formados pelas espécies pertencentes à infraordem Nepomorpha, o gênero *Martarega* apresentou-se agrupado em sete das dez topologias apresentadas (Figuras 1a,c, 2a,b,d, 3 e 4), sendo observadas inconsistências nos agrupamentos de *M. brasiliensis* e *M. uruguayensis*, que ora apresentam-se agrupados dentro do gênero e ora externamente a ele, conforme apresentado nas Figuras 1d e 2c. Tais inconsistências foram solucionadas nas topologias formadas a partir dos dados concatenados (Figuras 3 e 4), com alto índice de bootstrap (100%).

Quando analisado o gênero *Buenoa* foi verificado que ele agrupou-se em seis das dez topologias (Figuras 1a,c,d, 2a, 3 e 4). As inconsistências observadas foram com relação às espécies *Buenoa antigone antigone* e *B. amnigenus* que ora apresentavam-se agrupados congenericamente e ora externamente (Figuras 1b, 2b,c,d). Os agrupamentos dos dois gêneros, *Buenoa* e *Martarega*, caracterizaram, também, o agrupamento da família Notonectidae (Figuras 1a,c, 2b,d, 3 e 4).

Considerando, ainda, a infraordem Nepomorpha, as espécies *Belostoma micantulum* (Belostomatidae) e *Gelastocoris flavus flavus* (Gelastocoridae) apresentaram-se relacionadas nas topologias formadas pelos dados concatenados (Figuras 3 e 4), entretanto, quando consideradas as análises dos genes separadamente, estes apresentaram-se relacionados apenas em três topologias formadas (Figuras 1a e 2a,d).

## DISCUSSÃO

A grande complexidade e diversidade dos táxons pertencentes aos Auchenorrhyncha e Heteroptera (Hemiptera) estimulam a realização de estudos que estabeleçam as relações entre esses táxons em diferentes níveis. Para isso, a utilização de regiões gênicas mitocondriais e nucleares são de grande importância, na tentativa de esclarecer a proximidade entre espécies que compõem estas duas subordens (LI et al., 2012; CRYAN; URBAN, 2012).

De acordo com os dados gerados, no presente trabalho, para as regiões gênicas *COI*, *16S* rDNA e *28S* rDNA, a que apresentou o menor número de sítios informativos foi a *28S* e quando aplicada a análise de Parcimônia para este conjunto de dados, essa região apresentou o menor número de passos. Todos os índices de retenção para a Parcimônia foram superiores a 0,42, portanto estariam de acordo com Archie (1990), em que os índices de retenção devem ser maiores do que zero e sugere-se que não sejam inferiores a 0,38.

Por meio das análises de Parcimônia e Máxima Verossimilhança para os diferentes conjuntos de dados, foi possível observar, de forma geral, uma

distribuição consistente dos táxons pertencentes às duas subordens avaliadas, que apresentaram-se claramente distribuídas em dois grupos, principalmente para os genes concatenados (*COI+16S rDNA+28S rDNA*).

Quando considerado os táxons pertencentes à subordem Auchenorrhyncha foi verificado que os agrupamentos apresentaram-se consistentes, formando arranjos semelhantes em quase todas as topologias. Tais agrupamentos foram reforçados nas análises dos genes concatenados. No presente trabalho, foi constatado, também, que as espécies pertencentes à Auchenorrhyncha (Cercopidae) permaneceram relacionadas às espécies de Heteroptera. Esta formação já havia sido relatada em outros estudos (CRYAN; URBAN, 2012), verificando a monofilia dos táxons.

Cryan e Urban (2012) confirmam a monofilia do grupo Auchenorrhyncha que vinha sendo bastante discutida, a partir da reunião de dados morfológicos e moleculares de Hemiptera, em que observou-se Sternorrhyncha apresentando-se como basal às duas subordens (Auchenorrhyncha + Heteropteroidea).

De forma geral, os Heteroptera são reconhecidos como um grupo monofilético pela maioria dos sistematas (LI et al., 2012; WEIRAUCH; SCHUH, 2011). Nos estudos de Li et al. (2012) foi verificado que a infraordem Nepomorpha apresentou-se basal em todas as topologias, entretanto, não foi possível estabelecer o posicionamento da infraordem Gerromorpha dentre as outras infraordens. No presente estudo foi possível verificar que todas as famílias de Nepomorpha apresentaram-se como grupo-irmão de Gerromorpha, exceto Belostomatidae e Gelastocoridae, em que ora apresentam-se como grupo-irmão, ora mais externamente relacionadas e ora basais, não correspondendo ao observado por Li et al. (2012), talvez devido ao número de táxons analisados.

Após as análises filogenéticas, foi possível observar algumas inconsistências para os táxons da subordem Heteroptera, infraordem Gerromorpha, tais como *Rheumatobates crassifemur crassifemur* (Gerridae), que agrupou-se com as espécies de Veliidae em quase todas as análises de P e MV, semelhantemente ao táxon *Microvelia longipes* (Veliidae) agrupou-se a

integrantes da família Gerridae, com variação nos táxons terminais. Essa variação para as famílias Gerridae e Veliidae pode estar relacionada com a condição de parafilia para a família Veliidae descrita por Damgaard (2008), na qual *Microvelia* e o outro gênero de Microveliinae estão mais proximamente relacionados com a família Gerridae do que com a própria família Veliidae.

Essa grande proximidade entre as famílias Veliidae e Gerridae já foi discutida, anteriormente, por Damgaard et al. (2005), onde apresentaram-se como grupo-irmãos, suportados por várias sinapomorfias morfológicas. Apesar do apontado existem argumentos a favor da monofilia do grande grupo Veliidae, incluindo aspectos morfológicos, como por exemplo, a presença de um pente especializado na tíbia do macho (ANDERSEN, 1982). A família Gerridae é rica em espécies, mas estruturalmente mais homogênea e, também, confirmam a monofilia, entretanto com vários caracteres autopomórficos, justificando a indefinição de algumas espécies nos agrupamentos por conta dessa grande proximidade.

A espécie *Halobatopsis platensis* (Gerridae) apresentou algumas inconsistências com relação aos agrupamentos formados, pois agrupou-se em 50% das topologias com espécies da sua família (Gerridae) e os outros 50% externamente a Veliidae e Gerridae ou somente com Veliidae. A espécie *Rhagovelia zela*, apresentou inconsistência em uma única topologia (COI), ficando externamente aos Heteroptera e Auchenorrhyncha, sendo que em todas as outras ela permaneceu agrupada com as espécies do mesmo gênero (*R. tenuipes* e *R. robusta*).

Com relação à infraordem Nepomorpha, para as espécies de Belostomatidae e Gelastocoridae (*Belostoma micantulum* e *Gelastocoris flavus flavus*) foi possível observar que estas encontram-se ora agrupadas no mesmo ramo e, ora uma mais externamente que a outra. Contudo, foi possível observar no presente trabalho, que as duas espécies foram caracterizadas como representantes de famílias distintas e, que *Belostoma* encontra-se basal a *Gelastocoris* em algumas topologias, mesmo apresentando um único representante para cada família. Entretanto, Li et al. (2012) observaram, a partir de análises moleculares

com múltiplos genes (*COI*, *16S* rDNA, *18S* rDNA e *28S* rDNA), que *Belostoma* é derivado a *Gelastocoris*, mas devemos levar em consideração que foram utilizados outros táxons em suas análises.

Quando analisados os dados concatenados (*COI*+ *16S* rDNA + *28S* rDNA) foi possível verificar que grande parte das inconsistências observadas nas análises anteriores foram resolvidas nas filogenias de Parcimônia e Máxima Verossimilhança, isto é, as espécies pertencentes às subordens Auchenorrhyncha e Heteroptera foram separadas. As infraordens Gerromorpha e Nepomorpha (Heteroptera) também estabeleceram suas relações para as duas análises (P e MV). A partir desta análise foi possível distinguir a divisão das subordens Auchenorrhyncha e Heteroptera. A inconsistência observada para as espécies *M. longipes* (Veliidae) mais externa a Veliidae e Gerridae, e da espécie *R. c. crassifemur* (Gerridae), externa aos Veliidae (*Rhagovelia*) permaneceu nas análises de Parcimônia. Já para a espécie *H. platensis* (Gerridae) essa inconsistência foi solucionada.

Porém, quando observadas as topologias geradas por Máxima Verossimilhança, elas permaneceram apresentando inconsistências para as espécies *M. longipes* e *R. c. crassifemur*. A espécie *H. platensis* (Gerridae) apresentou-se externa aos Gerridae e Veliidae. Com relação às infraordens, Gerromorpha e Nepomorpha (Heteroptera) apresentaram agrupamentos consistentes visto que as topologias foram semelhantes e os integrantes de cada infraordem estão agrupados em conjunto e com valores de bootstrap altos, suportando os grupos formados. Foi observado o agrupamento dos gêneros *Buenoa* (Notonectidae), *Martarega* (Notonectidae), *Rhagovelia* (Veliidae) e *Mahanarva* (Auchenorrhyncha, Cercopidae) reforçando o que foi descrito a partir de dados morfológicos e sistemáticos (PALLADINI; CARVALHO, 2007; MORALES-CASTAÑO; MOLANO-RENDÓN, 2008; BARBOSA et al., 2010; NARANJO et al., 2010; MOREIRA et al., 2011).

Analisando todas as topologias dos genes *COI*, *16S* e *28S*, separadamente ou concatenados, constatou-se que ao combinarmos todos os genes, as filogenias apresentaram-se robustas e os agrupamentos mais

consistentes. Tais dados são inéditos e contribuem para o estabelecimento das relações entre as espécies estudadas, incluindo, principalmente, as espécies aquáticas, cujas informações são escassas. Entretanto, há ainda a necessidade de se analisar um maior número possível de táxons e genes em estudos futuros para reforçar as relações estabelecidas.

### AGRADECIMENTOS

Prof. Dr. Jorge Luiz Nessimian (UFRJ, RJ) pela identificação dos insetos aquáticos, Prof. Dr. José Raul Valério (Embrapa-Cenargen, Campo Grande, MS) pelo fornecimento das amostras de Auchenorrhyncha e Sr. Flávio Sueo Tokuda pelo fornecimento das amostras de pulgão (Sternorrhyncha). Agradecemos, também, a FAPESP e a FUNDUNESP pelo apoio financeiro.

### REFERÊNCIAS

- ANDERSEN, N.M. The semiaquatic bugs (Hemiptera, Gerromorpha). Phylogeny, adaptations, biogeography, and classification. *Entomonograph*, v. 3, p. 1-455, 1982.
- ARCHIE, J.W. Homoplasy Excess Statistics and Retention Indices: A Reply to Farris. *Systematic Zoology*, v. 39, n. 2, p. 171-169-174, 1990.
- BARBOSA, J.F; RIBEIRO, J.R.I; NESSIMIAN, J.L. A new species of *Buenoa* Kirkaldy (Hemiptera, Heteroptera, Notonectidae) from Rio de Janeiro, Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 54, n. 4, p. 560–564, 2010.
- BOURGOIN, T.; CAMPBELL, B.C. Inferring a phylogeny for Hemiptera: falling into the ‘autapomorphic trap’. *Denisia*, v. 4, p. 67–82, 2002.
- CAMPBELL, B. C., STEFFEN-CAMPBELL, J. D.; SORENSEN, J. T.; GILL, R. J. Paraphyly of Homoptera and Auchenorrhyncha inferred from 18S rDNA nucleotide sequences. *Systematic Entomology*, v. 20, n. 3, p. 175-194, 1995.
- CRYAN, J.R.; SVENSON, G.J. Family-level relationships of the spittlebugs and froghoppers (Hemiptera: Cicadomorpha: Cercopoidea). *Systematic Entomology*, v. 35, p. 393–415, 2010.
- CRYAN, J.R.; URBAN, J. M. Higher-level phylogeny of the insect order Hemiptera: is Auchenorrhyncha really paraphyletic? *Systematic Entomology*, v. 37, p. 7–21, 2012.



DAMGAARD J. Phylogeny of the semiaquatic bugs (Hemiptera-Heteroptera, Gerromorpha). *Insect Systematics & Evolution*, v. 39, p. 431-460. Copenhagen, 2008.

DAMGAARD, J.; ANDERSEN, N.M.; MEIER, R. Combining molecular and morphological analyses of water strider phylogeny (Hemiptera-Heteroptera, Gerromorpha): effects of alignment and taxon sampling. *Systematic Entomology*, v. 30, p. 289-309, 2005.

DAMGAARD, J.; SPERLING, F. A. H. Phylogeny of the water strider genus *Gerris* Fabricius (Heteroptera: Gerridae) based on *COI* mtDNA, EF-1 $\alpha$  nuclear DNA and morphology. *Systematic Entomology*. v. 26, p. 241-254, 2001.

FOLMER O.; BLACK M.; HOEH W.; LUTZ R.; VRIJENHOEK R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology & Biotechnology*., v. 3, p. 294-299, 1994.

FORERO, D. The systematics of the Hemiptera. *Revista Colombiana de Entomología*, v. 34, p. 1-21, 2008.

GOODCHILD, A. J. P. *Evolution of the alimentary canal of the Hemiptera*. Biological Review 41: 97-140, 1966.

GOLOBOFF, P.; FARRIS, J.; NIXON, K. T.N.T.: Tree Analysis Using New Tecnology, 2003.

GRIMALDI, D.; ENGEL, M.S. *Evolution of the Insects*. New York/Cambridge: Cambridge University Press. xv + 755 pp, 2005.

HAMILTON, K. G. A. Morphology and evolution of the Rhynchotan head (Insecta: Hemiptera, Homoptera). *The Canadian Entomologist*, v. 113, n. 11, p. 953-974, 1981.

HEINRICHS E. A.; BARRION A. T. Rice-Feeding Insects and Selected Natural Enemies in West Africa. Biology, Ecology, Identification (Edited by G. P. Hettel). Illustrated by CRIS DE LA CRUZ and JESSAMYN R. ADORADA. IRRI, WARDA, 242 pp, 2004.

JENKINS, D.W. Pathogens, parasites and predators of medically important Arthropods, annotated list and bibliography. B. World Health Organ. (supplement), p. 1-150, 1964.

LEITE, L.G.; MACHADO, L.A.; GOULART, R.M.; TAVARES, F.M.; FILHO, A.B. Screening of entomopathogenic nematodes (Nemata: Rhabditida) and the

efficiency of *Heterorhabditis* sp. against the sugarcane root spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Fabr.) (Hemiptera: Cercopidae). *Neotropical Entomology*, v. 34, p. 785-790, 2005.

LETSCH, H. O.; MEUSEMANN, K.; WIPFLER, B.; SCHUTTE, K.; BEUTEL, R.; MISOF, B. Insect phylogenomics: results, problems and the impact of matrix composition. *Proc. R. Soc. B.*, published online, doi:10.1098/rspb.2012.0744, 2012.

LI, M.; TIAN, Y.; ZHAO, Y.; BU, W. Higher level phylogeny and the First Divergence Time Estimation of Heteroptera (Insecta: Hemiptera) based on Multiple Genes. *Plos One*, v. 7, n. 2, e32152, p. 1-17, 2012.

LYMAN, D.F.; MONTEIRO, F.A.; ESCALANTE, A.A.; CORDON-ROSALES, C.; WESSON, D.M.; DUJARDIN, J.P.; BEARD, C.B. Mitochondrial DNA sequence variation among triatomine vectors of Chagas disease. *Am J Trop Med Hyg*, v. 60, p. 377-386, 1999.

MENKE, A.S. The semiaquatic and aquatic Hemiptera of California (Heteroptera: Hemiptera). *Bull. Calif. Insect Surv.*, v. 21, p. 1-166, 1979.

MORALES-CASTANO, I. T.; MOLANO-RENDON, F. Heterópteros acuáticos del Quindío (Colombia): Los infraórdenes Gerromorpha y Nepomorpha. *Rev. Colomb. Entomol.* [online], v. 34, n.1, p. 121-128, 2008.

MOREIRA, F.F.F.; ALECRIM, V.P; RIBEIRO, J.R.I; NESSIMIAN, J.L. Identification key to the Gerridae (Insecta: Heteroptera: Gerromorpha) from the Amazon River floodplain, Brazil, with new records for the Brazilian Amazon. *Zoologia*, v. 28, n. 2, p. 269-279, 2011.

MURAJI, M.; TACHIKAWA, S. Phylogenetic analysis of water striders (Hemiptera: Gerroidea), based on partial sequences of mitochondrial and nuclear ribosomal RNA genes. *Entomological Science*, v. 3, n. 4, p. 615-626, 2000.

NARANJO, C; RIVIAUX, S.M; MOREIRA, F.F.F.; COURT, R.C. Taxonomy and distribution of aquatic and semiaquatic Heteroptera (Insecta) from Cuba. *Rev. Biol. Trop.*, v. 58, n. 3, p. 897-907, 2010.

PALADINI, A.; CARVALHO, G. S. Description of three new species of *Mahanarva* (Hemiptera, Cercopidae, Ischnorhininae) *Zoologia*, v. 97, n. 1, p. 57-66, 2007.

PIRES, C.C., SILVA, L.F. FARINATTI, L.H.E. et al. Crescimento de cordeiros abatidos com diferentes pesos. 2. Constituintes corporais. *Ciência Rural*, v. 30, n. 5, p. 869-873, 2000.

SANZ, N.T. *Checklist of Pests and Diseases of Selected Crops of Belize*. Belize National Plant Protection Service, Ministry of Agriculture and Fisheries, Central Farm, Cayo District, 1997.

SCHLEE, v D. Morphologie und symbiose; ihre beweiskraft für die verwandtschaftsbeziehungen der Coleorrhyncha (Insecta, Hemiptera). Phylogenetische studien an Hemiptera IV.: Heteropteroidea (Heteroptera + Coleorrhyncha) als monophyletische gruppen. *Stuttgarter Beiträge zur Naturkunde*, v. 210, p. 1-27, 1969.

SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; FLOOK, P. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, v. 87, p. 651-701, 1994.

TAMURA K.; PETERSON D.; PETERSON N.; STECHER G.; NEI M.; KUMAR S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

TARTAROTTI, E. *Variabilidade genética e filogenia em triatomíneos (Triatominae, Heteroptera)*. São José do Rio Preto, Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 96f, 2002.

THOMPSON, V. Associative nitrogen fixation, C4 photosynthesis, and the evolution of spittlebugs (Hemiptera: Cercopidae) as major pests of Neotropical sugar cane and forage grasses. *Bulletin of Entomological Research*, **94**, 189–200, 2004.

THOMPSON, V.; LEON-GONZALEZ, R. La identificación y distribución de los salivazos de la caña de azúcar y los pastos (Homoptera: Cercopidae) en Costa Rica. *Manejo Integrado de Pagas y Agroecología (Costa Rica)*, **75**, 43–51, 2005.

URBAN, J. M.; CRYAN, J. R. Evolution of the planthoppers (Insecta: Hemiptera: Fulgoroidea). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 42, p. 556-572, 2007.

VON DOHLEN, C.D.; MORAN, N.A. Molecular phylogeny of the Homoptera: a paraphyletic taxon. *J. Mol. Evolution*, v. 41, n. 2, p. 211-223, 1995.

YOSHIZAWA, K.; SAIGUSA, T. Phylogenetic analysis of paraneopteran orders (Insecta: Neoptera) based on forewing base structure, with comments on monophyly of Auchenorrhyncha (Hemiptera). *Systematic Entomology*, v. 26, p. 1-13, 2001.

WEIRAUCH, C.; SCHUH, H. Systematics and Evolution of Heteroptera: 25 Years of Progress. *Annu. Rev. Entomol.* 56:487–510, 2011.

Tabela 1. Espécies utilizadas no presente trabalho discriminadas por família, infraordem e subordem.

Subordem	Infraordem	Família	Espécies
Auchenorrhyncha	Cicadomorpha	Cercopidae	<i>Deois flavopicta</i> (Stål, 1854) <i>Mahanarva fimbriolata</i> (Stål, 1854) <i>Mahanarva</i> sp. <i>Notozulia entreriana</i> (Berg, 1879)
Heteroptera	Gerromorpha	Gerridae	<i>Brachymetra albinervis albinervis</i> (Amyot & Serville, 1843) <i>Cylindrostethus palmaris</i> (Drake & Harris, 1934) <i>Halobatopsis platensis</i> (Berg, 1879) <i>Limnogonus aduncus</i> (Drake & Harris, 1933) <i>Rheumatobates crassifemur crassifemur</i> (Esaki, 1926)
		Veliidae	<i>Microvelia longipes</i> (Uhler, 1894) <i>Rhagovelia robusta</i> (Gould, 1931) <i>Rhagovelia tenuipes</i> (Champion, 1898) <i>Rhagovelia zela</i> (Drake, 1959)
	Nepomorpha	Belostomatidae	<i>Belostoma micantulum</i> (Stal, 1858)
		Gelastocoridae	<i>Gelastocoris flavus flavus</i> (Guérin-Ménéville, 1835)
		Notonectidae	<i>Buenoa amnigenus</i> (White, 1879) <i>Buenoa antigone antigone</i> (Kirkaldy, 1899) <i>Buenoa unguis</i> (Truxal, 1953) <i>Martarega brasiliensis</i> (Truxal, 1949) <i>Martarega membranacea</i> (White, 1879) <i>Martarega uruguayensis</i> (Berg, 1883)
Sternorrhyncha		Aphididae	<i>Aphis gossypii</i> (Glover, 1877)

Tabela 2. Primers utilizados na amplificação dos segmentos gênicos mitocondriais *COI* e *16S* e nuclear *28S*, discriminados por sequência (*Foward* e *Reverse*), tamanho esperado e referência.

Primers	Foward	Reverse	Tamanho	Referência
<i>COI</i> 1	TTTCAACAAATCATAAAGATATTGG	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	700 pb	Folmer et al. (1994)
<i>COI</i> 2	CAACATTTATTTGATTTTTTGG	GAATACTGCTCCTATGGATA	500 pb	Simon et al. (1994); Damgaard; Sperling (2001)
<i>16S</i>	CRCCTGTTTAACAAAAACAT	AAAAAAATTACGCTGTTATCCCTAAAGTAA	400 pb	Lyman et al. (1999)
<i>28S</i>	CCCGTCTTGAAACACGGACCAA	CCACAGCGCCAGTTCTGCTTAC	600pb	Muraji e Tachikawa (2000)

Tabela 3. Discriminação do número de caracteres obtidos (pb), sítios variáveis e informativos, Índice de consistência (CI) e de retenção (IR); números de passos e modelo de substituição nucleotídica para as regiões gênicas *COI*, *16S* e *28S*, individuais ou concatenada.

<b>Informações</b>	<b><i>COI1</i></b>	<b><i>COI2</i></b>	<b><i>16S</i></b>	<b><i>28S</i></b>	<b>Concatenada</b>
<b>Nº caracteres (pb)</b>	613	393	387	559	1952
<b>Sítios variáveis</b>	317	176	340	204	933
<b>Sítios informativos</b>	254	155	188	138	736
<b>Índice retenção (IR)</b>	0,43	0,56	0,61	0,69	0,52
<b>Índice de consistência (CI)</b>	0,40	0,54	0,52	0,74	0,45
<b>&lt; Nº passos</b>	1176	946	921	843	3145
<b>Modelo subst. nucleotídica</b>	GTR+I+G	TIM3+G	GTR+I+G	GTR+G	GTR+G

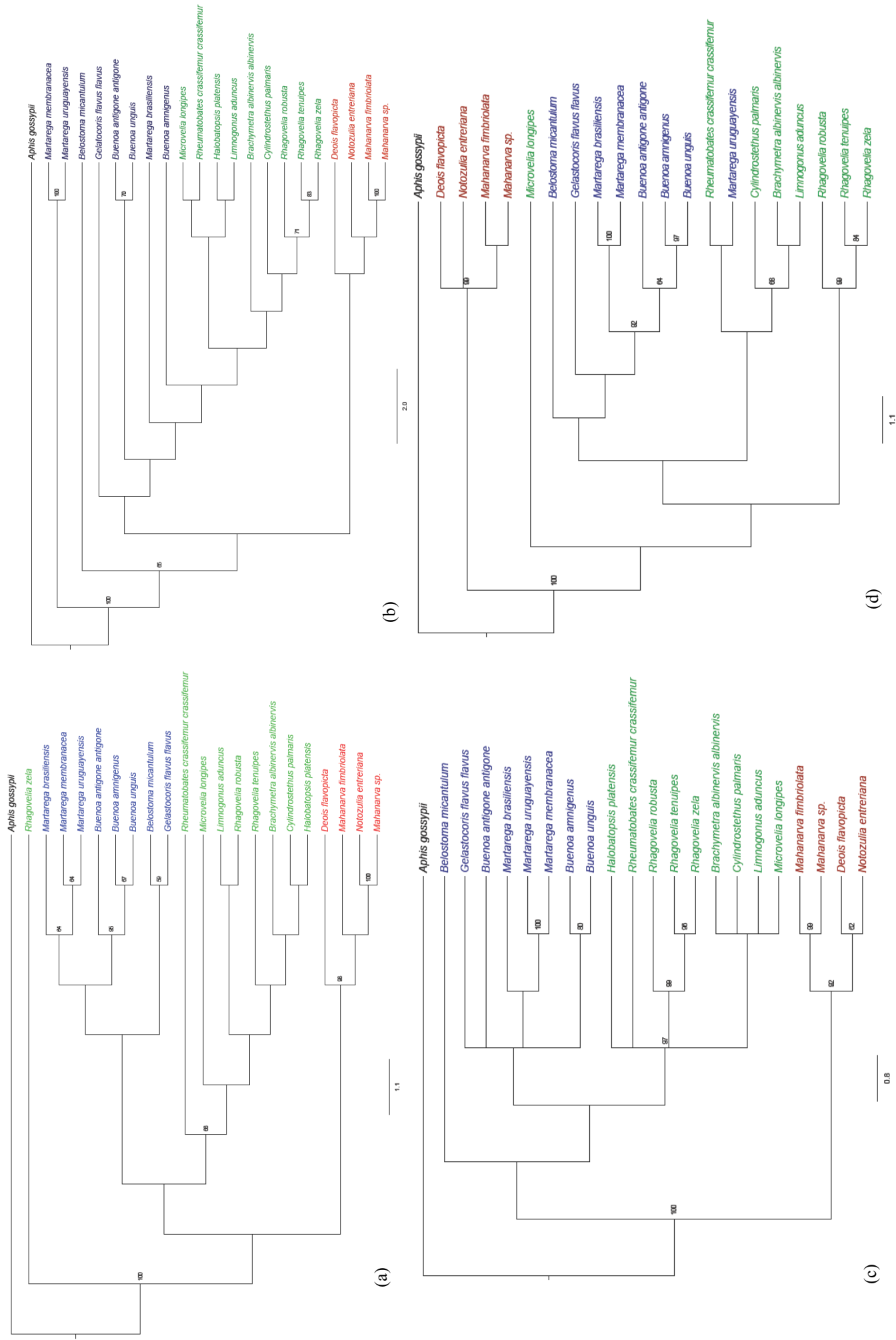


Figura 1. Árvores de Parcimônia de Auchenorrhyncha e Heteroptera. a) COI1; b) COI2; c) 16S; d) 28S, *bootstrap* indicado nos ramos. Cores: Preto (grupo externo); Azul (Nepomorpha, Heteroptera); Verde (Gerromorpha, Heteroptera); Vermelho (Cicadomorpha, Auchenorrhyncha).

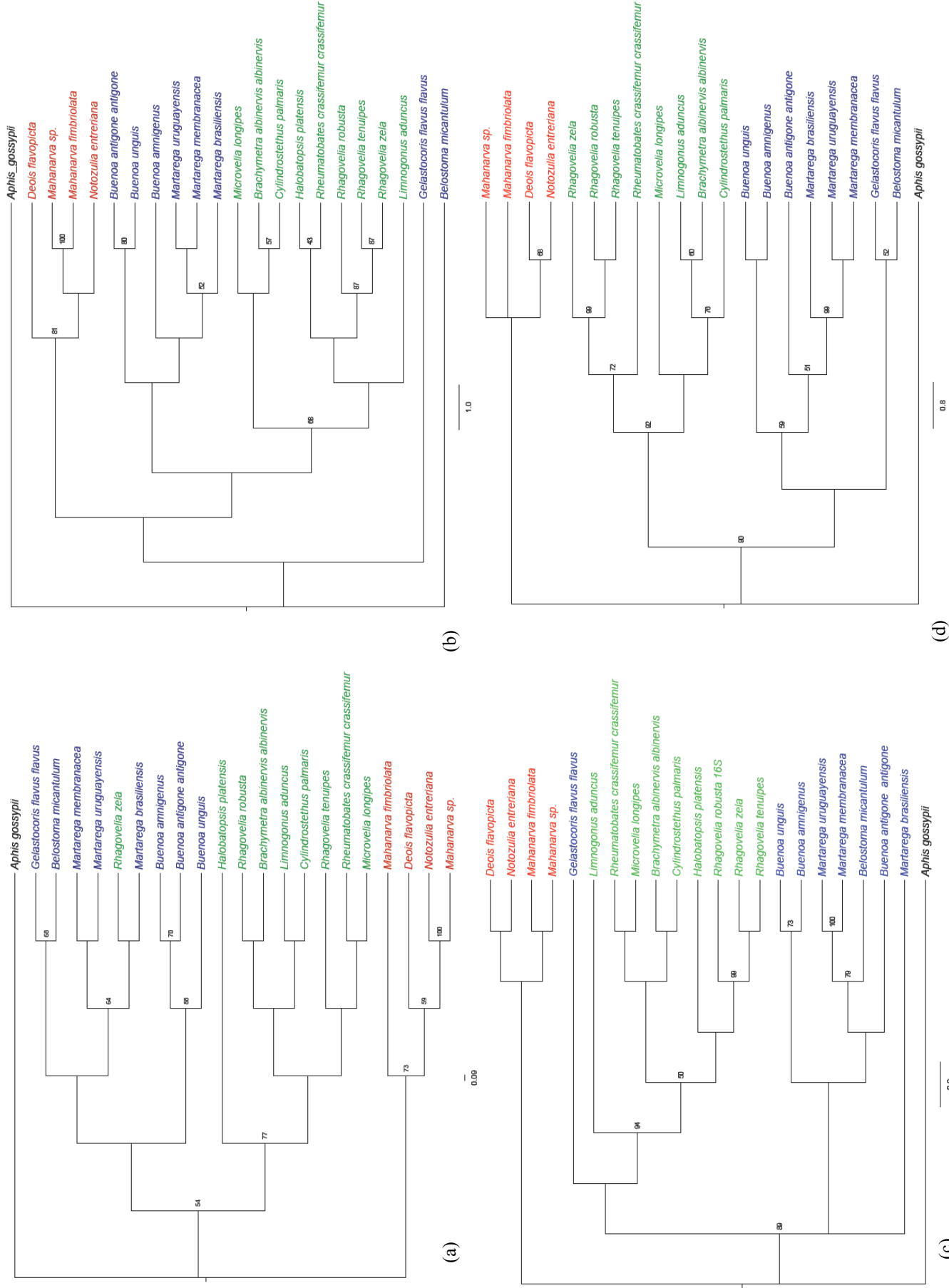


Figura 2. Árvores de Máxima Verossimilhança dos táxons de Auchenorrhyncha e Heteroptera. a) COI1; b) COI2; c) 28S, *bootstrap* indicado nos ramos. Cores: Preto (grupo externo); Azul (Nepomorpha, Heteroptera); Verde (Gerromorpha, Heteroptera); Vermelho (Cicadomorpha, Auchenorrhyncha).



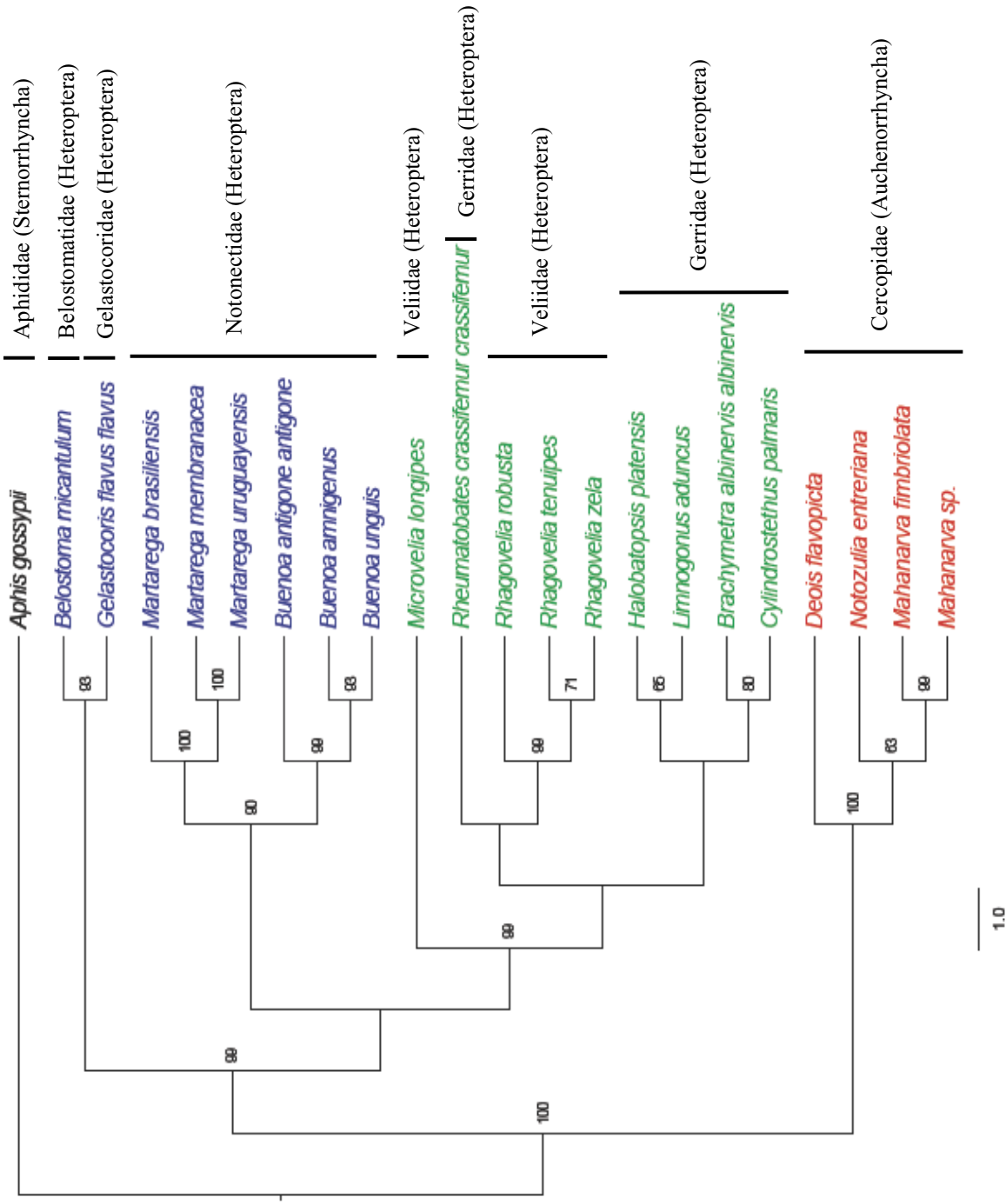


Figura 3. Árvore de Parcimônia de Auchenorrhyncha e Heteroptera, com os genes concatenados (COI+16S+28S), *bootstrap* indicado nos ramos. Cores: Preto (grupo externo); Azul (Nepomorpha, Heteroptera); Verde (Cicadomorpha, Heteroptera); Vermelho (Cicadomorpha, Auchenorrhyncha). Traços representando as famílias.

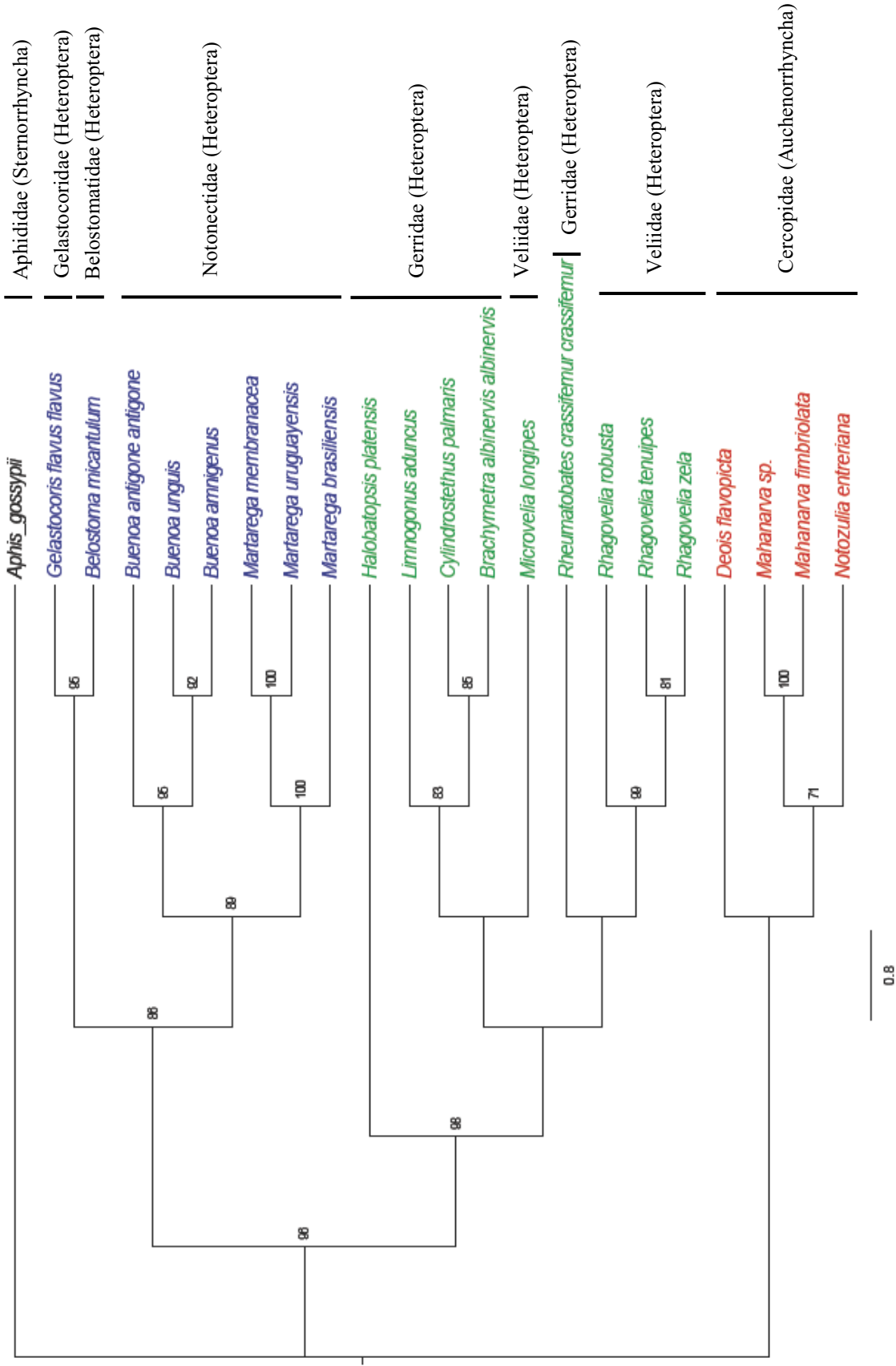


Figura 4. Árvore de Máxima Verossimilhança de Auchenorrhyncha e Heteroptera com os genes concatenados (COI+16S+28S), *bootstrap* indicado nos ramos. Cores: Preto (grupo externo); Azul (Nepomorpha, Heteroptera); Verde (Gerromorpha, Heteroptera); Vermelho (Cicadomorpha, Auchenorrhyncha). Traços representando as famílias.

### **ARTIGO III**

---

**Artigo 3 - Relações filogenéticas de percevejos aquáticos e semiaquáticos neotropicais a partir de dados combinados (citogenéticos, ecológicos, morfológicos e moleculares)**

Castanhole, M.M.U.<sup>1</sup>; Pereira, L.L.V.<sup>1</sup>; Gomes, M.O.<sup>1</sup>; Marchesin, S.R.C.<sup>2</sup>; Itoyama, M.M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UNESP/IBILCE- Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

<sup>2</sup>UNIP- Universidade Paulista, São José do Rio Preto, SP.

Palavras-chave: Heteroptera; Gerromorpha; Nepomorpha; sistema cromossômico do sexo; morfologia testículo.

**Resumo:** Espécies aquáticas pertencentes às infraordens Gerromorpha e Nepomorpha (Heteroptera) foram coletadas na região de São José do Rio Preto, SP, Brasil, para as quais foram propostas relações filogenéticas a partir de dados moleculares, ecológicos, morfológicos e citogenéticos. Como caracteres discriminativos foram utilizados três regiões gênicas (*COI*, *16S* rDNA e *28S* rDNA; dados moleculares), número de autossomos, presença ou ausência do cromossomo Y e de m-cromossomos, sistema cromossômico do sexo (citogenéticos), habitat, hábito alimentar (ecológicos) e morfologia do testículo (morfológico). Foi confeccionada uma matriz numérica a partir dos caracteres propostos e realizada uma análise de Parcimônia. Como grupos externos foram utilizados três espécies de Cercopidae (Auchenorrhyncha). Após as análises foi observado na topologia obtida que as espécies das duas infraordens de Heteroptera apresentaram-se como grupo-irmãos com bootstrap de 100%. Além da separação das duas infraordens (Gerromorpha e Nepomorpha) ocorreu, também, o agrupamento das famílias (Gerridae, Notonectidae e Veliidae) e dos gêneros (*Buenoa*, *Martarega* e *Rhagovelia*). Além destas características, foi

observado que as espécies que compartilham o mesmo estado de caráter também permaneceram agrupadas, exceto para a morfologia dos testículos. Com relação ao sistema cromossômico do sexo, foi possível observar que, a condição ancestral, provavelmente, seja o sistema X0. Foi possível concluir que as análises moleculares, em conjunto, com os aspectos citogenéticos, ecológicos e morfológicos fornecem resultados efetivos e robustos para o agrupamento das espécies, permitindo-nos assim, estabelecer algumas relações entre os táxons estudados.

## INTRODUÇÃO

Os insetos têm sido utilizados em uma variedade de estudos na tentativa de se compreender as relações de proximidade entre suas espécies e para isso, vêm sendo utilizado dados moleculares a partir de genes mitocondriais e nucleares, além de outras informações geradas a partir de dados morfológicos, comportamentais e citogenéticos (GROZEVA et al., 2009; KUZNETSOVA et al., 2011; WEIRAUCH; SCHUH, 2011; LI et al., 2012).

A utilização de genes mitocondriais e nucleares é muito frequente, pois são marcadores sensíveis na determinação das relações genéticas de vários organismos, detectando diferenças entre os táxons. No entanto, a adequação da sequência de nucleotídeos para a filogenia de alguns grupos de insetos parece variar entre genes, regiões e organismos, devido às diferenças em suas taxas evolutivas (SIMON et al., 1994; MINDELL; THACKER, 1996).

Além das informações moleculares, os dados citogenéticos, também, são informativos, pois os Heteroptera possuem diferentes complementos cromossômicos, diversos sistemas cromossômicos do sexo (X0, XY e múltiplos cromossomos sexuais), m-cromossomos, cromossomos B e univalentes (UESHIMA, 1979; MANNA, 1984; PAPESCHI; MOLA, 1990; GONZÁLEZ-GARCIA et al., 1996; SUJA et al., 2000).

Um dos problemas básicos relacionados à evolução dos sistemas dos cromossomos sexuais, em Heteroptera, é a determinação de qual é semelhante ao

cárater ancestral, X0 ou XY. O sistema mais comum em Heteroptera terrestres é o XY, entretanto, o táxon considerado basal nos trabalhos apresentados pela literatura é o X0 para os insetos aquáticos, por estar presente em famílias supostamente primitivas, como as pertencentes à infraordem Gerromorpha (UESHIMA, 1979). O sistema X0 é, também, o mais comum em outras ordens de insetos que apresentam a condição primitiva, como Odonata, Orthoptera e Psocoptera (WHITE, 1973). Este sistema está prevalecendo, também, nos táxons pertencentes à subordem Auchenorrhyncha juntamente com Heteroptera (HALKKA, 1959; KIRILLOVA, 1986, 1987). Ueshima (1979) propôs que o sistema XY evoluiu do X0, em Heteroptera, mas reconhece que a informação disponível para essa questão é rica nas espécies derivadas e pobre nos táxons plesiomórficos (GROZEVA; NOKKALA, 1996).

Com relação às características morfológicas e ecológicas, vários são os trabalhos que abordam esses aspectos para a obtenção de caracteres adicionais em análises evolutivas de diferentes grupos. A utilização de tais características tem contribuído com a determinação de filogenias mais robustas, demonstrando a importância de se utilizar dados combinados (SLATER; CARAYON, 1963; MILLER; WENZEL, 1995; ARNQVIST; THORNHILL, 1998; WEIRAUCH, 2008).

Atualmente, cresce o número de estudos de naturezas múltiplas para o estabelecimento de relações confiáveis entre os táxons (AMBROSE, 1999; DAMGAARD; SPERLING, 2001; DAMGAARD et al., 2005, 2008; JUNG; LEE, 2011). Weirauch e Schuh (2011) publicaram uma revisão de todos os estudos realizados com relação à sistemática e evolução dos Heteroptera, mostrando os 25 anos de progresso e a importância de se trabalhar com diferentes conjuntos de dados, chegando-se a conclusão de que as análises combinadas minimizam conflitos decorrentes de um único conjunto de informações. Entre os grupos de insetos que vem sendo amplamente estudados por diferentes características, podemos citar os pertencentes às infraordens Gerromorpha e Nepomorpha (Heteroptera).

Estudos, baseados em dados morfológicos e moleculares, apresentam a infraordem Nepomorpha basal em relação às outras infraordens e Cimicomorpha como grupo-irmão de Pentatomomorpha (LI et al., 2012). Outros estudos mostram a grande proximidade morfológica de algumas famílias, como Gerridae e Veliidae (Gerromorpha), levando a algumas inconsistências e dificuldade de observar agrupamentos monofiléticos (DAMGAARD, 2008).

Com o intuito de se estabelecer relações de proximidade entre 14 espécies da subordem Heteroptera pertencentes às famílias aquáticas Belostomatidae, Gelastocoridae, Gerridae, Notonectidae e Veliidae foram utilizados dados moleculares das regiões gênicas *COI*, *16S* e *28S*, características citogenéticas, ecológicas e morfológicas combinadas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Amostras**

As espécies estudadas das infraordens Gerromorpha e Nepomorpha (Heteroptera) estão relacionadas na Tabela 1 e foram coletadas em Américo de Campos (20°18' S, 49°44' O), Guaraci (20°30' S, 48°56' O), Jales (20° 16' S, 50° 32' O), Mirassol (20° 49' S, 49° 30' O), Sales (21° 20' S, 49° 29' O) e São José do Rio Preto (20° 47' S, 49° 21' W), situadas no Estado de São Paulo, Brasil, totalizando 14 espécies. Como grupo externo, foram utilizadas três espécies de Auchenorrhyncha (Cercopidae), *Deois flavopicta*, *Mahanarva fimbriolata* e *Notozulia entreriana* coletadas em Campo Grande (20° 26' S, 54° 38' O), MS, Brasil, que são considerados grupo - irmãos de Heteroptera por Cryan e Urban (2012) ( Tabela 1).

As espécies coletadas foram armazenadas e conservadas a -20°C em etanol absoluto para análises moleculares e em metanol: ácido acético (3:1) para análises citogenéticas, e depositadas no Laboratório de Citogenética e Molecular de Insetos (LACIMI), IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto, SP.

### **Extração, Amplificação e Sequenciamento do DNA**

O DNA genômico, extraído conforme protocolo descrito por Tartarotti (2002), foi utilizado nas amplificações de três regiões gênicas, sendo aproximadamente 1200 pb para o gene *COI* (mitocondrial), 400 pb para o *16S* (mitocondrial) e 550 pb para o *28S* (nuclear) (FOLMER. et al., 1994; SIMON et al., 1994; LYMAN et al., 1999; MURAJI; TACHIKAWA, 2000; DAMGAARD; SPERLING, 2001).

As reações foram realizadas num volume final de 15 µL, contendo 0,3 µL de dNTPs (ATCG), 11,6 µL ddH<sub>2</sub>O, 0,44 µL MgCl<sub>2</sub>, 1,5 µL do tampão PCR, 0,06 µL Taq DNA Platinum, 0,3 µL primer (10 M) e 0,5 µL amostra DNA (100ng/µL). As amplificações seguiram as seguintes condições, desnaturação inicial a 94°C por 1 min; 35 ciclos de desnaturação (30s, 94°C), anelamento com gradiente de temperatura de 45° a 55°C por 1 min, extensão 72°C, 1 min e extensão final a 72°C por 7 min.

As amostras foram purificadas com kit da GE Healthcare e as reações de sequenciamento foram realizadas pelo Centro de Estudos do Genoma Humano, na Universidade de São Paulo - USP, Brasil, com protocolo próprio (<http://genoma.ib.usp.br>).

Para garantir a qualidade dos nucleotídeos obtidos e a ordem destes, foram realizados sequenciamentos para as fitas *Forward* e *Reverse* e para todas as espécies foram realizadas réplicas, de dois espécimes, as quais foram utilizadas para a obtenção das sequências consenso e posterior alinhamento nos programas *MEGA* versão 5 (TAMURA et al., 2011) e *BioEdit* versão 7.0.9.0 (HALL, 1999).

### **Construção da matriz e análises filogenéticas**

A análise combinada foi realizada utilizando como características discriminativas as sequências dos genes *COI*, *16S* e *28S*, além dos dados citogenéticos (CASTANHOLE et al., 2008, 2010a,b,c, 2011; PEREIRA, 2011), ecológicos (UESHIMA, 1979; BORROR; DELONG, 1988; HEBSGAARD et al., 2004; PEREIRA et al., 2007; INADA et al., 2011) e morfológico (CASTANHOLE et al., 2008, 2010a,b,c, 2012; PEREIRA, 2011) (ANEXO 1)



obtidos para todas as espécies estudadas. Foram considerados como dados citogenéticos, ecológicos e morfológicos, um total de sete características e 26 variáveis, sendo que as características citogenéticas foram baseadas em presença ou ausência de m-cromossomos e cromossomo Y e número de autossomos (14, 18, 20, 22, 24, 28 e 30). Como características ecológicas foram consideradas habitat, sendo insetos aquáticos de superfície, subaquáticos, de fundo, margens e terrestres, e hábito alimentar (insetívoros ou fitófagos). Para a característica morfológica foi considerado, exclusivamente, a morfologia dos testículos, sendo eles arredondados, alongados, espiralados, em forma de “cacho de uva” ou enovelados, conforme Tabela 2 e ANEXO 1.

Para a construção da matriz numérica de caracteres, contendo tais informações, foi utilizado o programa WINCLADA versão 1.0 (NIXON, 2002). Os dados foram considerados não ordenados. Para uma análise comparativa, além de uma matriz contendo os dados combinados com todas as características propostas, foi construída uma matriz contendo apenas os dados citogenéticos, ecológicos e morfológicos, utilizando os mesmos parâmetros dos dados totais e uma matriz contendo apenas os dados moleculares com 2005 caracteres.

Após a construção das matrizes, estas foram submetidas à análise de Parcimônia (P) pelo software TNT v.1.1 (GOLOBOFF et al., 2003) com *bootstrap* de 1000 réplicas, 500 repetições pelo método *TBR max*. Para todas as análises foi utilizada a árvore consenso estrito.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao analisar a topologia gerada, exclusivamente, pelos dados citogenéticos, ecológicos e morfológicos foi gerada uma única árvore parcimoniosa, com 21 passos, e índices de consistência de 0,85 e de retenção 0,88 e verificou-se agrupamentos não consistentes representados pelos baixos valores de *bootstrap*, além da ocorrência de mistura entre os clados terminais, como o observado para as relações entre infraordens e famílias (Figura 1a). As espécies *Limnogonus aduncus* e *Rheumatobates crassifemur crassifemur* pertencentes à

família Gerridae (Gerromorpha), apresentaram-se separadas dos outros táxons da mesma família (Figura 1a). O único grupo bem suportado por esta análise foi formado pelas espécies pertencentes à família Notonectidae com *bootstrap* de 86% (Figura 1a).

A topologia gerada só com os dados moleculares foi bem definida com relação a separação das infraordens (Gerromorpha e Nepomorpha), famílias (Belostomatidae, Gelastocoridae, Gerridae, Notonectidae e Veliidae) e gêneros (*Buenoa*, *Martarega* e *Rhagovelia*). Apresentou-se uma única árvore filogenética igualmente parcimoniosa, com 2442 passos e índices de retenção e consistência de 0,51 e 0,50, respectivamente (Figura 1b).

Com o intuito de incorporar e melhorar ainda mais as análises, todos os dados foram combinados, isto é, citogenéticos, ecológicos, morfológicos e moleculares. Verificou-se a formação de grupos bem estruturados como na análise de dados moleculares (Figura 1b), contendo espécies congênicas e pertencentes à mesma família, diferentemente da análise em que as características moleculares não foram levadas em consideração (Figura 1a). Neste trabalho, os dados moleculares foram de extrema importância, entretanto, a combinação com as outras características foram congruentes no suporte da filogenia obtida (Figura 2a). Obteve-se para esta análise uma única árvore igualmente parcimoniosa, com número de passos de 2464, índices de retenção de 0,52 e de consistência de 0,51, com um total de 2012 caracteres avaliados.

Ao avaliarem-se as características citogenéticas, verificou-se com relação ao número de autossomos, que essa característica não foi crucial para a determinação e separação dos grupos, pois ao se analisar a topologia gerada não foi possível estabelecer relações considerando esta informação, pois os números de autossomos, nesta análise, não apresentaram um padrão evolutivo evidente, isto é, por exemplo, do maior número de cromossomos (30) para o menor (14), ou vice-versa. Estes resultados dificultam a definição da problemática envolvida com a provável origem dos complementos cromossômicos, se é por quebra ou fusões e quais destes eventos ocorreram primeiro, e isto poderia justificar os diferentes números de autossomos nas espécies estudadas de Heteroptera (NOKKALA et al.,

2007; CASTANHOLE et al., 2008, 2009, 2010, 2012; GROZEVA et al., 2009, KUZNETSOVA et al., 2011). Apesar desses resultados não serem suficientes para concluir a possível origem dos diferentes complementos cromossômicos, Nokkala et al. (2007) em estudos com a família Nabidae (Heteroptera) relataram que é mais fácil ocorrer eventos de fusões do que fragmentações cromossômicas. Para os autores os cariótipos com menor número de cromossomos seriam atribuídos como sendo características plesiomórficas.

Os sistemas cromossômicos do sexo observados foram X0, XY e  $X_nY$ , sendo que o X0 foi observado nas espécies de Auchenorrhyncha (grupo externo) e em 12 das 14 espécies analisadas de Heteroptera aquáticas, sendo considerado, portanto a condição ancestral, assim como observado por Ueshima (1979) em táxons com condições primitivas de Heteroptera. As espécies dos gêneros *Belostoma* (Belostomatidae) e *Gelastocoris* (Gelastocoridae) apresentaram, respectivamente, os sistemas XY e  $X_nY$ .

Analisando o caráter ecológico (habitat) verificou-se o agrupamento correto dos insetos dentro de cada característica, ou seja, subaquáticos (Notonectidae) e de superfície (Gerridae e Veliidae). Os insetos de fundo (Belostomatidae) e de margens (Gelastocoridae) próximos a vegetação, agruparam-se como grupo-irmãos dos subaquáticos, sendo todos eles incluídos dentro da infraordem Nepomorpha (Figura 2b). Segundo Li et al. (2012) as infraordens Gerromorpha e Nepomorpha colonizaram o ambiente aquático em períodos diferentes.

Pelo fato do hábito alimentar de todos os Heteroptera analisados serem insetívoros, eles auxiliaram na polarização dos dados com relação ao grupo externo, que são todos fitófagos (VALÉRIO et al., 2001).

Quando considerado os dados da morfologia dos testículos, verificou-se que todas as espécies de *Martarega* (Notonectidae, Nepomorpha) compartilham a condição de testículo espiralado e permaneceram agrupados, porém indivíduos pertencentes à mesma família, como o gênero *Buenoa* apresentam testículos arredondados e permanecem agrupados com os espécimes de *Martarega*. As espécies pertencentes às famílias Belostomatidae e

Gelastocoridae (Nepomorpha) que apresentam morfologias bem diferenciadas (enovelado e “chifre de veado”, respectivamente) quando comparadas as outras espécies da mesma infraordem (Nepomorpha), permaneceram agrupadas. Os integrantes da família Gerridae (Gerromorpha) apresentam testículos alongados e agruparam-se com os da família Veliidae que apresentam testículos arredondados.

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho foi verificado que as características combinadas foram importantes nas propostas de resolução da análise filogenética dos táxons propostos, sendo relevantes para poder inferir, por exemplo, que o sistema cromossômico do sexo X0 é o estado ancestral.

Na literatura, estudos utilizando caracteres morfológicos e combinados (moleculares e ecológicos) de insetos aquáticos vêm sendo amplamente utilizados ao longo dos anos (DAMGAARD et al., 2005, 2008). Contudo, poucos são os trabalhos que utilizam dados citogenéticos combinados com outros caracteres, talvez, em primeiro lugar, pela dificuldade em coletar os insetos, identificá-los e obter metáfases em condições adequadas para definição do complemento cromossômico e do sistema cromossômico do sexo. Portanto, ressalta-se a importância de se registrar o máximo de características (citogenéticas, ecológicas, morfológicas e moleculares) dos Heteroptera para auxiliar na definição do posicionamento dos táxons, levando-se em consideração, por exemplo, a complexidade de algumas famílias, como Gerridae e Veliidae analisadas por Damgaard et al. (2005), em que a partir de sinapomorfias morfológicas, observaram que os membros dessas duas famílias (Gerridae e Veliidae) apresentaram-se proximamente relacionados, gerando muitas vezes indefinição nos agrupamentos entre as espécies dessas duas famílias.

De maneira geral, o presente trabalho apresentou uma análise preliminar do comportamento de diferentes conjuntos de dados combinados e os resultados apontam que as espécies consideradas na filogenia foram consistentes em nível de família e habitat, caracterizando, também, que o sistema cromossômico do sexo X0 é o estado ancestral. As infraordens Gerromorpha e Nepomorpha (Heteroptera) apresentaram-se monofiléticas, contudo é necessário

um número maior de caracteres e de táxons para estabelecermos relações mais conclusivas.

### **Agradecimentos**

Prof. Dr. Jorge Luiz Nessimian (UFRJ, RJ) pela identificação dos insetos aquáticos, Prof. Dr. José Raul Valério (Embrapa-Cenargen, Campo Grande, MS) pelo fornecimento das amostras de Auchenorrhyncha e Sr. Flávio Sueo Tokuda pelo fornecimento das amostras de pulgão (Sternorrhyncha). Agradecemos, também, a FAPESP e a FUNDUNESP pelo apoio financeiro.

### **Referências Bibliográficas**

AMBROSE, D. P. Assassin bugs. Enfield. VIII + 336p, 1999.

ARNQVIST, G.; THORNHILL, R.. Evolution of animal genitalia: patterns of phenotypic and genotypic variation and condition dependence of genital and non-genital morphology in water strider (Heteroptera: Gerridae: Insecta). *Genetical Research*, v. 71, n. 03, p. 193-212, 1998.

CASTANHOLE, M.M.; PEREIRA, L.L.; SOUZA, H.V.; BICUDO, H.E., et al. Heteropicnotic chromatin and nucleolar activity in meiosis and spermiogenesis of *Limnogonus aduncus* (Heteroptera, Gerridae): a stained nucleolar organizing region that can serve as a model for studying chromosome behavior. *Genet. Mol. Res.*, v. 7, p. 1398-1407, 2008.

CASTANHOLE, M. M. U. Espermatogênese e comportamento nucleolar em machos de Heteroptera aquáticos. São José do Rio Preto. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, 117pp, 2009.

CASTANHOLE, M.M.U.; PEREIRA, L.L.V; SOUZA, H.V.; ITOYAMA, M.M. Spermatogenesis and karyotypes of three species of water striders (Gerridae, Heteroptera). *Genet. Mol. Res.*, v. 9, n.3, p. 1343-1356, 2010a.

CASTANHOLE, M.M.U.; PEREIRA, L.L.V.; SOUZA, H.V.; VALERIO, J.R.; BARBOSA, L.R.; ITOYAMA, M.M. Meiotic chromosomes and nucleolar behavior in testicular cells of the grassland spittlebugs *Deois flavopicta*, *Mahanarva fimbriolata* and *Notozulia enterriana* (Hemiptera, Auchenorrhyncha). *Genetics and Molecular Biology*, v. 33, n. 2, p. 244-252, 2010b.

- CASTANHOLE, MMU; PEREIRA, LLV; ITOYAMA, MM. Descrição da espermatogênese da espécie *Rheumatobates crassifemur crassifemur* (Heteroptera, Gerridae). Resumos do 56º Congresso Brasileiro de Genética, Guarujá, p. 266, 2010c.
- CASTANHOLE, M.M.U.; PEREIRA, L.L.V; SOUZA, H.V.; ITOYAMA, M.M. Spermatogenesis of riffle bugs, *Rhagovelia whitei* and *Rhagovelia* sp (Veliidae), and backswimmers *Martarega* sp (Notonectidae). *Genetics and Molecular Research*, v. 11, n. 3, p. 2003-2020, 2012.
- DAMGAARD, J.; SPERLING, F. A. H. Phylogeny of the water strider genus *Gerris* Fabricius (Heteroptera: Gerridae) based on *COI* mtDNA, EF-1 $\alpha$  nuclear DNA and morphology. *Systematic Entomology*, v. 26, p. 241-254, 2001.
- DAMGAARD, J.; ANDERSEN, N.M.; MEIER, R. Combining molecular and morphological analyses of water strider phylogeny (Hemiptera–Heteroptera, Gerromorpha): effects of alignment and taxon sampling. *Systematic Entomology*, v. 30, p. 289–309, 2005.
- DAMGAARD, J. Phylogeny of the semiaquatic bugs (Hemiptera-Heteroptera, Gerromorpha). *Insect Syst. Evol.*, v. 39, p. 431-460. Copenhagen, November 2008. ISSN1399-560X.
- FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase submit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, v.3, p.294-299, 1994.
- GOLOBOFF, P.; FARRIS, J.; NIXON, K. T.N.T.: Tree Analysis Using New Technology, 2003
- GONZÁLEZ-GARCIA, J.M.; ANTONIO, C.; SUJA, J.A.; RUFAS, J.S. Meiosis in holocentric chromosomes: kinetic activity is randomly restricted to the chromatid ends of sex univalents in *Graphosoma italicum* (Heteroptera). *Chromosome Research*, v. 4, p. 124-132, 1996.
- GROZEVA, S.; NOKKALA, S. Chromosomes and their behaviour in two families of the primitive infraorder Dipsocoromorpha (Heteroptera). *Hereditas*, v. 125, p. 31-36, 1996.
- GROZEVA, S.; NOKKALA, S.; SIMOV, N. Chiasmata male meiosis in six species of water bugs from infraorders Nepomorpha and Gerromorpha (Insecta: Heteroptera). *Comparative Cytogenetics*, v. 3, p. 125–130, 2009.
- HALKKA, O. Chromosome studies on the Hemiptera Homoptera Auchenorrhyncha. *Annales Academiae Scientiarum Fennicae.*, v. 43, p. 1-71, 1959.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, v. 41, p. 95-98, 1999.

JUNG, S.; DUWAL, R.K.; LEE, S. COI barcoding of true bugs (Insecta, Heteroptera). *Molecular Ecology Resources.*, v. 11, p. 266–270, 2011.

KIRILLOVA, V.I. Chromosome numbers of leafhoppers (Homoptera, Auchenorrhyncha) of the world fauna. I. Superfamilies Fulgoroidea, Cercopoidea, Cicadoidea. *Entomologiceskoe obozrenie*, v. 65, p. 115-125, 1986.

KIRILLOVA, V.I. Chromosomes numbers of leafhoppers (Homoptera, Auchenorrhyncha) of the world fauna. I. Karyotype peculiarities of the leafhoppers of the superfamilies Fulgoroidea, Cercopoidea, Cicadoidea. *Entomologiceskoe obozrenie*, v. 66, p. 321-337, 1987.

KUZNETSOVA, V. G.; GROZEVA, S.M.; NOKKALA, S.; NOKKALA, C. Cytogenetics of the true bug infraorder Cimicomorpha (Hemiptera, Heteroptera): a review. *ZooKeys*, v. 154, p. 31–70, 2011.

LI, M.; TIAN, Y.; ZHAO, Y.; BU, W. Higher level phylogeny and the First Divergence Time Estimation of Heteroptera (Insecta: Hemiptera) based on Multiple Genes. *Plos One*, v. 7(2), e32152, 1-17, 2012.

LYMAN, D.F.; MONTEIRO, F.A.; ESCALANTE, A.A.; CORDON-ROSALES, C.; WESSON, D.M.; DUJARDIN, J.P.; BEARD, C.B. Mitochondrial DNA sequence variation among triatomine vectors of Chagas disease. *Am J Trop Med Hyg*, v. 60, p. 377-386, 1999.

MANNA, G.K. **Chromosomes in evolution in Heteroptera.** In: SHARMA, A.K., ed. *Chromosomes in evolution of Eukaryotic groups.* Boca Raton Florida USA: CRCPress, p. 189-225, 1984.

MINDELL, D.P.; THACKER, C.E. Rates of molecular evolution: phylogenetic issues and applications. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, v. 27, p. 279–303, 1996.

MILLER, J.S.; WENZEL, J.W. ECOLOGICAL CHARACTERS AND PHYLOGENY. *Annu. Rev. Entomol.*, v. 40, p. 389-415, 1995.

MURAJI, M.; TACHIKAWA, S. Phylogenetic analysis of water striders (Hemiptera: Gerroidea), based on partial sequences of mitochondrial and nuclear ribosomal RNA genes. *Entomological Science*, v. 3, n. 4, p. 615-626, 2000.

NIXON, K. C. Winclada ver. 1.00.08 Published by the author, Ithaca, NY, 2002.

NOKKALA, C.; KUZNETSOVA, V.; GROZEVA, S.; NOKKALA, S. Direction of karyotype evolution in the bug family Nabidae (Heteroptera): New evidence from 18S rDNA analysis. *European Journal of Entomology*, v. 104, p. 661-665, 2007.

PAPESCHI, A.G.; MOLA, L.M. Meiotic studies in *Acanonicus hahni* (Coreidae, Heteroptera). I. Behaviour of univalents in desynaptic individuals. *Genetica*, v. 80, p. 31-38, 1990.

PEREIRA, L. L.V. **Estudo morfológico dos testículos com ênfase na análise da espermatogênese e ultraestrutura de espécies aquáticas de Heteroptera**. São José do Rio Preto. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, 103pp, 2011.

SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; FLOOK, P. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, v. 87, p. 651–701, 1994.

SLATER, J. A.; CARAYON, J. Ethiopian Lygaeidae IV: A new predatory Lygaeid from Africa with a discussion of its biology and morphology (Hemiptera: Heteroptera). *Proceedings of the Royal Entomological Society of London. Series A, General Entomology*. v. 38 (1-3), p.1-11, 1963.

SUJA, J.A.; DEL CERRO, A.L.; PAGE, J.; RUFAS, J.S.; SANTOS, J.L. Meiotic sister chromatid cohesion in holocentric sex chromosomes of three heteropteran species is maintained in absence of axial elements. *Chromosoma*, v. 109, p. 35-43, 2000.

TAMURA K.; PETERSON D.; PETERSON N.; STECHER G.; NEI M.; KUMAR S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

UESHIMA, N. **Animal cytogenetics**, Insecta 6, Hemiptera: Heteroptera. Gebruder Borntraeger: Berlin, Stuttgart, 1979.

WEIRAUCH, C.; SCHUH, R. Systematics and Evolution of Heteroptera: 25 Years of Progress. *Annual Review of Entomology*, v. 56, p. 487-510, 2011.

WEIRAUCH, C. Cladistic analysis of Reduviidae (Heteroptera: Cimicomorpha) based on morphological characters. *Systematic Entomology*, v. 33, p. 229–274, 2008.



WHITE, M.J.D., **Animal Cytology and Evolution**, 3<sup>rd</sup> ed. Cambridge University Press, 1973.

Tabela 1. Espécies utilizadas no presente trabalho discriminadas por espécie, família, infraordem e subordem.

Subordem	Infraordem	Família	Espécies	
Auchenorrhyncha	Cicadomorpha	Cercopidae	<i>Deois flavopicta</i> (Stål, 1854) <i>Mahanarva fimbriolata</i> (Stål, 1854) <i>Notozulia entreriana</i> (Berg, 1879)	
Heteroptera	Gerromorpha	Gerridae	<i>Brachymetra albinervis albinervis</i> * (Amyot & Serville, 1843) <i>Cylindrostethus palmaris</i> (Drake & Harris, 1934) <i>Halobatopsis platensis</i> (Berg, 1879) <i>Limnogonus aduncus</i> (Drake; Harris, 1933) <i>Rheumatobates crassifemur crassifemur</i> (Esaki, 1926)	
			Veliidae	<i>Rhagovelia tenuipes</i> (Champion, 1898) <i>Rhagovelia zela</i> (Drake, 1959)
				Nepomorpha
	Gelastocoridae <i>Gelastocoris flavus flavus</i> (Guérin-Méneville, 1835)			
	Notonectidae	<i>Buenoa amnigenus</i> (White, 1879) <i>Buenoa unguis</i> (Truxal, 1953) <i>Martarega brasiliensis</i> (Truxal, 1949) <i>Martarega membranacea</i> (White, 1879) <i>Martarega uruguayensis</i> (Berg, 1883)		

Tabela 2. Características morfológicas, ecológicas e citogenéticas de espécies de Heteroptera (infraordens Nepomorpha e Gerromorpha) e Auchenorrhyncha (Cercopidae), com relação a morfologia dos testículos, habitat, hábito alimentar, número de autossomos, presença ou ausência de m-cromossomos e cromossomo Y.

Espécies (2n)	Dados		Morfológicos		Ecológicos		Citogenéticos		
	Carater discriminativo	Morfologia testículo	Habitat	Hábito alimentar	n° A	m-cromossomo	Cromosomo Y		
<i>Belostoma micantulum</i> 16 (14+XY)		"enovelado"	Aquático	Profundidade	insetívoro	14	Ausente	Presente	
<i>Gelastocoris flavus flavus</i> 35 (30A+X1X2X3X4Y)		"chife de veado"	Aquático	Bordas	insetívoro	30	Ausente	Presente	
<i>Buena amigenus</i> 25 (24A + X0)		arredondado	Aquático	Subaquático	insetívoro	24	Ausente	Ausente	
<i>Buena unguis</i> 25 (24A + X0)		arredondado	Aquático	Subaquático	insetívoro	24	Ausente	Ausente	
<i>Martarega brasiliensis</i> 27 (24A+2m+X0)		espiralado	Aquático	Subaquático	insetívoro	24	Presente	Ausente	
<i>Martarega membranacea</i> 25 (22A+2m+X0)		espiralado	Aquático	Subaquático	insetívoro	22	Presente	Ausente	
<i>Martarega uruguayensis</i> 27 (24A+2m+X0)		espiralado	Aquático	Subaquático	insetívoro	24	Presente	Ausente	
<i>Brachymetra albinervis albinervis</i> 25 (24A + X0)		alongado	Aquático	Superfície	insetívoro	24	Ausente	Ausente	
<i>Cylindrostethus palmaris</i> 29 (28A + X0)		alongado	Aquático	Superfície	insetívoro	28	Ausente	Ausente	
<i>Halobatopsis platensis</i> 25 (24A + X0)		alongado	Aquático	Superfície	insetívoro	24	Ausente	Ausente	
<i>Limnogonus aduncus</i> 23 (22A + X0)		alongado	Aquático	Superfície	insetívoro	22	Ausente	Ausente	
<i>Rheumatobates crassifemur crassifemur</i> 21 (20A + X0)		arredondado	Aquático	Superfície	insetívoro	20	Ausente	Ausente	
<i>Rhagovelia tenuipes</i> 23 (22A+X0)		arredondado	Aquático	Superfície	insetívoro	22	Ausente	Ausente	
<i>Rhagovelia zela</i> 23 (22A + X0)		arredondado	Aquático	Superfície	insetívoro	22	Ausente	Ausente	
<i>Deois flavopicta</i> 19 (18A + X0)		cacho de uva	Terrestre	Terrestre	fitófagos	18	Ausente	Ausente	
<i>Mahanarva fimbriolata</i> 19 (18A + X0)		cacho de uva	Terrestre	Terrestre	fitófagos	18	Ausente	Ausente	
<i>Notozulia entreriana</i> 15 (14A + X0)		cacho de uva	Terrestre	Terrestre	fitófagos	14	Ausente	Ausente	

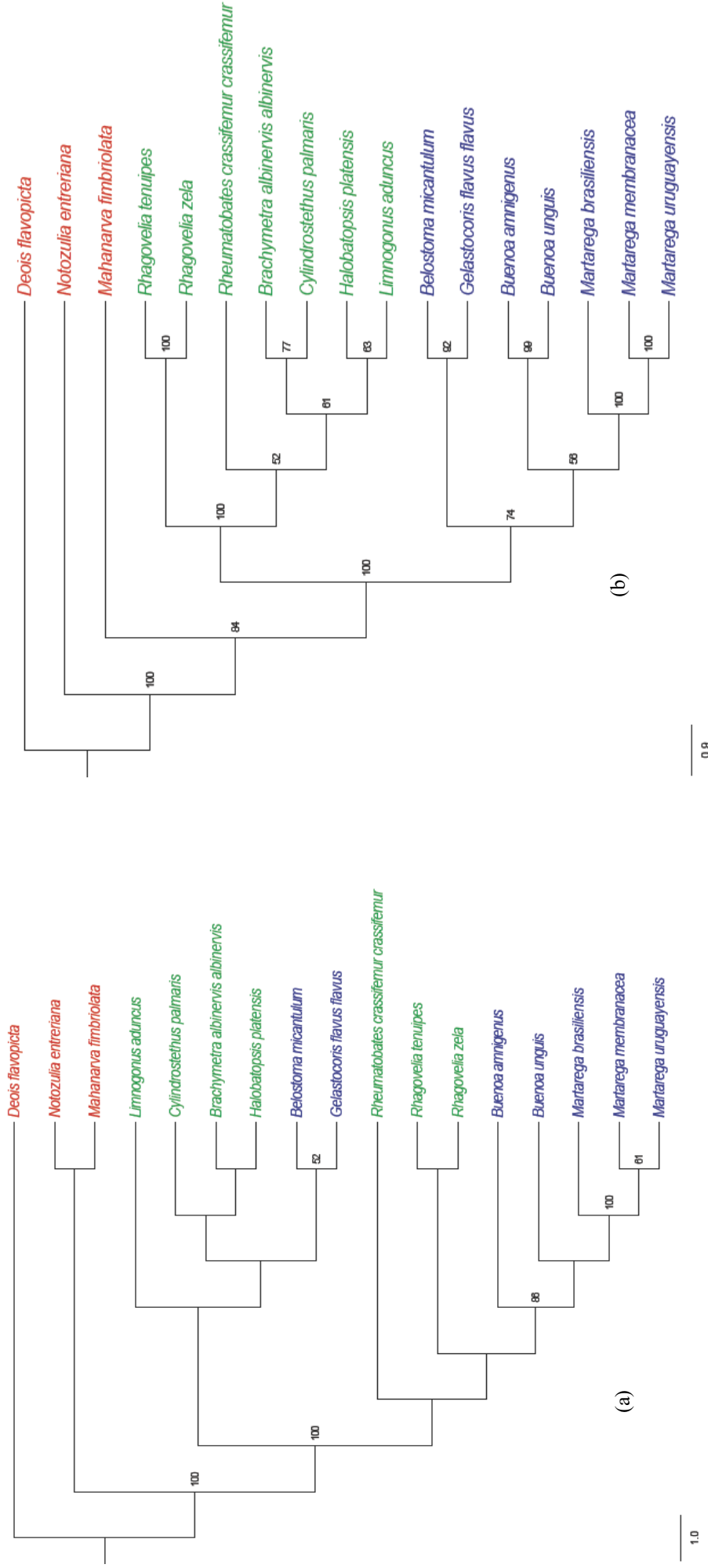


Figura 1. Filogenia obtida por Parcimônia (TNT), à partir da matriz numérica contendo (a) dados citogenéticos, ecológicos e morfológicos; (b) somente dados moleculares (*COI*, *16S* e *28S*), com *bootstrap* de 1000 réplicas. Vermelho: Grupo Externo (Cicadomorpha, Auchenorrhyncha); Azul: Infraordem Nepomorpha (Heteroptera); Verde: infraordem Gerromorpha (Heteroptera).

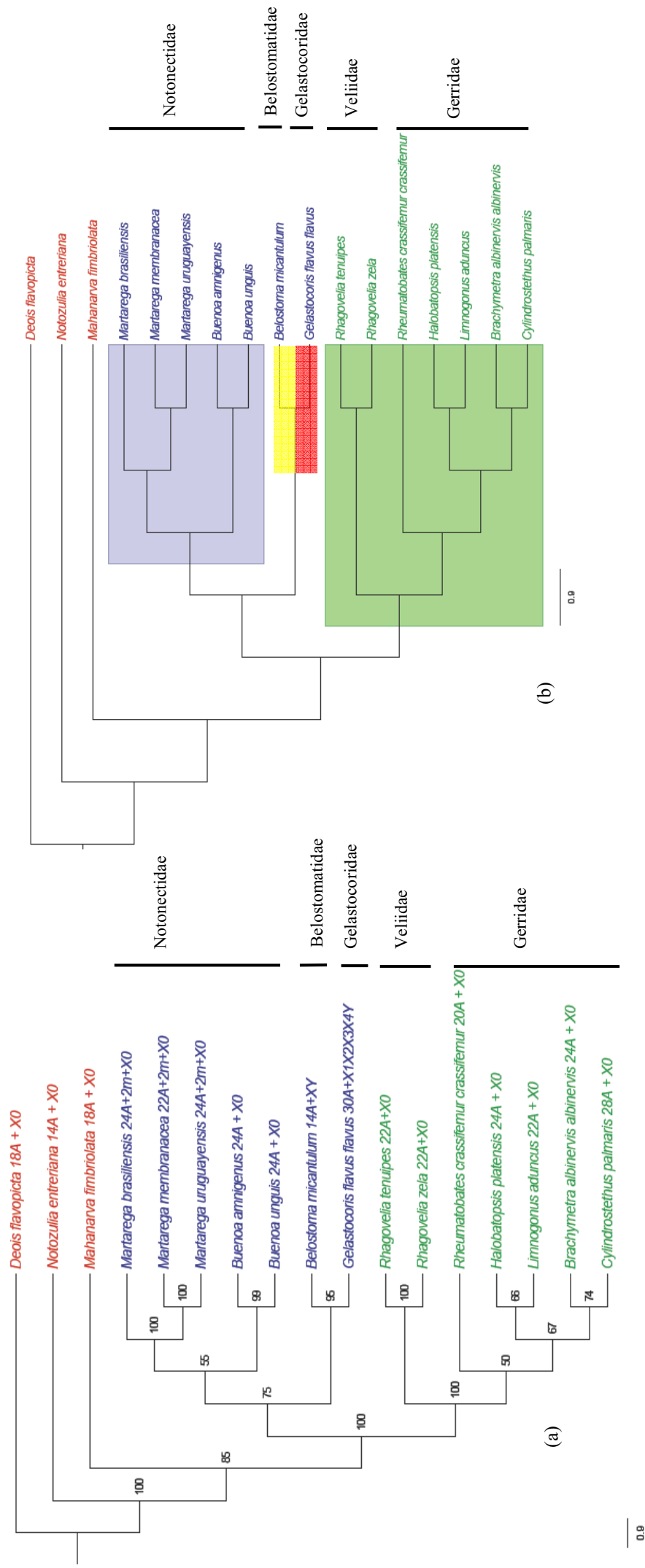
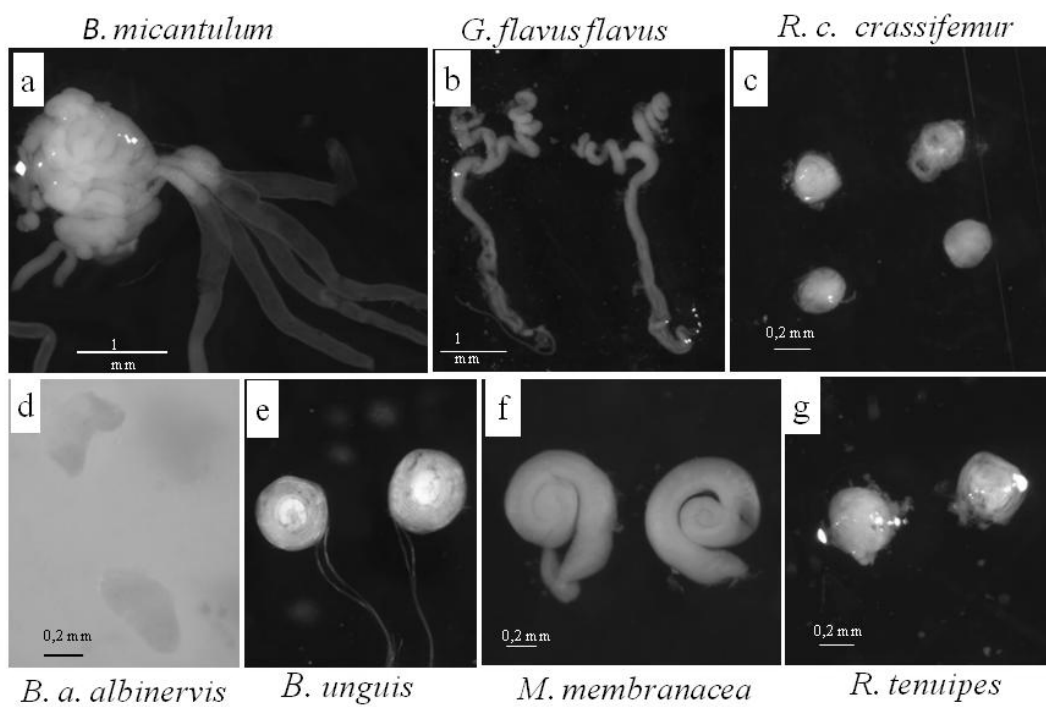


Figura 2. Filogenia obtida por Parcimônia (TNT), à partir da matriz numérica contendo (a) dados totais combinados com informações citogenéticas, ecológicas, morfológicas e moleculares (*COI*, *16S* e *28S*), com *bootstrap* de 1000 réplicas; Vermelho: Grupo Externo (Cicadomorpha, Auchenorrhyncha); Azul: Infraordem Nepomorpha (Heteroptera); Verde: infraordem Gerromorpha (Heteroptera); (b) dados totais combinados, com representação do habitat, sendo subaquáticos (retângulo azul claro), de fundo de rios (retângulo amarelo) margem (retângulo vermelho), de superfície (retângulo verde) e terrestres (vermelho). Traços: Representação das famílias.

## ANEXO 1

Morfologia dos testículos de Heteroptera, sendo enovelados (a); “chifre de veado” (b); arredondados (c, e,g); alongados (d) e espiralado (f).



#### **IV. DISCUSSÃO GERAL**

---

#### IV. DISCUSSÃO GERAL

A fauna de percevejos aquáticos e cigarrinha-das-pastagens neotropicais apresentam grande diversidade e são ainda pouco conhecidas, principalmente, quanto aos aspectos de variabilidade genética e, os estudos sistemáticos, ainda geram debates quanto à classificação dos diferentes grupos. Atualmente, é necessária a utilização de múltiplas abordagens metodológicas que visem o esclarecimento de tais conflitos.

Com o intuito de contribuir com informações adicionais às já disponibilizadas pela literatura, o presente trabalho propôs, inicialmente, a determinação da variabilidade genética de espécies pertencentes às famílias Belostomatidae, Gelastocoridae, Gerridae, Notonectidae e Veliidae (Heteroptera) e Cercopidae (Auchenorrhyncha), com posterior análise sistemática a partir de informações moleculares (genes *COI*, *16S* rDNA e *28S* rDNA) e, posteriormente, combinadas com dados citogenéticos, ecológicos e morfológicos.

Análises de diversidade genética em Hemiptera são raras e de grande importância para a compreensão de características, como a composição nucleotídica e a variação de genes intra e interespecíficas e grupos relacionados. A determinação dessa variação entre os táxons analisados no presente estudo, a partir da construção e análise da matriz de distância gerada para os dados obtidos para o gene *COI*, permitiu-nos observar que a variação média entre os espécimes pertencentes à família Cercopidae (Cicadomorpha, Auchenorrhyncha) foi menor do que o observado para as espécies pertencentes à infraordem Gerromorpha e Nepomorpha (Heteroptera).

Entre as espécies de Gerromorpha e Nepomorpha os maiores valores observados foram para as espécies *Rhagovelia zela* e *Halobatopsis platensis* (Gerromorpha) e os menores valores ocorreram entre os táxons *Martarega brasiliensis* e *Buenoa antigone antigone*. Intraespecificamente, os maiores valores foram observados para o gênero *Rhagovelia* e os menores para o gênero *Brachymetra*.



De forma geral, as variações observadas entre os táxons foram baixas, podendo ser associadas, por exemplo, a ocorrência de um alto fluxo gênico nestas populações (SOSA-GOMEZ et al., 2005).

Park et al. (2011) e Jung et al. (2011) em amplos estudos com insetos da subordem Heteroptera observaram diferentes padrões de divergência intraespecífica e interespecífica quando foi utilizado o gene *COI* como marcador. Para os autores pequenas ou grandes variações intraespecíficas são comuns dentro da subordem, o que pode explicar os valores observados para os espécimes *Brachymetra albinervis albinervis* (Gerromorpha, Gerridae) que ficaram acima dos menores valores observados para espécies diferentes como *Mahanarva* e *Notozulia* (Cicadomorpha, Cercopidae). Os autores atribuem, ainda, a divergência intraespecífica, a polimorfismos ancestrais ou introgressão, contudo não descarta a possibilidade de tal divergência apontar espécies crípticas.

A partir dos resultados obtidos, foi possível observar que as regiões gênicas para o gene mitocondrial *COI* apresentaram-se como um bom marcador para as análises de variabilidade genética, revelado pelas análises de distância. Verificou-se que a composição nucleotídica para esse gene foi rica em AT. Quando considerado o potencial informativo para cada posição do códon, observamos que para os espécimes pertencentes à família Cercopidae (Cicadomorpha, Auchenorrhyncha), assim como para os outros táxons estudados de Gerromorpha e Nepomorpha, a terceira base do códon foi a mais variável e a primeira base foi a mais conservada, característica, também descrita por Hebert et al. (2003a). Esses autores observaram que o gene *COI* possui uma maior variação na terceira posição de seus códons, ainda que mudanças nas sequências de aminoácidos desse gene ocorram mais lentamente que nos demais genes mitocondriais. O gene *COI*, quando comparado com outros genes, apresenta a mais lenta evolução de proteínas. No presente trabalho as espécies pertencentes à infraordem Nepomorpha foram as que apresentaram a terceira base mais variável e as espécies pertencentes à Cicadomorpha (Auchenorrhyncha) a menos variável, portanto a infraordem Gerromorpha foi a que apresentou a terceira base mais

informativa, característica já descrita para outras espécies de Hemiptera (HUA et al., 2008).

A composição nucleotídica (%AT) para as espécies *Deois flavopicta*, *Mahanarva fimbriolata*, *Mahanarva* sp. e *Notozulia entreriana* (Cicadomorpha, Auchenorrhyncha) foi de 68,15%. Para as espécies de Heteroptera da infraordem Gerromorpha, *Microvelia longipes* apresentou o maior valor de %AT e *Halobatopsis platensis* o menor, sendo o valor médio de 67,56%. Para as espécies da infraordem Nepomorpha, *Martarega brasiliensis* apresentou o maior valor de %AT e *Belostoma micantulum* o menor, sendo que a variação média observada foi de 67,77%. Esses resultados revelaram que entre os diferentes haplótipos para o gene *COI*, a composição nucleotídica apresentou-se acima da média, tendendo para adeninas e timinas.

Hua et al. (2008), analisando o genoma mitocondrial de Pentatomomorpha (Heteroptera), observaram que a composição nucleotídica estava entre 68,86 a 77,8% de conteúdo de AT. Estes resultados são semelhantes aos valores observados em nosso estudo. Esses mesmos autores destacam que as variações no conteúdo GC, apesar da menor frequência, estão diretamente relacionadas com diferentes padrões evolutivos.

Além da avaliação da variabilidade genética, os estudos filogenéticos são importantes para se compreender a proximidade e relacionamento entre os táxons.

Estudos a partir das regiões gênicas *COI*, *16S* rDNA e *28S* rDNA demonstram que o uso de marcadores moleculares, mitocondriais e nucleares, são importantes e permitem inferir tais relações de proximidade. O conjunto total de espécies estudadas para a família Cercopidae (Cicadomorpha; Auchenorrhyncha), em nossa análise, apresentaram-se monofiléticas. Cryan e Urban (2012) confirmam a monofilia de algumas espécies pertencentes a esta família e a outros grupos dessa subordem a partir de dados morfológicos e, também, moleculares.

Weirauch e Schuh (2011) a partir de uma revisão ampla, utilizando múltiplas análises, discutiram diferentes aspectos evolutivos descritos na literatura para as infraordens Gerromorpha e Nepomorpha, além de outras infraordens dos

Heteroptera. Tais análises indicam que os táxons pertencentes à subordem Heteroptera apresentam-se monofiléticas.

As espécies pertencentes às infraordens Gerromorpha e Nepomorpha permaneceram como grupo-irmãos nos estudos realizados no presente trabalho, porém estas relações só foram bem estabelecidas após a concatenação de todos os genes propostos. Assim como apontado por outros autores, em nossas análises foi observado que as análises dos genes separadamente, principalmente os mitocondriais, não são, a princípio, suficientes para estabelecer as relações filogenéticas entre os táxons (JUNG et al., 2011). Li et al. (2005) sugeriram que o segmento *COI* sozinho não poderia ser um marcador molecular ideal para a filogenia de Pentatomomorpha (Heteroptera). E, ainda, em níveis taxonômicos mais elevados, sequências do *COI* não são adequadas para estabelecer os relacionamentos entre os táxons (FRATI et al., 1997; LIU; BECKENBACH, 1992). A partir dos nossos resultados foi verificado que esse gene foi informativo até o nível de gênero. Entretanto, é necessário levar em consideração as características de cada um dos genes, mitocondriais ou nucleares e, utilizá-los em conjunto para a obtenção de resultados mais robustos, abrangendo níveis taxonômicos mais inclusivos.

Segundo Jung et al. (2011) os genes *COI* e *Cytb* são marcadores moleculares recomendados para a identificação de espécies crípticas em Heteroptera e, os genes nucleares 18S rDNA e 28S rDNA estão sendo muito utilizados para construções filogenéticas dos Heteroptera em amplos níveis taxonômicos.

Na análise dos agrupamentos formados, foi verificado que a maioria das espécies permanecem dentro de suas respectivas famílias (Cercopidae, Gerridae, Veliidae e Notonectidae), exceto por algumas inconsistências como, as espécies *Microvelia longipes* (Veliidae) e *Rheumatobates crassifemur crassifemur* (Gerridae), que não se agruparam com espécies pertencentes a suas respectivas famílias e, sim, com famílias diferentes das suas. Essa grande proximidade entre os táxons pertencentes às famílias Veliidae e Gerridae já foi discutida anteriormente por Damgaard et al. (2005), onde estes apresentaram-se como

grupo-irmãos, suportados por várias sinapomorfias morfológicas. Apesar do apontado, existem argumentos a favor da monofilia do grande grupo Veliidae, incluindo aspectos morfológicos, como por exemplo, a presença de um pente especializado na tíbia do macho (ANDERSEN, 1982). A família Gerridae é rica em espécies, mas estruturalmente mais homogênea sendo apontada, também, a monofilia de seus membros, entretanto com vários caracteres autopomórficos, justificando a falta de definição de algumas espécies nos agrupamentos por conta dessa grande proximidade.

Além dos dados moleculares, as informações citogenéticas, ecológicas e morfológicas quando combinados em uma única análise, são extremamente importantes para o estabelecimento das relações entre os táxons analisados. Informações como o cariótipo, número de autossomos, presença ou ausência de m-cromossomos e cromossomo Y, morfologia dos testículos, habitat, ambiente e hábito alimentar podem ter grandes contribuições para o entendimento das relações entre o grupo de espécies. Discussões como, por exemplo, qual sistema cromossômico do sexo seria o estado ancestral (X0 ou XY), podem começar a ser esclarecidos, ou melhor compreendidos quando esses dados são combinados (GROZEVA et al., 2009). A filogenia obtida a partir da análise de dados desta natureza, no presente trabalho, apresentou, por exemplo, o sistema X0 como estado ancestral para a maioria dos táxons analisados (famílias Notonectidae, Gerridae e Veliidae), exceto pelas espécies *Belostoma micantulum* (Belostomatidae, XY) e *Gelastocoris flavus flavus* (Gelastocoridae, X<sub>n</sub>Y), representando assim, o sistema derivado, XY e X<sub>n</sub>Y.

Com relação ao número de autossomos, foi observado que essa característica não foi fundamental na determinação e separação dos grupos, pois não foi possível estabelecer as relações utilizando essas informações. Outro aspecto não esclarecido de maneira efetiva em nossas análises foram as envolvidas com a ancestralidade dos complementos cromossômicos e a provável direção dos eventos como quebras ou fusões na determinação do maior ou menor número de cromossomos. Porém, foi possível observar que as espécies de Auchenorrhyncha apresentam complementos cromossômicos menores  $2n=15$

(*Notozulia entreriana*) e 19 (*Deois flavopicta* e *Mahanarva fimbriolata*), enquanto que as espécies de Heteroptera apresentam complementos cromossômicos maiores, variando de 21 a 35, exceto a espécie *Belostoma micantulum* que apresentou  $2n=16$  (CASTANHOLE et al., 2008, 2009, 2010a,b, 2012; PEREIRA, 2011).

Quando observado a morfologia dos testículos, foi verificado que espécies pertencentes ao mesmo gênero compartilharam a mesma morfologia, como as espécies de *Rhagovelia* (Veliidae). As espécies de Notonectidae pertencentes ao gênero *Martarega* apresentaram testículos espiralados e do gênero *Buenoa* apresentaram arredondados, mas altamente espiralados (PEREIRA, 2011).

Os resultados obtidos demonstraram a importância de se avaliar todas as características possíveis dos insetos estudados ressaltando, ainda, que dados de variabilidade genética e filogenéticas das espécies pertencentes às infraordens Gerromorpha e Nepomorpha (Heteroptera) e Cicadomorpha (Auchenorrhyncha) são escassos e de grande importância para a comunidade científica. Portanto, quanto maior o número de informações (caracteres), maior a robustez e confiabilidade das relações estabelecidas entre esses táxons.

## **V. CONCLUSÕES**

---

## V. CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como objetivo geral determinar as relações filogenéticas entre os táxons propostos, podendo-se concluir que:

- A variação observada entre os haplótipos gerados para a região gênica *COI* de Cicadomorpha (Auchenorrhyncha) foram menores do que as observadas para as espécies aquáticas pertencentes às infraordens Gerromorpha e Nepomorpha (Heteroptera), sendo cerca de duas vezes menor;
- A composição nucleotídica a partir do gene *COI* é rica em regiões AT e, a terceira base de cada códon apresentou-se mais variável;
- As análises filogenéticas das três regiões gênicas (*COI*, *16S* e *28S*) separadamente, foram importantes para representar o comportamento evolutivo desses táxons, sendo que nem sempre foram concordantes;
- A concatenação das regiões gênicas (*COI*, *16S* e *28S*) permitiu que grande parte das relações entre os táxons fossem estabelecidas de forma concisa nas duas análises. Os agrupamentos das espécies *Microvelia longipes* (Veliidae) e *Rheumatobates crassifemur crassifemur* (Gerridae) não foram definidos, pois agruparam-se com integrantes das famílias diferentes as suas, sendo Gerridae e Veliidae, respectivamente. Inconsistências reportadas na literatura para essas espécies foram corroboradas nesse trabalho;
- Além da concatenação das regiões gênicas *COI*, *16S* e *28S*, verificamos que a combinação com características citogenéticas, ecológicas e morfológicas fornecem informações interessantes para o agrupamento dos táxons, mostrando robustez na formação dos clados monofiléticos das infraordens Gerromorpha e Nepomorpha (Heteroptera);
- As análises filogenéticas sugerem, a partir dos dados combinados que o sistema cromossômico do sexo X0, provavelmente, é o estado ancestral;
- A análise dos dados combinados sugerem, também, que entre as espécies consideradas na filogenia, as relações entre os táxons foram consistentes em nível de família e habitat (Notonectidae: subaquáticos; Belostomatidae: fundo; Gelastocoridae: margem; Gerridae e Veliidae: superfície);

- O número de autossomos não permitiu determinar quais eventos ocorreram na formação do complemento cromossômico desses insetos, se por fissões ou fusões;
- Não foi possível estabelecer qual é a condição basal para a morfologia dos testículos em razão da variação observada para os Heteroptera;
- O marcador *COI* foi eficiente para o estabelecimento das relações filogenéticas no nível de gênero, o *16S* rDNA no nível de família e o *28S* a níveis taxonômicos mais inclusivos, como infraordem;
- Os resultados são inéditos e relevantes, principalmente, ao se considerar as espécies de Heteroptera aquáticos. Desta maneira, contribuindo com informações adicionais à comunidade científica.



## **VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR10520**: informação e documentação: citações em documentos: apresentação. Rio de Janeiro, 2002.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.
- ANDERSEN, N.M. The semiaquatic bugs (Hemiptera, Gerromorpha). Phylogeny, adaptations, biogeography, and classification. *Entomonograph*, v. 3, p. 1–455, 1982.
- AVISE, J. C. 2004. Molecular markers, natural history and evolution. 2nd edition. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- BEARD, C.B.; HAMM, D.M.; COLLINS, F.H. The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae*: DNA sequence, genome organization, and comparisons with mitochondrial sequences of other insects. *Insect Molecular Biology*, v. 2, p.103-109, 1993.
- BORING, A.M. A study of the spermatogenesis of 22 species of the Membracidae, jassidae, Cercopidae and Fulgoridae with special reference to the behavior of the old chromosome. *J. Exp. Zool.*, v. 4, p. 469-514, 1907.
- BORROR, D.J., DE LONG, M.D. TRIPLEHORN, A.C. **An Introduction to the Study of Insects**. Saunders College Publishing, Philadelphia. 1979.
- BORROR, D.J.; DELONG, D.M. **Introdução ao estudo dos insetos**. São Paulo, Brasil: Ed. Edgard Blucher LTDA., 1988.
- BOURGOIN, T.; CAMPBELL, B.C. Inferring a phylogeny for Hemiptera: falling into the ‘autapomorphic trap’. *Denisia*, v. 4, p. 67–82, 2002.
- BUCK, R.C. Mitosis and meiosis in *Rhodnius prolixus*: the fine structure of the spindle and diffuse kinetochore. *Journal Ultrastructure Research*, v. 18, p. 489-501, 1967.
- CAMERON, S. L.; BECKENBACH, A. T.; DOWTON, M.; WHITING, M. F. Evidence from mitochondrial genomics on interordinal relationships in insects. *Arthropod Systematics and Phylogeny*, v. 64, n. 1, p. 27-34, 2006.
- CAMPBELL, B. C.; STEFFEN-CAMPBELL, J. D.; GILL, R. J. Evolutionary origin of whiteflies (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodidae) inferred from 18S rDNA sequences. *Insect Molecular Biology*, v. 3, n. 2, p. 73-88, 1994.

CAMPBELL, B. C., STEFFEN-CAMPBELL, J. D.; SORENSEN, J. T.; GILL, R. J. Paraphyly of Homoptera and Auchenorrhyncha inferred from 18S rDNA nucleotide sequences. *Systematic Entomology*, v. 20, n. 3, p. 175-194, 1995.

CASTANHOLE, M.M.U.; PEREIRA, L.L.; SOUZA, H.V.; BICUDO, H.E., et al. Heteropicnotic chromatin and nucleolar activity in meiosis and spermiogenesis of *Limnogonus aduncus* (Heteroptera, Gerridae): a stained nucleolar organizing region that can serve as a model for studying chromosome behavior. *Genet. Mol. Res.*, v. 7, p. 1398-1407, 2008.

CASTANHOLE, M. M. U. Espermatogênese e comportamento nucleolar em machos de Heteroptera aquáticos. São José do Rio Preto. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, 117pp, 2009.

CASTANHOLE, M.M.U.; PEREIRA, L.L.V.; SOUZA, H.V.; ITOYAMA, M.M. Spermatogenesis and karyotypes of three species of water striders (Gerridae, Heteroptera). *Genet. Mol. Res.*, v. 9, n.3, p. 1343-1356, 2010a.

CASTANHOLE, M.M.U.; PEREIRA, L.L.V.; SOUZA, H.V.; VALERIO, J.R.; BARBOSA, L.R.; ITOYAMA, M.M. Meiotic chromosomes and nucleolar behavior in testicular cells of the grassland spittlebugs *Deois flavopicta*, *Mahanarva fimbriolata* and *Notozulia entreriana* (Hemiptera, Auchenorrhyncha). *Genetics and Molecular Biology*, v. 33, n. 2, p. 244-252, 2010b.

CASTANHOLE, M.M.U.; PEREIRA, L.L.V.; SOUZA, H.V.; ITOYAMA, M.M. Spermatogenesis of riffle bugs, *Rhagovelia whitei* and *Rhagovelia* sp (Veliidae), and backswimmers *Martarega* sp (Notonectidae). *Genetics and Molecular Research*, v. 11, n. 3, p. 2003-2020, 2012.

CLARK, W.E.; DIAZ, G.I.; VAN CLEAVE, H.W. Taxonomy and biology of spittlebugs of the genera *Aeneolamia* Fennah and *Prosapia* Fennah (Cercopidae) in Northeastern Mexico. *Folia Entomologica Mexicana*, v. 34, p. 13–24, 1980.

COBBEN, R.H. Evolutionary trends in Heteroptera. Part I. Eggs, architecture of the shell, gross embryology and eclosion. *Center Agric. Publ. & Document*, Wageningen, 475 p, 1968.

COMINGS, D.E.; OKADA, T.A. Holocentric chromosomes in *Oncopeltus*: kinetochore plates are present in mitosis but absent in meiosis. *Chromosoma* (Berl.), v. 37, p. 177-192, 1972.

CRYAN, J.R.; SVENSON, G.J. Family-level relationships of the spittlebugs and froghoppers (Hemiptera: Cicadomorpha: Cercopoidea). *Systematic Entomology*, v. 35, p. 393-415, 2010.

- CRYAN, J.R.; URBAN, J. M. Higher-level phylogeny of the insect order Hemiptera: is Auchenorrhyncha really paraphyletic? *Systematic Entomology*, v. 37, p. 7–21, 2012.
- DAMGAARD, J.; ANDERSEN, N.M.; MEIER, R. Combining molecular and morphological analyses of water strider phylogeny (Hemiptera–Heteroptera, Gerromorpha): effects of alignment and taxon sampling. *Systematic Entomology*, v. 30, p. 289–309, 2005.
- DEY, S.K. Chromosome of five species of spittle bugs (Homoptera, Cercopidae). *Cytologia*, v.56, p.523–526, 1991.
- DITRICH, T.; KOSTAL, V. Comparative analysis of overwintering physiology in nine species of semi-aquatic bugs (Heteroptera: Gerromorpha). *Physiological Entomology*, v. 36, p. 261–270, 2011.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3a ed. Brasília: EMBRAPA- CENARGEN, 1998.
- FORERO, D. The systematics of the Hemiptera. *Revista Colombiana de Entomología*, v. 34, p. 1–21, 2008.
- FRATI, F.; SIMON, C.; SULLIVAN, J.; SWOFFORD, D.L. Evolution of the mitochondrial cytochrome oxidase II gene in Collembola. *J Mol Evol.*, v. 44, p. 145-158, 1997.
- GILLESPIE, J.J.; JOHNSTON, J.S.; CANNONE, J.J.; GUTELL, R.R. Characteristics of the nuclear (18S, 5.8S, 28S and 5S) and mitochondrial (12S and 16S) rRNA genes of *Apis mellifera* (Insecta: Hymenoptera): structure, organization and retrotransposable elements. *Insect Molecular Biology*, v. 15(5), p. 657-686, 2006.
- GONZALEZ-GARCIA, J.M.; ANTONIO, C.; SUJA, J.A.; RUFAS, J.S. Meiosis in holocentric chromosomes: kinetic activity is randomly restricted to the chromatid ends of sex univalents in *Graphosoma italicum* (Heteroptera). *Chromosome Research*, v. 4, p. 124-132, 1996.
- GOODCHILD, A. J. P. *Evolution of the alimentary canal of the Hemiptera*. *Biological Review* 41: 97-140, 1966.
- GRIMALDI, D.; ENGEL, M.S. *Evolution of the Insects*. New York/Cambridge: Cambridge University Press. xv + 755 pp, 2005.

GROZEVA, S.; NOKKALA, S. Chromosomes and their behaviour in two families of the primitive infraorder Dipsocoromorpha (Heteroptera). *Hereditas*, v. 125, p. 31-36, 1996.

GROZEVA, S.; NOKKALA, S.; SIMOV, N. Chiasmata male meiosis in six species of water bugs from infraorders Nepomorpha and Gerromorpha (Insecta: Heteroptera). *Comparative Cytogenetics*, v. 3, p. 125–130, 2009.

Hajibabaei, M.; JANZEN, D.H.; BURNS, J.M.; HALLWACHS, W.; HEBERT, P.D.N. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proc Natl Acad Sci USA* v. 103, p. 968–971, 2006.

HALKKA, O. Chromosome studies on the Hemiptera Homoptera Auchenorrhyncha. *Annales Academiae Scientiarum Fennicae.*, v. 43, p. 1-71, 1959.

HALKKA, O. Recombination in six Homopterous families. *Evolution*, v. 18, p. 81-88, 1964.

HAMILTON, K. G. A. Morphology and evolution of the Rhynchotan head (Insecta: Hemiptera, Homoptera). *The Canadian Entomologist*, v. 113, n. 11, p. 953-974, 1981.

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; DEWARRD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.*, v. 270, p. 313-321, 2003a.

HEBERT, P.D.N.; RATNASINGHAM, S.; DEWAARD, J.R. Barcoding animal life: cytochrome oxidase subunit 1 divergences among closely related species *Proc R Soc London Ser B-Biol Sci*, v. 270, p. S96–S99, 2003b.

HEBSGAARD, M. B.; ANDERSEN, N. M. DAMGAARD, J. Phylogeny of true water bugs (Nepomorpha: Hemiptera-Heteroptera) based on 16S and 28S rDNA and morphology. *Sistematic Entomology*, v. 29, p. 488-508, 2004.

HEINRICHS, E. A.; BARRION, A. T. Rice-Feeding Insects and Selected Natural Enemies in West Africa. Biology, Ecology, Identification (Edited by G. P. Hettel). Illustrated by CRIS DE LA CRUZ and JESSAMYN R. ADORADA. IRRI, WARDA, 242 pp, 2004.

HOLMANN, F.; PECK, D. C. Economic damage caused by spittlebugs (Homoptera: Cercopidae) in Colombia: a first approximation of impact on animal production in *Brachiaria decumbens* pastures. *Neotrop. Entomol.*, v. 31, p. 275-284, 2002.

HUA, J.; LI, M.; DONG, P.; CUI, Y.; XIE, Q.; BU, W. Comparative and phylogenomic studies on the mitochondrial genomes of Pentatomomorpha (Insecta: Hemiptera: Heteroptera). *BMC Genomics*, v. 9, p. 610, 2008.

HUGHES-SHCRADER, S.; SHCRADER, F. The Kinetochore of the Hemiptera. *Chromosoma*, v. 12, p. 327-350, 1961.

INADA, K., KITADE, O., MORINO, H. Paternity analysis in an egg-carrying aquatic insect *Appasus major* (Hemiptera: Belostomatidae) using microsatellite DNA markerse.v. 14, p. 43–48. 2011.

JENKINS, D.W. Pathogens, parasites and predators of medically important Arthropods, annotated list and bibliography. B. World Health Organ. (supplement), p. 1-150, 1964.

JUNG, S.; DUWAL, R. K.; LEE, S. COI barcoding of true bugs (Insecta, Heteroptera). *Molecular Ecology Resources*, v. 11, p. 266–270, 2011.

KIRILLOVA, V.I. Chromosome numbers of leafhoppers (Homoptera, Auchenorrhyncha) of the world fauna. I. Superfamilies Fulgaroidea, Cercopoidea, Cicadoidea. *Entomologiceskoe obozrenie*, v. 65, p. 115-125, 1986.

KIRILLOVA, V.I. Chromosomes numbers of leafhoppers (Homoptera, Auchenorrhyncha) of the world fauna. I. Karyotype peculiarities of the leafhoppers of the superfamilies Fulgaroidea, Cercopoidea, Cicadoidea . *Entomologiceskoe obozrenie*, v. 66, p. 321-337, 1987.

KRISTENSEN, N. P. Phylogeny of insect orders. *Annual Review of Entomology*, v. 26, p. 135-157, 1981.

KRISTENSEN, N. P. Chapter 5. *Phylogeny of extant Hexapods*. Pp. 125-140. In: CSIRO, Division of Entomology. *Insects of Australia*. ed. 2, v. 2. Cornell University Press, Ithaca, USA. 1137 p, 1991.

LEITE, L.G.; MACHADO, L.A.; GOULART, R.M.; TAVARES, F.M.; FILHO, A.B. Screening of entomopathogenic nematodes (Nemata: Rhabditida) and the efficiency of *Heterorhabditis* sp. against the sugarcane root spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Fabr.) (Hemiptera: Cercopidae). *Neotropical Entomology*, v. 34, p. 785–790, 2005.

LETSCH, H. O.; MEUSEMANN, K.; WIPFLER, B.; SCHUTTE, K.; BEUTEL, R.; MISOF, B. Insect phylogenomics: results, problems and the impact of matrix composition. *Proc. R. Soc. B.*, published online, doi:10.1098/rspb.2012.0744, 2012.

- LI, H.; DENG, R.; WANG, J.; CHEN, Z.; JIA, F.; WANG, X. Z. A preliminary phylogeny of the Pentatomomorpha (Hemiptera: Heteroptera) based on nuclear 18S rDNA and mitochondrial DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol*, v. 37, n. 2, p. 313–326, 2005.
- LI, M.; TIAN, Y.; ZHAO, Y.; BU, W. Higher Level Phylogeny and the First Divergence Time Estimation of Heteroptera (Insecta: Hemiptera) Based on Multiple Genes. *Plos one*, v. 7( 2), p. e32152, 1-17, 2012.
- LIU, H.; BECKENBACH, A.T. Evolution of the mitochondrial cytochrome oxidase II gene among ten orders of insects. *Mol. Phylogenet. Evol.*, v. 1, p. 41-52, 1992.
- MADDISON, D.R. *Hemiptera. True bugs, cicadas, leafhoppers, aphids, etc.* Version 01 January 1995 (temporary). <http://tolweb.org/Hemiptera/8239/1995.01.01> in The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>, 1995.
- MAHNER, M. Systema Cryptoceratorum Phylogenticum (Insecta, Heteroptera). *Zoologica*, v. 48, n. 143, p. 1-302, 1993.
- MANNA, G.K. Chromosomes in evolution in Heteroptera. In. Sharma A.K. and Sharma A, (Eds), *Chromosomes in Evolution of Eukaryotic groups*, v. 2, p. 189-225, CRC Press, Florida, 1984.
- MARIN-MORALES, M. A., ZEFA, E., BERTAGNA, M., MATHIAS, M. I. C., ARRIGONI, E. Chromosome analysis of two species of sugar cane pests of the genus *Mahanarva* (Homoptera, cercopidae). *Caryologia*, v. 55, p. 357-360, 2002.
- MENKE, A.S. The semiaquatic and aquatic Hemiptera of California (Heteroptera: Hemiptera). *Bull. Calif. Insect Surv.*, v. 21, p. 1-166, 1979.
- MERRITT, R. W.; CUMMINS, K. W. An introduction to the aquatic insects of North America. 3ed. Dubuque. Kendall/Hunt Publishing Company. USA. 862pp., 1984.
- MEUSNIER, I.; SINGER, G.A.C.; LANDRY, J. F.; HICKEY, D.A.; HEBERT, P.D.N.; HAJIBABAEI, M. A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis. *BMC Genomics*, v. 9, p. 214, 2008.
- MORITZ, C; DOWLING, T.E.; BROWN, W. M. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Ann. Ecol. Syst.*, v. 18, p. 269-292, 1987.
- MOTZKO, D.; RUTHMANN, A. Spindle membranes in mitosis and meiosis of the heteropteran insect *Dysdercus intermedius*. A study of the interrelationship of

spindle architecture and the kinetic organization of chromosomes. **European Journal of Cell Biology**, v. 33, p. 205-216, 1984.

MURAJI, M.; KAWASAKI, K.; SHIMIZU, T. Phylogenetic utility of nucleotide sequences of mitochondrial 16S ribosomal RNA and cytochrome *b* genes in anthocorid bugs (Heteroptera: Anthocoridae). *Appl Entomol Zool*, v. 35, p. 293–300, 2000.

NAHUM, L.A. Evolução dos genomas. In: MATIOLI, R. S. *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto: Editora Holos, p. 82-96, 2001.

NOLLER, H.F. RNA structure: reading the ribosome. *Science*. v. 309, p.1508–1514, 2005.

PACHECO, J.M.; SILVA, C.R.S.; RUVOLO, M.C.C.; SCHIAVONE, C. *Biologia das cigarrinhas das pastagens (Homoptera, Cercopidae): ninfas de Deois flavopicta*. *Resumos Congresso Brasileiro de Entomologia*, v. 9, p. 43, 1984.

PAPESCHI, A. G.; BRESSA, M. J. Evolutionary cytogenetics in Heteroptera. *J. Biol. Res.*,v. 5, p. 3-21, 2006.

PAPESCHI, A.G.; MOLA, L.M. Meiotic studies in *Acanonicus hahni* (Coreidae, Heteroptera). I. Behaviour of univalents in desynaptic individuals. *Genetica*, v. 80, p. 31-38, 1990.

PARK, D.S.; FOOTTIT, R.; MAW, E.; HEBERT, P.D.N. Barcoding Bugs: DNA-Based Identification of the True Bugs (Insecta: Hemiptera: Heteroptera). *Plos One*. v. 6, n. 4, e18749, DOI: 10.1371/ journal.pone.0018749, 2011.

PECK, S.C.; NÜHSE, T.S.; HESS, D.; IGLESIAS, A.; MEINS, F.; BOLLER, T. Directed proteomics identifies a plant-specific protein rapidly phosphorylated in response to bacterial and fungal elicitors. *Plant Cell*, v. 13, p. 1467–1475, 2001.

PEREIRA, M.H.; SILVA, R.E.; AZEVEDO, A.M.S.; MELO, A.L.; PEREIRA, L.H. Predation of *Biomphalaria glabrata* during the development of *Belostoma anurum* (Hemiptera, Belostomatidae). *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* [online], v. 35, 1993.

PEREIRA, D. L. V; MELO, A. L.; HAMADA, N. Chaves de identificação para famílias e gêneros de Gerromorpha e Nepomorpha (Insecta: Heteroptera) na Amazônia Central. *Neotropical Entomology*, v. 36, p. 210-228, 2007.

PEREIRA, L. L.V. **Estudo morfológico dos testículos com ênfase na análise da espermatogênese e ultraestrutura de espécies aquáticas de**



- Heteroptera.** São José do Rio Preto. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, 103pp, 2011.
- PIRES, C.C.; SILVA, L.F.; FARINATTI, L.H.E. et al. Crescimento de cordeiros abatidos com diferentes pesos. 2. Constituintes corporais. *Ciência Rural*, v.30, n.5, p.869-873, 2000.
- POISSON, R. Nouvelles observations sur le processus espermatogénétique dans les éléments sexuels d' Hemípteres aquatiques. *Archives the Zoologie Experimentale et Generale*, v.78, p. 133-194, 1936.
- RODMAN, D. H.; MILLER, D. J. Enzyme-Activities Associated With Salivary-Glands of the Froghopper Eoscarta-Carnifex (F) (Homoptera, Cercopoidae) - Possible Role of Salivary Catalase in Phytotoxicity. *Australian Journal of Zoology*, v. 40, n.4, p. 365-370, 1992.
- RUFAS, J. S.; GIMÉNEZ-MARTÍN, G. Ultrastructure of the kinetochore in *Graphosoma italicum* (Hemiptera: Heteroptera). **Protoplasma**, v. 32, p. 142-148, 1986.
- SANZ, N.T. **Checklist of Pests and Diseases of Selected Crops of Belize.** Belize National Plant Protection Service, Ministry of Agriculture and Fisheries, Central Farm, Cayo District, 1997.
- SCHRADER, F. Notes on the mitotic behavior of long chromosomes. *Cytologia* (Toldo), v. 6, p. 422-430, 1935.
- SCHRADER, F. The formation of tetrads and the meiotic mitoses in the male of *Rhytidolomia senilis* Say (Hemiptera, Heteroptera). *Journal Morphology*, v. 67, p. 123-141, 1940.
- SCHUH, R.T.; SLATER, J.A. True Bugs of the World (Hemiptera; Heteroptera: Classification and Natural History). Ithaca, London: Cornell University Press, 1995.
- SCHULMEISTER, S. Simultaneous analysis of basal Hymenoptera (Insecta): Introducing robust-choice sensitivity analysis. *Biol. J. Linn. Soc.*, v. 79, p. 245–275, 2003.
- SCHLEE, v D. Morphologie und symbiose; ihre beweiskraft für die verwandtschaftsbeziehungen der Coleorrhyncha (Insecta, Hemiptera). Phylogenetische studien an Hemiptera IV.: Heteropteroidea (Heteroptera + Coleorrhyncha) als monophyletische gruppen. *Stuttgarter Beiträge zur Naturkunde*, v. 210, p. 1-27, 1969.

SHCHERBAKOV, D.E.; POPOV, Y. A. Superorder Cimicidea Laicharting, 1781. Order Hemiptera Linné, 1758. The bugs, cicadas, plantlice, scale insects, etc. (= Cimicida Laicharting, 1781, = Homoptera Leach, 1815 + Heteroptera Latreille, 1810). pp. 143-157. In: Rasnitsyn, A. P.; Quicke, D. L. J. (eds.). *History of Insects*. Kluwer Academic Publishers, the Netherlands. 517 p, 2002.

SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; FLOOK, P. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann Entomol Soc. Am.*, v. 87, p. 651–701, 1994.

SMITH, R. L. Evolution of paternal care in the giant water bugs (Heteroptera: Belostomatidae). Pp. 116–149 in J. C. Choe and B. J. Crespi [eds.], *Social Behavior in Insects and Arachnids*. Cambridge University Press, Cambridge, U.K. 541 pp, 1997.

SMITH, M. A.; FISHER, B. L.; HEBERT, P.D.N. DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: The ants of Madagascar. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B In press*, 2005.

SOLÉ-CAVA, A.M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: Matioli, SR. (ed.). *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto: Editora Holos, pp. 172-192, 2001.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; BORGES, E.; VIERA, I.H.T.L.; COSTA, F.; OLIVEIRA, C.N. Trypanosomatid prevalence in *Nezara viridula* (L.), *Euschistus heros* (Fabricius) and *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Heteroptera: Pentatomidae) populations in northern Paraná. *Neotrop. Entomol.*, v. 34, p. 341-347, 2005.

SPRINGER, M. S.; DEBRAY, R. W.; DOUADY, C.; AMRINE, H. M.; Mitochondrial versus nuclear gene sequences in deep level mammalian phylogeny reconstruction. MADSEN, O.; JONG, W. W.; STANHOPE, M. J. *Mol. Biol. Evol.*, v. 18, n. 2, p. 132-143, 2001.

STYS, P.; JANSSON, A. Check-list of recent family-group and genus-group names of Nepomorpha (Heteroptera) of the world. *Acta Entomol. Fennica*, v. 50, p. 1-44; Helsinki, 1988.

SUJA, J.A.; DEL CERRO, A.L.; PAGE, J.; RUFAS, J.S.; et al. Meiotic sister chromatid cohesion in holocentric sex chromosomes of three heteropteran species is maintained in absence of axial elements. *Chromosoma*, v. 109, p. 35-43, 2000.

SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 15, p. 199–203, 2000.

- TAKENOUCI, Y.; MURAMOTO, N. A study of the chromosomes in three species of heteropteran insects (Anthocoridae and Vellidae: Heteroptera). (In Japanese). *J. Hokkaido Univ. Edu.*, IIB, v. 22, p. 23-25, 1971.
- TALLAMY, D.W. Sexual selection and evolution of exclusive paternal care in arthropods. *Animal Behaviour*, v. 60, p. 559-567, 2000.
- THOMPSON, V. Associative nitrogen fixation, C4 photosynthesis, and the evolution of spittlebugs (Hemiptera: Cercopidae) as major pests of Neotropical sugar cane and forage grasses. *Bulletin of Entomological Research*, v. 94, p. 189–200, 2004.
- THOMPSON, V.; LEON-GONZALEZ, R. La identificación y distribución de los salivazos de la caña de azúcar y los pastos (Homoptera: Cercopidae) en Costa Rica. *Manejo Integrado de Pagas y Agroecología (Costa Rica)*, v. 75, p. 43–51, 2005.
- UESHIMA, N. **Animal cytogenetics**, Insecta 6, Hemiptera: Heteroptera. Gebruder Borntraeger: Berlin, Stuttgart, 1979.
- URBAN, J. M.; CRYAN, J. R. Evolution of the planthoppers (Insecta: Hemiptera: Fulgoroidea). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 42, p. 556-572, 2007.
- VALÉRIO, J. R., CARDONA, C.; PECK, D. C.; SOTELO, G. Spittlebugs: bioecology, host plant resistance and advances in IPM. *Proceedings of the XIX International Grassland Congress*, Piracicaba, FEALQ, p. 217 – 221, 2001.
- VON DOHLEN, C. D.; MORAN, N.A. Molecular phylogeny of the Homoptera: a paraphyletic taxon. *Journal of Molecular Evolution*, v. 41, n. 2, p. 211-223, 1995.
- XIE, Q.; TIAN, Y.; ZHENG, L.; BU, W. 18S rRNA hyper-elongation and the phylogeny of Euhemiptera (Insecta: Hemiptera). *Mol Phylogenet Evol.*, v. 47, n. 2, p. 463–471, 2008.
- WILSON, M. R.; CLARIDGE, M. F. Handbook for the identification of leafhoppers and planthoppers of rice. CAB International, London.1991
- WEIRAUCH, C.; SCHUH, H. Systematics and Evolution of Heteroptera: 25 Years of Progress. *Annu. Rev. Entomol.*, v. 56, p. 487–510, 2011.
- WHEELER, W. C.; SCHUH, R. T.; BANG, R. Cladistic congruence among higher groups of Heteroptera: congruence between morphological and molecular data sets. *Entomologica Scandinavica*, v. 24, p. 121-137, 1993.
- WHITE, M.J.D., **Animal Cytology and Evolution**, 3<sup>rd</sup> ed. Cambridge University Press, 1973.

WILMOTTE, A. Molecular evolution and taxonomy of the cyanobacteria. *In* Bryant, D.A. (Editor), *The molecular biology of cyanobacteria*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 1-25, 1994.

WOLF, K. W. Acetylation of  $\alpha$ -tubulin in male meiotic spindles of *Pyrrhocoris apterus*, an insect with holocentric chromosomes. **Protoplasma**, v. 191, p. 148-157, 1996.

YAMADA, A. M. T. D. Relações filogenéticas do gênero *Scaura* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) e filogeografia de *Scaura latitarsis*. São Paulo, Tese de Doutorado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 29pp, 2010.

YOSHIZAWA, K.; SAIGUSA, T. Phylogenetic analysis of paraneopteran orders (Insecta: Neoptera) based on forewing base structure, with comments on monophyly of Auchenorrhyncha (Hemiptera). *Systematic Entomology*, v. 26, p. 1-13, 2001.

ZHOU, X.; ADAMOWICZ, S. J.; JACOBUS, L. M.; DEWALT, R. E.; HEBERT, P. D. N. Towards a comprehensive barcode library for Arctic life-Ephemeroptera, Plecoptera, and Trichoptera of Churchill, Manitoba, Canada. *Frontiers in Zoology*, v. 6, p. 30, 2009.

ZRZAVÝ, J. *Evolution of Hemiptera: an attempt at synthetic approach*, pp. 19-22. In: 6 th international Symposium of Scale Insects Studies, Cracow, 1990.